INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

19.7.87

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

***AValiação Comparativa das Estratégias
Para Aumento de Sensibilidade em
Eletroforese Capilar***

Maria de Lourdes Leite de Moraes
Tese de doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

SÃO PAULO

2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004125

Ficha Catalográfica

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

Moraes, Maria de Lourdes Leite de
M827a Avaliação comparativa das estratégias para aumento de
sensibilidade em eletroforese capilar / Maria de Lourdes Leite de
Moraes. -- São Paulo, 2001.
150p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

I. Eletroforese capilar : Química analítica I. T. II. Tavares,
Marina Franco Maggi, orientador.

543.0871 CDD

**“Avaliação Comparativa das Estratégias para
Aumento de Sensibilidade em Eletrofores Capilar”**

MARIA DE LOURDES LEITE DE MORAES

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em
Ciências - Área: Química Analítica.*

Aprovada por:

Profa. Dra. MARINA FRANCO MAGGI TAVARES
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. CLAUDIMIR LUCIO DO LAGO
IQ - USP

Profa. Dra. MARIA OLIMPIA DE OLIVEIRA REZENDE
IQSC – USP

Prof. Dr. BRONISŁAW POLAKIEWICZ
FCF-USP

Prof. Dr. EMANUEL CARRILHO
IQSC-USP

SÃO PAULO
25 DE JUNHO 2001.

*“There are only three problems with
capillary electrophoresis:
injection, separation and detection”*

Comment from a conferee at HPCE 89. Weinberger, R. Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, 1993, London, U.K.

*Agradeço a Deus em primeiro lugar pela força,
saúde e disposição que me foi dada para “sobreviver”
às intempéries de uma grande cidade.*

*À Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, a quem considero
tecnicamente e pessoalmente impecável, e que é acima de tudo amiga.
Agradeço pela confiança, pelos conselhos e ânimo durante todo o
trabalho.*

*Aos meus dois amores: meu marido Alexandre, pelos anos de paciência e
por ser tão especial, principalmente nas horas difíceis; e a pequena Carol,
fonte maior de nossa alegria, minha luz e inspiração para a finalização
desta tese.*

*Aos meus pais João e Maria Cleuza, à Cristiane e Duzão,
à Solange e Pilotto e ao pequeno Eduardo pelas alegrias
infinitas do lar....*

OUTROS AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP-SP), pela sua amizade, estímulo e conselhos.

Ao Dr. Norberto A. Guzman, The R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute, por seu apoio e ensinamentos na parte dos pré-concentradores.

Aos pesquisadores do LACE, Fabiana, Alessandra, Neide, Beth Alves, Fernando, Marcone, Clóvis, Beth Lima, Mari e Gustavo, e ao Wilson (técnico).

À Prof. Dra. Rosana Colombara, Universidade de Juiz de Fora (MG), pelo auxílio no Perkin Elmer e pelas boas risadas.

Ao pessoal do bloco 04, onde iniciei meus trabalhos de doutorado sob a orientação do Prof. Dr. Joel Camargo Rubim.

Em especial, às amigas Silvana e Kalli (Seção Pessoal), que foram as primeiras pessoas que me ajudaram quando cheguei ao Instituto.

Ao Alberto (Bloco 12), pela ajuda constante em todas as horas.

À minha irmã Solange (IQSC), pelos artigos enviados, discussões e revisão do trabalho, e às amigas de sempre, Ana Cristina e Vanessa.

À TEREFTALATOS MEXICANOS (TEMEX), pelas amostras de ácido tereftálico fornecidas.

À CRISTÁLIA, pelas amostras de besilato de atracúreo.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo auxílio concedido.

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Símbolos e Abreviações.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1 – Eletroforese capilar (CE).....	2
1.1 - Histórico da eletroforese capilar.....	3
1.2 - Características da eletroforese capilar.....	5
2 – Fundamentos da eletroforese capilar.....	5
2.1 - Solução tampão.....	7
2.2 - Ciclodextrinas.....	8
2.3 - O conceito de mobilidade efetiva.....	9
2.4 - Determinação da mobilidade efetiva.....	10
2.5 - Capilares.....	10
2.6 - Migração de ânions.....	13
3 – Estratégias para pré-concentração em eletroforese capilar.....	15
4 – Objetivos.....	17
5 – Referências bibliográficas.....	18

CAPÍTULO II – ÁCIDO TEREFTÁLICO

1 – Ácido Tereftálico.....	23
1.1 - Processo de obtenção.....	23
1.2 - Impurezas.....	25
2 – Objetivos.....	28

3 – Parte Experimental.....	28
3.1 - Instrumentação.....	28
3.2 – Soluções e padrões.....	28
3.3 – Amostras.....	29
3.4 – Contaminantes do ácido tereftálico.....	29
3.5 – Procedimento analítico.....	31
4 – Resultados e Discussões.....	32
4.1 – Testes de solubilização.....	32
4.2 – Otimização das condições de análise.....	32
4.3 – Identificação de componentes	37
4.4 - Análise do CTA.....	40
4.5 – Análise do PTA.....	44
4.6 – Estratégias para aumento de sensibilidade.....	51
5 – Conclusões.....	52
6 – Referências bibliográficas.....	53

CAPÍTULO III – BESILATO DE ATRACÚREO

1 – Agentes bloqueadores neuromusculares.....	56
1.1 - Besilato de atracúreo.....	57
1.2 - Rotas de decomposição.....	58
2 – Objetivos.....	60
3 – Parte experimental.....	60
3.1 – Instrumentação.....	60
3.2 – Soluções e padrões.....	61
3.3 – Amostras.....	62
3.4 – Procedimento analítico.....	62
3.5 – Impurezas.....	63
4 – Resultados e Discussões.....	63
4.1 – Otimização das condições de análise.....	63
4.1.1 – Avaliação do tampão.....	63
4.1.2 – Avaliação da injeção e voltagem.....	66

4.1.3 – Estudo da diluição da amostra.....	68
4.2 – Comparação da análise do besilato de atracúreo em HPLC e em CE.....	69
4.3 – Estudos de estabilidade.....	70
4.3.1 –Degradação térmica da amostra.....	70
4.3.2 – Estudos de estocagem.....	72
4.4 – Identificação das impurezas.....	73
5 – Conclusões.....	75
6 – Referências bibliográficas.....	76

CAPÍTULO IV – ESTRATÉGIAS PARA PRÉ CONCENTRAÇÃO

1 – Introdução aos métodos de pré-concentração.....	80
2 – Modos de injeção em CE.....	83
2.1 - Injeção hidrodinâmica.....	83
2.2 - Injeção eletrocinética.....	87
3 – Estratégias baseadas na concentração da amostra.....	88
3.1 - “Stacking” mediado por força iônica.....	88
3.1.1 – Avaliação do “Stacking” mediado por força iônica.....	92
3.2 - “Stacking” eletrocinético	93
3.2.1 – Avaliação do “Stacking” eletrocinético.....	95
3.3 - “Stacking” por injeção em grande volume.....	98
3.3.1 – Avaliação do “Stacking” por injeção em grande volume.....	100
3.4 - Isotacoforese transiente (tITP).....	101
3.4.1 - Avaliação da isotacoforese transiente.....	107
4 - Estratégias baseadas na geometria do capilar.....	116
4.1 – Cella HS.....	116
4.1.1 – Avaliação da cela HS.....	117
5 – Extração em fase sólida.....	119
5.1 – Confeção dos concentradores.....	121
5.2 – Avaliação dos concentradores.....	124

6 – Comparação entre as estratégias de aumento de sensibilidade.....	130
7 – Conclusões finais.....	135
8 – Referências bibliográficas.....	136

ANEXO I

Cálculo do sinal ruído.....	143
-----------------------------	-----

ANEXO II

Curriculum vitae.....	146
-----------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01 - Representação esquemática de um aparelho de eletroforese capilar.

Figura 02 - Representação esquemática da migração de íons em CE.

Figura 03 - Estrutura química da α , β e γ ciclodextrina.

Figura 04 - Representação esquemática da parede do capilar.

Figura 05 - Representação de um capilar normal e de uma cela de alta sensibilidade.

Figura 06 - Representação esquemática da migração de ânions. (A) fluxo eletroosmótico normal e (B) invertido.

Figura 07 - Representação esquemática da síntese do ácido tereftálico e as estruturas químicas dos seus principais subprodutos.

Figura 08 - Estruturas dos possíveis contaminantes do ácido tereftálico.

Figura 09 - Espectros de absorção no UV-Vis do 4-CBA e do pTOL.

Figura 10 - Curva de mobilidade efetiva versus pH para alguns contaminantes do ácido tereftálico de fabricação industrial.

Figura 11 - Comparação da análise de ácido tereftálico cru (10000 mg/L) sob fluxo eletroosmótico normal (A) e fluxo eletroosmótico invertido (B).

Figura 12 - Separação da mistura dos compostos iônicos.

Figura 13 - Separação da mistura dos compostos bromados.

Figura 14 - Separação dos padrões de compostos iônicos e neutros em MEKC.

Figura 15 - Eletroferograma típico de uma amostra de ácido tereftálico cru de fabricação industrial.

Figura 16 - Análise de uma amostra industrial de ácido tereftálico altamente purificado realizada em (A) capilar regular de 75 μm (i.d.) e (B) cela HS.

Figura 17 - Fórmula estrutural do besilato de atracúreo, mostrando a configuração *cis* e *trans* da molécula.

Figura 18 - Rota de decomposição do besilato de atracúreo.

Figura 19 - Efeito da composição do sistema de eletrólitos sobre a resolução dos isômeros posicionais do besilato de atracúreo.

Figura 20 - Efeito do modo de injeção na análise de uma amostra de besilato de atracúreo (Tracur®).

Figura 21 - Efeito da voltagem de corrida na análise de uma amostra de besilato de atracúreo (Tracur®).

Figura 22 - Efeito da diluição da amostra de besilato de atracúreo (Tracur®) em água.

Figura 23 - Comparação entre HPLC e CE na análise do besilato de atracúreo.

Figura 24 - Comparação da análise por CE de uma ampola de Tracur® após estocagem.

Figura 25 - Gráfico da variação da laudanosina em uma amostra de Tracur® estocada a temperatura ambiente comparada a outra refrigerada a 10°C.

Figura 26 - Análise por CE de duas formulações comerciais de besilato de atracúreo.

Figura 27 - Identificação das impurezas do Tracur®.

Figura 28 - Esquema representativo da injeção hidrodinâmica por: (A) pressão, (B) vácuo e (C) sifonagem, e (D) esquema da injeção eletrocinética.

Figura 29 - Esquema representativo do “stacking” mediado por força iônica.

Figura 30 - Variação da dissolução de uma amostra de Tracur®.

Figura 31 - Esquema representativo do “stacking” em campo amplificado.

Figura 32 - Eletroferograma de uma amostra de Tracur® mostrando o “stacking” em campo amplificado.

Figura 33 - Variação do tempo de migração da laudanosina devido ao aumento do tempo de injeção da amostra em campo amplificado.

Figura 34 - Variação da resolução entre os picos de duas impurezas do Tracur® devida ao aumento do tempo de injeção da amostra em campo amplificado.

Figura 35 - Variação do aumento de sensibilidade para a laudanosina em amostras de Tracur® devido ao aumento do tempo de injeção de água em campo amplificado.

Figura 36 - Esquema representativo do “stacking” por injeção em grande volume.

Figura 37 - Amostra de Tracur® injetada em fluxo invertido com e sem “stacking” por injeção em grande volume.

Figura 38 - Representação esquemática da isotacoforese capilar.

Figura 39 - Esquema geral da separação de dois compostos A e B em isotacoforese transiente.

Figura 40 - Representação esquemática da isotacoforese transiente.

Figura 41 - Estruturas dos compostos que foram testados como eletrólitos terminadores para CITP.

Figura 42 - Injeção de laudanosina em diferentes eletrólitos avaliados para isotacoforese.

Figura 43 - Isotacoforese: utilização de HCl 10 mmol/L (pH 2,0) como LE e TRIS 10 mmol/L (pH 8,5) como TE.

Figura 44 - Curva de mobilidade para alguns compostos avaliados como eletrólito para tITP.

Figura 45 - Isotacoforese: utilização de TRIS como EL e GLUT como ET.

Figura 46 - Isotacoforese: utilização de ácido e base.

Figura 47 - Esquema representativo de uma cela HS.

Figura 48 - Amostra de Tracur® analisada em capilar normal e em cela HS.

Figura 49 - Representação esquemática da SPE-CE.

Figura 50 - Representação esquemática do preparo dos concentradores em fase sólida.

Figura 51 - Corte ideal para os capilares de um pré-concentrador

Figura 52 - Empacotamento adequado para um pré-concentrador.

Figura 53 - Fotografia em microscópio dos dois concentradores confeccionados para o trabalho

Figura 54 - Amostra padrão de laudanosina injetada utilizando o concentrador.

Figura 55 - Avaliação dos concentradores.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Histórico da HPCE.

Tabela II. Alguns esquemas de detecção em eletroforese capilar.

Tabela III. Alguns contaminantes do ácido tereftálico testados.

Tabela IV. Parâmetros estatísticos das curvas de calibração usadas no cálculo dos limites de detecção para o ácido tereftálico e suas impurezas em capilar regular de 75 μm .

Tabela V. Análise do ácido tereftálico cru segundo a metodologia otimizada usando capilar de sílica (75 μm).

Tabela VI. Parâmetros estatísticos das curvas de calibração usadas no cálculo do limite de detecção para as impurezas do ácido tereftálico na cela HS.

Tabela VII. Análise do ácido tereftálico purificado segundo a metodologia otimizada usando cela HS.

Tabela VIII. Avaliação comparativa das impurezas do ácido tereftálico altamente purificado empregando metodologias diferentes.

Tabela IX. Decomposição induzida por aquecimento do Tracur®.

Tabela X. Aumento obtido e comentários gerais para algumas das estratégias de aumento de sensibilidade.

Tabela XI. Mobilidade efetiva em pH 2,5 de alguns compostos avaliados para eletrólito terminador.

Tabela XII. Comparação das estratégias de aumento de sensibilidade para o besilato de atracúreo.

SÍMBOLOS E ABREVIações

FSCE	Eletroforese Capilar em Solução Livre
MEKC	Cromatografia Electrocinética Micelar
CGE	Eletroforese Capilar em Gel
CEC	Eletrocromatografia Capilar
L_{det}	comprimento efetivo (do ponto de injeção até o detector)
L_{tot}	comprimento total do capilar
t_i	tempo de migração do soluto i
t_{osm}	tempo de migração de um composto neutro
v_{ep}	velocidade eletroforética
v_{osm}	velocidade eletroosmótica
v_i	velocidade aparente de migração da banda
eof	fluxo eletroosmótico
E	campo elétrico
μ_{osm}	mobilidade eletroosmótica
μ_{ef}	mobilidade eletroforética
μ_{app}	mobilidade eletroforética aparente
μ_j	mobilidade iônica da espécie individual j
α_j	função de distribuição da espécie j
i	corrente
W	potência
V	voltagem aplicada
ϵ	constante dielétrica da solução
ζ	potencial zeta
η	viscosidade da solução
κ	condutividade térmica
N	n. de pratos teóricos
r	raio do capilar
i.d.	diâmetro interno
pk	logarítmo negativo da constante de dissociação do tampão
pH	logarítmo negativo da atividade do íon hidrogênio
H	altura

ΔH	variação de altura
C	concentração
d	diâmetro
g	gravidade
ρ	densidade
ΔP	diferença de pressão
V_{inj}	volume injetado

RESUMO

A Eletroforese Capilar (CE) é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, proporcionando alta resolução, eficiência e rapidez de análise. Para preservar a alta resolução, o volume injetado deve ser pequeno (da ordem de nanolitros), o que dificulta a análise de compostos em baixos níveis de concentração. O diminuto caminho óptico definido pelo diâmetro interno do capilar, associado ao pequeno volume injetado, compromete a detecção, principalmente quando se utiliza a absorbância em linha.

Várias estratégias têm sido descritas para melhorar a sensibilidade em eletroforese capilar. Neste trabalho, as estratégias de pré-concentração ("stacking", amplificação de campo, isotacoforese, cela óptica de alta sensibilidade e extração em fase sólida em linha) foram aplicadas a dois sistemas químicos: o ácido tereftálico (matéria prima importante utilizada na síntese de poliésteres) e o besilato de atracúreo (um agente bloqueador neuromuscular), avaliando-se comparativamente os resultados.

O primeiro sistema não se mostrou adequado para tal fim, pois o ácido tereftálico apresenta baixa solubilidade em água, sendo necessário adicionar hidróxido de sódio para dissolvê-lo, o que produzia um meio de alta condutividade, inviabilizando algumas das estratégias de pré-concentração. Porém, como o controle de impurezas no ácido tereftálico é de interesse industrial foi desenvolvido um método para a análise simultânea dos subprodutos principais: o ácido carboxibenzaldeído (4-CBA) e o ácido p-toluóico (pTO), que são controlados industrialmente por polarografia e cromatografia à gás, respectivamente. As análises foram realizadas em lotes industriais do ácido tereftálico cru (CTA) e do ácido tereftálico altamente purificado (PTA). As concentrações de 4-CBA e p-TOL (determinadas por CE) em ambos, CTA e PTA, estão de acordo com as especificações do produto. As análises mostraram a viabilidade da determinação das impurezas, sendo identificados ainda o ácido benzóico (BZ) e o 4-hidroximetilbenzóico (HMB).

O segundo sistema químico escolhido, o besilato de atracúreo, foi adequado para avaliar as várias estratégias de pré-concentração, pois este composto é solúvel em água. A apresentação comercial deste produto consiste na mistura de três isômeros (*cis-cis*, *cis-trans* e *trans-trans*), cada um exibindo uma potência bloqueadora neuromuscular particular. Primeiramente foi desenvolvido um método para a separação dos três isômeros por CE e depois foi feito um estudo das impurezas presentes no sistema, avaliando-se a temperatura e o tempo de estocagem. Foram identificadas duas impurezas no composto: a laudanosina e o monoquaternário ácido.

Foi escolhido o pico da laudanosina para avaliar as estratégias de aumento de sensibilidade devido este ser o principal composto de decomposição do atracúreo. O aumento de sensibilidade foi calculado em termos de ganho em sinal-ruído (S/R). O melhor resultado de aumento de sensibilidade para o "stacking" mediado por força iônica foi quando se dissolveu a amostra em água e comparou-se à mesma amostra dissolvida no tampão de corrida (o ganho em S/R foi da ordem de 25 vezes). Para as demais estratégias, a referência de partida foi uma amostra já dissolvida em água. Dentre todas as estratégias avaliadas, o maior ganho em sensibilidade foi obtido com os pré-concentradores (22,5 vezes de aumento em sinal-ruído (S/R)), mas a dificuldade de confecção não os tornam atrativos para as análises. A isotacoforese proporcionou o segundo maior aumento (7,6 vezes), comparável ao aumento de sensibilidade em campo amplificado (7,5 vezes) quando se utilizou um tampão com alta concentração de sal. Este ganho foi melhor que o da cela HS que teve aumento de 2,9 vezes em S/R, sugerindo que estas técnicas de pré-concentração podem ser utilizadas com vantagem em relação à cela HS proporcionando baixo custo. O aumento de sensibilidade não foi tão expressivo no "stacking" por injeção de grande volume (1,1), mas pode ser melhorado se o capilar inteiro for preenchido com a amostra.

ABSTRACT

Capillary Electrophoresis (CE) is a separation technique based on differential migration of ionic compounds in a electric field, providing high efficiency, resolution and faster analysis. To preserve high resolution, the injected volume must be small (nanoliters), which compromises the analysis of samples components in a low concentration level. The little pathlength defined by the capillary internal diameter and a small injected volume, place a large demand on detection, especially when on-line absorbance detectors is used.

Some strategies have been described to improve the capillary electrophoresis sensitivity. At this work, preconcentration techniques (stacking, field amplification, isotachophoresis, high sensitivity optical cell, and on line solid extraction) were applied to two chemical systems: terephthalic acid (an important raw material used in a polyester synthesis) and atracurium besylate (a neuromuscular blocking agent), and the results were comparatively evaluated.

The first selected system was not suitable for this purpose, due to poor solubility of terephthalic acid in water. It was necessary to work with solutions of crude and purified products prepared in 0.15 mol /L NaOH and that produced a high conductivity medium, jeopardizing some preconcentration techniques. However, since impurities control in terephthalic acid is of industrial interest, it was developed a method to simultaneously analyze major byproducts: 4-carboxybenzaldehyde (4-CBA) and toluidic acid (pTO), industrially controlled by polarography and gas chromatography, respectively. Analysis were conducted in industrial batches of crude terephthalic acid (CTA) and highly purified terephthalic acid (PTA). Concentrations of 4-CBA and p-TOL, in both, CTA and PTA, were in agreement with product specification. The results showed the viability to determine several impurities using CE. Additionally, two other contaminants, benzoic acid (BZ) and 4-hydroxymethyl benzoic acid (HMB), were identified.

The second selected system, atracurium besylate, was useful to evaluate some preconcentration strategies, because of this water solubility and ionic

character. Commercial presentation of this pharmaceutical consists in a mixture of three isomers (*cis-cis*, *cis-trans* e *trans-trans*), which one presenting a particular neuromuscular potency. First, it was developed a method to separate the three isomers by CE and then a study of the product impurities was conducted, evaluating the temperature tolerance and shelf life. Laudanosine and a monoquaternary acid were identified impurities in the pharmaceutical.

Laudanosine was selected for the evaluation of preconcentration techniques because it is the major decomposition product of atracurium besylate. Sensitivity enhancement was calculated in terms of signal-noise increase (S/R). The best results of enhancement sensitivity with "stacking" mediated by ionic strength was obtained when the sample was dissolved in water and it was compared to the same sample dissolved in a running buffer (signal-noise increase was 25 times). To the other strategies, the reference sample was dissolved in water). Among all evaluated strategies, the major sensitivity enhancement was obtained with preconcentrators (22,5 times), but its difficult manufacturing makes them not attractive for routine analysis. Isotachophoresis, the second best in terms of signal-noise (S/R) values (7,6 times), was comparable to field amplification sensitivity enhancement (7,5 times), when buffers with high salt concentration were used. Its enhancement was better than that of HS cell, that was signal-noise increase of 2,9 times), suggesting that these preconcentration techniques can be used with advantage in relation to HS cell providing low cost. Sensitivity enhancement was not expressive, in the large injection volumes strategy (1,1 times), but it can be improved if the whole capillary is filled with sample.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

*To see the world in a grain of sand
And heaven in a wild flower,
Hold infinity in the palm of your hand,
And eternity in an hour.*

William Blake

1 – ELETROFORESE CAPILAR (CE)

A ciência é de longe um problema de perspectiva. Enquanto o mundo num grão de areia pode ser uma coisa muito difícil de enxergar, as dimensões empregadas em eletroforese capilar também são muito menores do que aquelas com as quais estamos acostumados a trabalhar. Os diâmetros dos capilares são medidos em micrometros (unidade de medida aplicada a micróbios e bactérias), sendo que a diferença de apenas um micrometro no diâmetro de um capilar pode gerar diferenças significativas numa análise. O volume de um capilar é tipicamente de poucos microlitros, sendo os volumes de amostra injetados da ordem de nanolitros (ou 10^{-9} litros). Nestas escalas de grandeza, a tolerância requerida para os sistemas instrumentais é muito pequena [1].

A eletroforese capilar (CE) tem se mostrado uma técnica bem adaptada para esta nova tendência de miniaturização. Muitas questões químicas e biomédicas importantes apenas podem ser respondidas usando um sistema analítico que seja capaz de conduzir volumes de amostra da ordem de poucos nanolitros e de determinar quantidades de substâncias tão pequenas quanto zeptomol (10^{-21} mol) [2].

A eletroforese capilar representa sem dúvida uma mudança de direção no avanço das técnicas de separação modernas e já vem sendo utilizada em diversas áreas como química analítica, química forense, análise de alimentos, análises clínicas, bioquímicas, ciências farmacêuticas, neurociência, biologia molecular, química ambiental e genética [3-5].

1.1 - Histórico da Eletroforese Capilar

Os fundamentos da CE foram estabelecidos após um século de desenvolvimento em eletroforese e instrumentação. O modo mais simples de eletroforese, que é a eletroforese capilar de zona (CZE) foi desenvolvido por Hjérten em 1967 [6], utilizando tubos capilares com diâmetro interno de 3 mm. Nos anos 70, foram desenvolvidas com sucesso as técnicas usando capilares de diâmetro interno menores [7,8], o que gerou uma melhor dissipação de calor, permitindo o uso de um campo elétrico maior. O primeiro artigo sobre separações usando eletroforese capilar foi escrito por Everaerts e co-autores em 1979 [9]. Neste trabalho, os autores mostram a separação de 16 ânions em tubos capilares de 100 μm de diâmetro. Jorgenson e Lukacs [10] resolveram em 1981 os problemas complexos da injeção e detecção usando capilares de 75 μm de diâmetro interno. Todas estas vantagens claramente definiram o início da era da CE. Até então, os detectores usados eram os de fluorescência e condutividade.

A década de 1980 foi uma década de grandes inovações, especialmente na parte de detecção, sendo empregados os detectores de absorção óptica no ultravioleta, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massa e eletroquímicos. Tanto a eletroforese em gel quanto a focalização isoeletrica também foram adaptadas para o formato capilar [11,12]. Em 1984, Terabe [13] descreveu uma nova forma de eletroforese chamada cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), o que permitiu a análise de compostos neutros, e em 1985 Hjérten [14], descreveu o uso de capilares com a parede interna tratada, o que reduzia os problemas com aderência de proteínas. A introdução da eletroforese capilar em gel (CGE) foi descrita por Karger *et al.* em 1987 [15]. Outra grande inovação foi a eletrocromatografia capilar (CEC). Knox e Grant [16] demonstraram a primeira separação em CEC gerando 100.000 pratos de eficiência. O primeiro instrumento comercial foi introduzido no mercado em 1988 pela Bob Brownlee's Company (Microphoretics), utilizando como detecção a fluorescência indireta [17].

A grande revolução nos anos 90 foi a tecnologia de microchips [18]. A eletroforese capilar realizada em microchips vem emergindo como uma nova

tecnologia analítica e os numerosos artigos sobre separações eletroforéticas em canais microfabricados demonstram o enorme potencial desta técnica [18-24].

A Tabela I apresenta o desenvolvimento da eletroforese capilar desde 1967 até os anos recentes.

Tabela I: Histórico da Eletroforese Capilar*

Ano	Técnica	Deteção	Outros
1967	CZE em tubos de 3 mm (i.d.)		
1971	CITP		
1974	CZE em capilares de vidro (200-500 μm i.d.) Cromatografia eletroosmótica		Instrumentação comercial para CITP
1979	CZE em capilares de teflon de (200 μm i.d.)		"Stacking"
1981	CZE em capilares (75 μm i.d.)	Fluorescência	
1984	MEKC	Ultravioleta	
1985	CIEF	Fluorescência a laser	Reconhecimento quiral Capilares preenchidos
1986			Repulsão de proteínas das paredes do capilar
1987	CGE	Espectrometria de massas Eletroquímica	
1988		Fluorescência indireta	Instrumentação comercial para CE
1990			Eletroosmose em campo amplificado
1990	Tecnologia em microchip		
1991	CEC		Primeira separação em CEC com eficiência de 100.000 pratos teóricos

* - Tabela adaptada da referência 25.

1.2 - Características da Eletroforese Capilar

As aplicações da eletroforese capilar aumentam a cada dia, sobretudo devido às várias vantagens da técnica que decorrem do uso de capilares com diâmetro interno (i.d.) de 25-75 μm e comprimento (L) de 50-100 cm, que permitem uma dissipação efetiva do calor devido à razão elevada área/volume; alta resistência (10^9 ohms), permitindo o uso de altas voltagens (10-30 kV), gerando um campo elétrico elevado (100-500 V/cm) mas com corrente baixa ($<200 \mu\text{A}$). Outras vantagens incluem a alta resolução e eficiência ($N = 10^5 - 10^6$), tempos de análise apreciavelmente curtos; uso de meio aquoso com pouco consumo de amostra (volumes de injeção da ordem de 1-50 nL) e vários modos de separação (FSCE, MEKC, CGE, CITP, CIEF, CEC) [2-5,25].

2 – FUNDAMENTOS DA ELETROFORESE CAPILAR

A Figura 01 mostra o esquema de um equipamento para eletroforese capilar. Ele consiste basicamente de um capilar de sílica fundida, um detector, recipientes para a amostra e o tampão, um dispositivo para controle de temperatura e uma fonte de alta tensão. A caixa de acrílico é usada como segurança para prevenir o contato do operador com a fonte de alta tensão.

Figura 01: Representação esquemática de um aparelho de eletroforese capilar.

A fonte de alta tensão é conectada através de eletrodos de platina a dois reservatórios contendo solução de um eletrólito, nos quais também se encontram imersas as extremidades do capilar preenchido com a solução. Quando o potencial é aplicado, estabelece-se um campo elétrico ao longo do capilar provocando a movimentação das espécies presentes. O registro do sinal do detector em função do tempo é chamado de eletroferograma [26].

O modo de separação eletroforética mais usado na prática em virtude da facilidade de implementação e otimização das condições experimentais é a eletroforese capilar em solução livre (*free solution capillary electrophoresis*, FSCE) ou simplesmente eletroforese capilar de zona (*capillary zone electrophoresis*, CZE), como é comumente conhecida. Neste modo de eletroforese, o capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, (geralmente com características tamponantes) e a separação ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizar as causas de alargamento das bandas [27].

A **Figura 02** mostra uma representação do que ocorre dentro de um capilar durante uma separação eletroforética.

Figura 02: Representação esquemática da migração de íons em CE. Legenda: v_{osc} – velocidade eletroosmótica, v_{ep} – velocidade eletroforética, v_i – velocidade aparente de migração da banda.

As separações em eletroforese dependem do fluxo eletroosmótico (ou velocidade eletroosmótica (v_{osm})) e da velocidade eletroforética (v_{ep}). O fluxo eletroosmótico é o fluxo dos íons da solução, induzido pelo campo elétrico [27] (vide seção 2.4). Dentro do capilar, este fluxo é caracterizado por um perfil radial de velocidade e é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, na direção do detector. A velocidade eletroforética (v_{ep}) é a velocidade adquirida pelo íon dentro da solução sob a influência do campo elétrico [26]. Esta velocidade depende do raio efetivo do íon (que é função de sua massa, carga e forma).

O uso de voltagens elevadas é interessante, pois implica num ganho de eficiência e diminuição do tempo de análise. O ajuste da magnitude do fluxo eletroosmótico melhora a resolução de pares de solutos que eluem muito próximos.

2.1 - Solução Tampão

Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito. Neste caso é empregado o termo mobilidade efetiva, o qual incorpora o produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado [26] (vide seção 2.3).

Assim, o controle do pH e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. De forma geral os tampões são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao pK_a , mais ou menos uma unidade. Em capilares de sílica fundida, o intervalo de pH adequado para trabalho varia entre 2 e 11 sendo, em geral, limitado pela estabilidade do soluto.

As concentrações das soluções tampão em eletroforese capilar variam tipicamente entre 5 e 200 mmol/L. Altas concentrações podem comprometer a separação devido ao excesso de calor decorrente do efeito Joule. Baixas

concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar e ocasionar alargamento e distorção das bandas; o fluxo eletroosmótico também pode tornar-se errático, dificultando a reprodutibilidade dos tempos de migração e assim prejudicando a identificação dos solutos.

2.2 –Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são aditivos de tampão comumente usados em análises eletroforéticas. Elas são oligossacarídeos cíclicos compostos de várias unidades de glicopirranose, com cavidades hidrofóbicas que possuem dimensões capazes de formar complexos de inclusão. São compostos quirais pois possuem carbonos assimétricos sobre as unidades de glicose. A parte externa do macrociclo é relativamente hidrofílica devido à presença de grupos hidroxila. O tipo da ciclodextrina depende do número de unidades de glicose e dos grupos substituintes, sendo as de uso mais frequente a α , β e γ -ciclodextrina, que possuem 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente [28] (Figura 03). A β -ciclodextrina (β CD) possui uma cavidade relativamente hidrofóbica onde podem ser inseridos compostos não polares. Sua solubilidade é baixa (1,85 g/100 mL a 25°C) [29] e relativamente menor quando comparada a das outras formas (α e γ , por exemplo). Quando concentrações maiores de β CD devem ser usadas, podem ser adicionados aditivos (solventes orgânicos ou uréia) para melhorar a solubilidade. A utilização de 4 ou 8 mol/L de uréia, permite a preparação de 89 ou 226 mol/L de β CD, respectivamente [28]. As ciclodextrinas tem sido usadas com sucesso na química analítica para melhorar a seletividade da separação de isômeros geométricos e posicionais, e enantiômeros [30]. Em CE, elas são empregadas como aditivos de tampão para a análise de moléculas carregadas e não carregadas, com estruturas similares.

Figura 03: Estrutura química da α , β e γ -ciclodextrina.

2.3 - O conceito de mobilidade efetiva [26,31]

O parâmetro fundamental que governa as separações por CZE é a mobilidade eletroforética. Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero), e a base ou ácido conjugado (cada qual com um valor particular de mobilidade). Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica, o conceito de mobilidade eletroforética é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, na qual qualquer substância i presente em solução em diferentes formas j , relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva dada por:

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad [1]$$

onde: μ_j é a mobilidade iônica de cada espécie individual j
e α_j é a fração molar ou função de distribuição.

As funções de distribuição dependem da magnitude das constantes de dissociação do soluto (pK_a), e determinam a predominância relativa das várias espécies num intervalo de pH. Desta forma, a equação [1] sugere uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio.

2.4 - Determinação da mobilidade efetiva

Em eletroforese capilar em solução livre, o tempo de migração (t_i) de cada banda à posição do detector (L_{det}) é determinado pela velocidade aparente de migração da banda (v_i), que é a soma vetorial da velocidade eletroosmótica (v_{osm}) e eletroforética efetiva (v_{ef}) da substância:

$$v_i = \frac{L_{det}}{t_i} = v_{osm} + v_{ef} = (\mu_{osm} + \mu_{ef}) \frac{V}{L_{tot}} \quad [2]$$

onde μ_{osm} e μ_{ef} são as mobilidade eletroosmótica e eletroforética efetiva, respectivamente.

V é a voltagem aplicada

L_{tot} é o comprimento total do capilar.

A velocidade eletroosmótica pode ser determinada pela medida do tempo de migração de um composto neutro (t_{osm}), conhecido como marcador, de acordo com:

$$v_{osm} = \frac{L_{det}}{t_{osm}} \quad [3]$$

A combinação das expressões [2] e [3] fornece:

$$(\mu_{ef})_i = \frac{L_{det} L_{tot}}{(t_i - t_{osm}) V} \quad [4]$$

onde todos os parâmetros são mensuráveis experimentalmente ou conhecidos.

2.5 - Capilares

Os capilares utilizados em eletroforese capilar são fabricados com sílica fundida (uma forma pura de dióxido de silício amorfo). Este material confere aos capilares dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa

condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica e alta transmissão óptica para um intervalo apreciável do espectro (190 a 900 nm). Quimicamente, estes capilares são caracterizados pela presença de vários grupos silanol (SiOH) que tem caráter fracamente ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns destes grupos dissociam, tornando a superfície negativamente carregada [32] (Figura 04).

Vários procedimentos tem sido introduzidos para o controle da densidade de carga na parede do capilar, visando tanto o controle do fluxo eletroosmótico quanto a eliminação da interação soluto-capilar. O mais comum é o uso de capilares revestidos internamente, onde os grupos silanol são bloqueados quimicamente pela reação com ligantes polares do tipo organosilanos (trimetilclorosilano, γ -metacriloxipropil-trimetoxisilano), entre outros. O uso de agentes tensoativos catiônicos (como os alquil derivados dos sais de amônio) induz a desativação dinâmica, decorrente da adsorção física destes sais. A escolha adequada do tamanho da cadeia do tensoativo como sua concentração permite o controle direto da magnitude do fluxo eletroosmótico e mesmo a sua inversão [33].

Figura 04: Representação esquemática da parede do capilar.

Como as misturas dos analitos são injetadas diretamente no capilar de separação, sem válvulas ou conectores de coluna, o volume morto é drasticamente diminuído. Isto faz com que as perdas do analito para a superfície ou para o volume morto sejam reduzidas. Em contraposição a esta

grande vantagem, o pequeno volume de amostra do capilar (10-50 nL) faz com que o limite de detecção seja muito baixo, o que leva a um grande problema quando se deseja analisar soluções muito diluídas [3]. Em geral, para muitas aplicações, um aumento de sensibilidade é bastante desejável [34-36].

De acordo com a lei de Beer a absorbância óptica de uma amostra é diretamente proporcional ao caminho óptico através do qual a medida de absorbância é feita. Sendo assim, a extensão do caminho óptico deveria levar a um aumento da sensibilidade de detecção, porém, aumentando o diâmetro interno do capilar (i.d.), ocorre um aumento do efeito de aquecimento de Joule, levando a perdas na resolução dos picos. Uma alternativa para resolver este problema é expandir o comprimento do caminho óptico curvando o capilar num formato em Z (cela em Z ou de alta sensibilidade-HS) [34] (Figura 05).

Figura 05: Representação de um capilar normal e de uma cela de alta sensibilidade.

Vários desenhos de celas de fluxo incluem uma lente esférica de safira ou quartzo, posicionadas próxima ao capilar (**Figura 05**). Este tipo de configuração permite uma iluminação radial do centro do capilar, otimizando a luz que o atravessa e diminuindo a perda de luz nas paredes. A cela em Z é construída com uma lente esférica de quartzo e proporciona um aumento de caminho óptico de 3 mm [36].

Em qualquer geometria de cela, um volume finito do fluido está em contato com o detector a um dado tempo. De acordo com a lei de Beer, o ganho de sensibilidade num capilar de 50 μm de i.d. no formato em Z pode exceder um fator de 100 para um caminho óptico de 5 mm. Uma limitação deste tipo de formato é a perda da resolução das bandas migrantes. No pior dos casos, duas ou mais bandas separadas podem estar dentro do caminho óptico ao mesmo tempo e neste caso, a separação dos picos seria mostrada como uma banda contínua.

2.6 - Migração de ânions

Considere a introdução de uma amostra no capilar contendo solutos aniônicos. A análise sob fluxo eletroosmótico-EOF- normal (**Figura 6A**) (fluxo direcionado ao catodo, ou seja, polaridade positiva na extremidade do capilar onde é feita a injeção da amostra) só é possível no caso de ânions lentos, por exemplo aromáticos, cuja mobilidade é menor que a mobilidade eletroosmótica. Para os ânions rápidos ou moderadamente lentos (inorgânicos e carboxílicos alifáticos de cadeia curta), não é possível utilizar o fluxo eletroosmótico normal, pois eles deixarão a coluna após a injeção (assim que o campo elétrico for estabelecido) nunca atingindo o detector, cuja posição é fixa em um ponto no final da coluna.

A análise de ânions é normalmente realizada com a inversão da polaridade [27]. Para os ânions rápidos, porém, como eles migram em contra-fluxo, o tempo de análise pode ser consideravelmente longo. A adsorção de tensoativos catiônicos, seguida pela interação por dispersão entre as caudas (forças de London), permite o estabelecimento de uma estrutura bidimensional

(semi-micelas) na superfície, onde as cabeças positivas do tensoativo estão voltadas para a solução (**Figura 6B**). Desta forma, uma dupla camada elétrica constituída de ânions é então organizada na interface superfície-solução. Sob ação de um campo elétrico, uma parte dos ânions presentes na camada difusa sofre migração em direção ao anodo, sendo esta migração estendida a outras camadas da solução, fazendo com que a solução como um todo migre na direção do anodo, processo conhecido como fluxo eletroosmótico invertido [3]. Uma outra possibilidade é conduzir a separação de ânions sob fluxo eletroosmótico suprimido. Nesta situação, a separação é conduzida em capilares especiais, com revestimento interno, porém, o tempo de eluição é bastante longo quando comparado à análise sob fluxo invertido.

Figura 06: Representação esquemática da migração de ânions. (A) sob fluxo eletroosmótico normal e (B) invertido.

A análise por CZE de íons pode ser realizada com detecção indireta, sendo aplicada aos ânions inorgânicos ou orgânicos de baixa massa molecular, como também aos cátions. No caso dos ânions, o eletrólito de corrida é um cromóforo aniônico, cuja absorbância é monitorada continuamente. A escolha do eletrólito e a otimização das condições de análise é função do tipo de ânion a ser separado (se é rápido ou lento) [31].

3 – ESTRATÉGIAS PARA PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM ELETROFORESE CAPILAR

O uso dos capilares de sílica trouxe grandes vantagens para a eletroforese. A principal delas é que conferiu à técnica da eletroforese uma dimensão analítica e não somente preparativa, como quando feita em placas de gel. Os capilares proporcionam inúmeras vantagens, conforme discutido, porém seu uso também é responsável pela maior limitação da técnica: a baixa sensibilidade [2]. Embora a sensibilidade em massa (quando se utilizam detectores que respondam a massa – como os espectrômetros de massas, por exemplo) seja alta devido ao volume de detecção pequeno, a sensibilidade em concentração (quando se utilizam detectores que respondam a concentração – por exemplo, os detectores de absorbância na região do ultra-violeta) é baixa. Isto ocorre devido ao diminuto caminho óptico definido pelo diâmetro do capilar (entre 50 e 75 μm), associado ao pequeno volume de injeção (da ordem de nanolitros) [26]. Em eletroforese capilar, o limite de detecção (LOD) para detectores como o UV fica em torno de 10^{-6} mol/L, o que é de 10-100 vezes pior, quando comparado ao mesmo detector em HPLC [37].

A Tabela II apresenta os limites de detecção (LOD) típicos, em massa e em concentração, para alguns detectores utilizados em eletroforese.

Tabela II: Alguns esquemas de detecção em Eletroforese Capilar [2]

Método	Massa LOD (moles)	Concentração LOD (mol/L)
Absorbância (UV-Vis)	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$
Fluorescência	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$
Fluorescência induzida por laser	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-14} - 10^{-16}$
Amperometria	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$
Condutividade	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$
Espectrometria de Massas	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$

Várias estratégias tem sido descritas para melhorar a sensibilidade em eletroforese capilar [4,34,35]. Algumas delas são baseadas na concentração da amostra “on-column” durante ou após a injeção na coluna [38]. Estas estratégias são denominadas “stacking” e são baseadas nas diferenças de campo elétrico entre a banda da amostra e o tampão de corrida. Temos então:

- “Stacking” mediado por força iônica
- “Stacking” mediado por pH
- “Stacking” por injeção de grande volume ou preenchimento do capilar inteiro
- “Stacking” eletrocinético ou campo amplificado.

Estas estratégias são aplicadas quando se empregam os modos de eletroforese em solução livre (CZE), onde se utilizam tampões contínuos, ou

seja, o mesmo eletrólito que preenche o capilar também é usado como tampão de corrida. O emprego de sistemas tampões descontínuos também pode ser utilizado para realizar pré concentração de amostras. Esta estratégia é obtida no modo da isotacoforese capilar [39,40].

Outras estratégias de pré-concentração são baseadas nas diferentes geometrias do capilar que são modificadas a fim de melhorar o desenho da cela do detector [41]. Entre as estratégias de geometria de capilar, temos:

- Cela óptica de alta sensibilidade (ou cela em Z)
- Cela em bolha
- Capilar por multireflexão
- Cela retangular

Um outro grupo de estratégias utiliza a extração em fase sólida. Este grupo inclui os concentradores de analito específicos, os arranjos em capilares múltiplos, as membranas impregnadas com C18, dentre outros [35].

As estratégias para pré-concentração empregadas neste trabalho serão descritas em detalhes no capítulo IV.

4 – OBJETIVOS

Avaliar comparativamente as estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (“stacking” mediado por força iônica e em grande volume, amplificação de campo, isotacoforese, cela óptica de alta sensibilidade e extração em fase sólida em linha) utilizando dois sistemas químicos diferentes: ácido tereftálico (ânion) e besilato de atracúreo (cátion).

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] <http://www.neptune.net/~whatley/CA5.html>
- [2] Ewing, G.W. *Analytical Instrumentation Handbook*, Marcel Dekker Inc, New York, 2nd edition, 1997.
- [3] Altria, K.D. *Capillary Electrophoresis Guidebook. Principles, instrumentation, operation, and applications*, Methods in Molecular Biology, Series 52, Human Press, 1995.
- [4] Guzman, N.A. *Capillary Electrophoresis Technology* Chromatographic Science Series, Marcel Dekker; New York, 1993.
- [5] Camilleri, P. *Capillary Electrophoresis – theory and practice*, CRC Press, 1998.
- [6] Hjerten, S. Free zone electrophoresis, *Chromatogr. Rev.*, 9, 122, 1967.
- [7] Neuhoff, V.; Schill, W.B., Sternbach, H. Micro-analysis of pure deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase from escherichia coli, *Biochem. J.*, 1970, 117, 623.
- [8] Virtanen, R. Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection – a theoretical and experimental study, *Acta Polytech. Scand. Chem. Ind. Metall. Ser.*, 1974, 123, 1.
- [9] Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, T.P.E.M. High performance zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, 1979, 169, 11.
- [10] Jorgenson, J.; Lukacs, K.D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Anal. Chem.*, 1981, 53, 1298.

- [11] Hjertén, S. High-performance electrophoresis: the electrophoretic counter part of high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **1983**, 270,1.
- [12] Hjertén, S.; Zhu, M.D. Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, *J. Chromatogr.*, **1985**, 346, 265.
- [13] Terabe, S. *et al.* Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 111.
- [14] Hjertén, S. High-performance electrophoresis: elimination of eletroendosmosis and solute adsorption, *J. Chromatogr.*, **1985**, 347, 191.
- [15] Cohen, A S.; Karger, B.L. High-performance sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins, *J. Chromatogr.*, **1987**, 397, 409.
- [16] Knox, J.H.; Grant, I.H. Eletrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50 μm silica gels and ODS bonded silica gels, *Chromatographia*, **1991**, 32,7/8, 317.
- [17] Issaq, H.J. A decade of capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 1921.
- [18] Bruin, G.J.M. Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 3931.
- [19] Dolnik,V.; Liu, S.; Jovanovich, S. Capillary electrophoresis on microchip, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 41.
- [20] Lichtenberg, J.; Verpoorte, E.; Rooij, N.F. Sample preconcentration by field amplification stacking for microchip-based capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 258.

- [21] Giordano, B.C.; Copeland, E.R.; Landers, J.P. Towards dynamic coating of glass microchip chambers for amplifying DNA via the polymerase chain reaction, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 334.
- [22] Liu, Y. *et al.* Electrophoretic separation of proteins on microchips, *J. Microcolumn Sep.*, **2000**, 12, 407.
- [23] Jacobson, S.C. *et al.* High-speed separation on a microchip, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1114.
- [24] Cheng, J. *et al.* Analysis of ligase chain reaction products amplified in a silicon glass chip using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 732, 151.
- [25] Weinberger, R. *Practical capillary electrophoresis*, Academic Press, Inc., San Diego, USA, **1993**.
- [26] Tavares, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos, *Química Nova*, **1996**, 19, 173.
- [27] Tavares, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Química Nova*, **1997**, 20(5), 493.
- [28] Fanali, S.; Kilár, F. The utility of cyclodextrins in capillary electrophoresis, *J. Cap. Elec.*, **1994**, 001:1, 72.
- [29] Pharr, D.Y. *et al.* Solubilization of cyclodextrins for analytical applications, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 275.
- [30] Fanali, S. Use of ciclodextrins in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1991**, 545, 437.
- [31] Colombara, R. *et al.* Method development strategy for the analysis of anionic solutes by capillary electrophoresis, *J. Cap. Elec.* **1996**, 3, 147.

- [32] Tavares, M. F. M.; Colombara, R.; Massaro, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis: an evaluation of electrolyte systems for anion analysis, *J. Chromatogr.*, **1997**, 772,171.
- [33] Tavares, M.F.M.; McGuffin, V.L. Theoretical model of electroosmotic flow for capillary zone electrophoresis, *Anal.Chem.*, **1995**, 67, 3687.
- [34] Albin, M.; Grossman P.D.; Moring, S.E. Sensitivity enhancement for capillary electrophoresis, *Anal. Chem* **1993**; 65: 489A.
- [35] Tomlinson, A.J.; Guzman, N.A.; Naylor, S. Enhancement of concentration limits of detection in CE and CE-MS: A review of on-line sample extraction, cleanup, analyte preconcentration , and microreactor technology; *J. Cap. Elec.* **1995**, 2, 247.
- [36] Moring, S.E.; Reel, R.T.; van Soest, R.E.J. Optical improvements of a Z-shaped cell for high-Sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3454.
- [37] Heiger, D.N. *High Performance capillary electrophoresis: an introduction*, Copyright, Hewlett-Packard Company, France, **1992**.
- [38] Chien, R.; Burgi, D.S. On-column sample concentration using field amplification in CZE, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, n.8, 489 A.
- [39] Bocek, P. *et al. Analytical isotachophoresis*, Electrophoresis Library, VCH, **1988**.
- [40] Gebauer, P.; Bocek, P. Recent application and developments of capillary isotachophoresis, *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2154.
- [41] Bruin, G.J.M. *et al.* Optimization and evaluation of the performance of arrangements for UV detection in high-resolution separations using fused-silica capillaries, *J. Chromatogr.*, **1991**, 559, 162.

CAPÍTULO II
ÁCIDO TEREFTÁLICO

1 - ÁCIDO TEREFTÁLICO

Um dos principais ramos industriais da química é o segmento petroquímico. A partir do eteno (obtido da nafta derivada do petróleo ou diretamente do gás natural), a petroquímica dá origem a uma série de matérias-primas que permite ao homem fabricar novos materiais, substituindo com vantagem a madeira, peles de animais e outros produtos naturais [1]. O plástico e as fibras são duas importantes classes destes produtos sintéticos, muitos deles sendo derivados do ácido tereftálico e de seus ésteres.

O ácido tereftálico é a matéria-prima dos produtos de poliéster, sendo encontrado na composição de materiais tão diversos quanto pacotes de café, lençóis, maçanetas de carros, reforço interno de calçados, fitas cassetes e garrafas plásticas de refrigerantes. Aproximadamente 50% de todo ácido tereftálico purificado (PTA) são utilizados para produzir fibras de poliéster [2]. Outros 33% são empregados na produção de poli(etileno tereftalato) (PET), utilizado na produção de frascos para refrigerante. Em torno de 8% do PTA e/ou um de seus ésteres, o dimetil tereftalato (DMT), estão presentes na produção de filmes de poliéster para a indústria de fitas cassetes. Já o próprio ácido é utilizado na produção de *Kevlar* (marca registrada da DuPont), um material incorporado em equipamentos de navegação, estruturas de aeronaves e em vestimentas à prova de balas.

1.1 – Processo de obtenção

O ácido tereftálico é produzido a partir da oxidação do *p*-xileno em meio de ácido acético a altas temperaturas, utilizando catalisadores baseados em Co, Mn e Br (**Figura 07**) [3]. Durante o processo de oxidação são formados vários subprodutos que, se presentes no produto final, podem desacelerar o processo de polimerização do poliéster ou causar coloração indesejável (ex. a cor amarelada das garrafas plásticas de refrigerante). Este tipo de efeito é causado principalmente pela presença de ácidos monopróticos, como o ácido benzóico (BZ), ácido *p*-toluóico (pTOL) e o 4-carboxibenzaldeído (4-CBA). No ácido tereftálico cru (CTA), o teor de 4-CBA e pTOL é da ordem de 2000 ppm e

500 ppm, respectivamente, enquanto que no ácido tereftálico purificado (PTA), estes níveis baixam para 10-20 ppm e 100-200 ppm, respectivamente [3]. O teor de impurezas é ainda diminuído 100 vezes quando é feita a dissolução do PTA em meio alcalino, pois o PTA tem baixa solubilidade em água [4].

Apesar de ser conhecida uma gama grande de contaminantes do ácido tereftálico, talvez, por falta de metodologia apropriada, apenas os níveis de 4-carboxibenzaldeído e ácido p-toluico são efetuados industrialmente, utilizando-se técnicas polarográficas e cromatográficas em fase gasosa, respectivamente [5,6]. A desvantagem deste procedimento é que são empregadas duas metodologias independentes, o que consome tempo, demanda o uso de dois equipamentos distintos e ainda necessita de pessoal especializado em ambas as técnicas.

Figura 07: Representação esquemática da síntese do ácido tereftálico e as estruturas químicas dos seus principais subprodutos.

1.2 - Impurezas

As impurezas presentes no ácido tereftálico são formadas através de reações laterais durante a oxidação do *p*-xileno. A natureza destes subprodutos e sua possível presença como impurezas depende das condições de operação adotadas para a oxidação e o processo tecnológico empregado [3]. De acordo com a sua estrutura, estes subprodutos podem ser classificados nas seguintes classes: ácido benzóico e seus derivados, derivados bifenilas, derivados da fluorenona, derivados da benzofenona, derivados da antraquinona e ésteres aromáticos (Figura 08).

A análise das impurezas do ácido tereftálico por cromatografia líquida em fase-reversa é discutida em poucas publicações na literatura [7,8,9]. Em um destes artigos [8], os autores investigam a oxidação catalítica em fase líquida do *p*-xileno ao ácido tereftálico, monitorando os produtos e as impurezas através de um gradiente de eluição usando como fase móvel uma mistura de metanol:acetonitrila:água.

A eletroforese capilar tem sido empregada na avaliação de uma série de aldeídos [10] e ácidos policarboxílicos [11,12], mas poucos artigos que se referem especificamente ao ácido tereftálico e suas impurezas foram publicados [13].

IÔNICOS

4-CARBOXI
BENZALDEÍDO
(4-CBA) ÁCIDO
P-TOLUÍCO
(pTO) TEREFTALATO
DE METILA ÁCIDO
BENZÓICO (BZ) ÁCIDO
TRIMELÍTICO ÁCIDO
4-HIDROXIMETIL
BENZÓICO 4-HIDROXI-3-METIL
BENZALDEÍDO ÁCIDO
m-HIDROXIBENZÓICO ÁCIDO
ISOFTÁLICO ÁCIDO
4-BROMOBENZÓICO ÁCIDO
3-BROMO-4-METIL
BENZÓICO ÁCIDO
2-BROMOTEREFTÁLICO

Figura 08: Estrutura dos possíveis contaminantes do ácido tereftálico.

NEUTROS

METIL-4-METIL
BENZOATO DIMETIL
TEREFTALATO TEREFTALDEÍDO-MONO
(DIETIL ACETAL) METIL-4-FORMIL
BENZOATO METIL
BENZOATO

CUMENE

FLUORESCENTES

ÁCIDO 2-BIFENIL
CARBOXÍLICO ÁCIDO 4-BIFENIL
CARBOXÍLICO ÁCIDO 9-FLUORENONA
2-CARBOXÍLICO ÁCIDO 1-FLUORENO
CARBOXÍLICO ÁCIDO 9-FLUORENONA
4-CARBOXÍLICO

Figura 08: Estrutura dos possíveis contaminantes do ácido tereftálico. Continuação.

2 – OBJETIVOS

- Desenvolver uma metodologia simples e rápida para analisar simultaneamente os maiores contaminantes do ácido tereftálico (4-CBA, p-TOL e BZ) em lotes industriais de CTA e PTA por eletroforese capilar.
- Avaliar as técnicas de aumento de sensibilidade para análise do 4-CBA em ácido tereftálico altamente purificado.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos num equipamento de eletroforese capilar Modelo 270A-HT, (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Div., Foster City, CA, USA), equipado com um detector UV-Vis variável, ajustado em 200 nm, um sistema de controle de temperatura, mantido a 25°C e um sistema de aquisição e tratamento de dados (Turbochrom™, PE-Nelson, Cupertino, CA, USA). Um capilar comum de sílica fundida com dimensões: 75 µm i.d., 70 cm de comprimento total (50 cm até o detector) foi empregado nas análises de ácido tereftálico cru. Uma cela óptica de alta sensibilidade (LC Packings, Amsterdam, Holanda), que consiste de um capilar curvado em ângulo reto em forma de “Z”, com dimensões: 75 µm i. d., 70 cm comprimento total (50 cm ao detector), e 3 mm de caminho óptico foi utilizada para as análises de ácido tereftálico purificado.

3.2 - Soluções e padrões

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes com grau analítico (Aldrich/Sigma, St. Louis, MO, USA) e água deionizada ((Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Os solventes empregados nos testes de

solubilidade foram de pureza cromatográfica. Soluções estoque de 4-carboxibenzaldeído (Aldrich), ácido p-toluóico (Aldrich), ácido benzóico (Carlo Erba) e ácido tereftálico (Aldrich) foram preparadas na concentração de 100 mg/L cada em 0,15 mol/L de NaOH. Soluções de trabalho na faixa de concentração 0,5 a 30 mg/L foram preparadas por diluição apropriada dos estoques com água deionizada no momento da análise. Um padrão industrial de ácido tereftálico purificado (obtido da AMOCO) foi preparado na concentração de 10000 mg/L em 0,15 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Soluções tamponadas de ácido fosfórico (Merck) de concentração 20 mmol/L e pH variável entre 4 e 10 foram utilizadas nas medidas de mobilidade efetiva. O eletrólito empregado para a análise das amostras foi uma solução tampão de tetraborato de sódio decahidratado (Synth) a 20 mmol/L, pH 9. Como modificador de fluxo eletroosmótico foi utilizado brometo de cetiltrimetil amônio, CTAB (Aldrich) na concentração de 0,1 mmol/L. Como marcador do fluxo eletroosmótico foi utilizado óxido de mesitila (Aldrich) (10^{-3} mol/L).

3.3 - Amostras

Amostras de lotes industriais de ácido tereftálico cru e purificado, obtidos da Tereftalatos Mexicanos (TEMEX), foram preparadas na concentração de 5000 mg/L e 10000 mg/L, respectivamente, em solução de NaOH 0,15 mol/L, no momento da análise para evitar decomposição.

Para os testes de “stacking” foi utilizada uma amostra de PTA ($m = 0,1g$) adicionada a 10 mL de etanol e deixada no ultra som durante 30 minutos, sendo a seguir filtrada e injetada.

3.4 - Contaminantes do ácido tereftálico

Alguns dos compostos padrões para identificação das impurezas em ácido tereftálico foram comprados da Aldrich e outros obtidos por doações em laboratórios do Instituto de Química. Como na síntese do ácido tereftálico são utilizados catalisadores que podem ser à base de bromo (Figura 07), podem ocorrer compostos bromados nos contaminantes do ácido tereftálico [3]. Alguns destes possíveis compostos bromados foram sintetizados no laboratório

de Síntese Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP), pelo Prof. Bronislaw Polakiewicz. Inicialmente tentou-se preparar o ácido 2-bromotereftálico, o ácido 3-bromo-4-metilbenzóico e o ácido 4-bromobenzóico a partir do ácido tereftálico (TA), ácido p-toluóico e ácido benzóico, respectivamente. Foram preparados 10 mL de solução (de concentração 1000 mg/L) de cada composto em etanol (EtOH) e em ácido acético (HAc). As soluções foram levadas ao ultrassom por 5-10 min para dissolver e foi feita nova diluição a 100 mg/L (volume final de 10 mL). Como o ácido tereftálico é fracamente solúvel nestes solventes [4], foram preparadas também soluções de concentração 5000 e 10000 mg/L, deixadas no ultrassom por 20 min, filtradas e utilizadas. As soluções foram bromadas nas proporções 1:1 [solução dos compostos: solução de bromo (1mL de Br₂ em 10 mL de HAc)], 1:2 e em excesso de bromo. A solução de bromo foi adicionada sob agitação constante e a solução permaneceu em repouso por 24 horas sendo injetada a seguir.

As soluções dos contaminantes foram preparados na concentração de 100 mg/L. A **Tabela III** lista os contaminantes testados neste trabalho.

Tabela III: Alguns contaminantes do ácido tereftálico testados. As estruturas químicas correspondentes estão apresentadas na **Figura 08**.

	IÔNICOS	NEUTROS
1	4-Carboxibenzaldeído	Cumeno
2	Ácido p-toluóico	Dimetil tereftalato
3	Ácido benzóico	Metil 4-metil benzoato
4	4-Hidroxi 3-metil benzaldeído	Tereftalaldeído mono dietil acetal
5	Ácido 4-Hidroximetil Benzóico	Metil 4-formil benzoato
6	Ácido m-hidroxibenzoico	
7	Ácido p-metil hidroxibenzóico	
8	Ácido 3-bromo-4-metil benzóico	
9	Ácido 2-bromo tereftálico	

3.5. Procedimento Analítico

Soluções novas de eletrólito foram preparadas diariamente e filtradas em filtro de membrana de poro 0.22 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). No início do dia, o capilar era condicionado com uma solução de NaOH (1 mol/L) durante 30 min, seguido de uma lavagem com água deionizada (10 min) e eletrólito (30 min). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão de 5 inch-Hg. O sistema foi operado sob voltagem constante e, após cada corrida, o capilar era lavado com eletrólito (2 min).

4 - RESULTADOS

4.1. Testes de Solubilização

No ácido tereftálico de origem industrial, os níveis de 4-CBA e pTOL são de 10-20 ppm e 100-200 ppm ($\text{g}/10^6 \text{ g}$ do contaminante no produto sólido), respectivamente. No entanto, a análise das impurezas em PTA é dificultada pela baixa solubilidade deste em água [4]. Assim, se faz necessária a adição de quantidades elevadas de solução concentrada de hidróxido de sódio. Neste processo de solubilização, as impurezas são diluídas por um fator de 100, ou seja, uma solução alcalina de ácido tereftálico a 10000 mg/L contém aproximadamente 0,1-0,2 mg/L de 4-CBA e 1-2 mg/L de pTOL. Desta maneira, a determinação de 4-CBA é prejudicada, uma vez que os teores deste composto se encontram a níveis de traço. Outra observação relevante é que capilares de sílica são atacados por soluções fortemente alcalinas. Assim sendo, a injeção continuada de amostras de ácido tereftálico pode vir a causar deterioração rápida da coluna, com formação de incrustações, e ocasionalmente, falta de reprodutibilidade das áreas e/ou alturas dos picos, afetando os resultados analíticos [14].

Visando encontrar uma condição mais favorável para a preparação da amostra, uma quantidade de 0,1 g de PTA foi dissolvida em 10 mL de solvente e submetida a 10 min no ultra-som. Foram testados metanol, etanol, acetonitrila, tetrahidrofurano e uma solução de tetraborato de sódio na concentração de 20 mmol/L, porém, na concentração em que rotineiramente era preparado para análise (10000 mg/L), o ácido tereftálico purificado não foi solúvel em nenhum dos solventes estudados.

4.2 - Otimização das condições de análise

Um dos parâmetros mais simples a ser otimizado na detecção direta de substâncias a nível de traço é o comprimento de onda. A **Figura 09** apresenta os espectros de absorção de duas impurezas, 4-CBA e pTOL, encontradas no ácido tereftálico industrial. Em ambos os espectros, muito embora exista uma

absorção apreciável relacionada à presença do anel aromático (entre 220-280 nm) o comprimento de 200 nm pareceu ser o mais adequado para análise.

Figura 09: Espectros de absorção no UV-Vis do (A) pTOL e do (B) 4-CBA.

Outro parâmetro importante em uma análise eletroforética de substâncias que apresentam caráter ácido-base é o pH, pois o pH altera a distribuição das espécies em equilíbrio e, portanto, a mobilidade efetiva da substância [14]. A **Figura 10** apresenta curvas experimentais de mobilidade efetiva *versus* pH para os contaminantes de interesse. A mobilidade efetiva foi determinada pelas medidas experimentais do tempo de migração dos compostos em questão e do marcador, óxido de mesitila, além dos parâmetros instrumentais conhecidos, dimensões do capilar e voltagem aplicada. Curvas desse tipo são excelentes indicadores da condição de pH mais propícia para a separação ocorrer, ou seja, o pH onde as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos são maximizadas. No caso, os compostos apresentaram um comportamento bastante semelhante no intervalo de pH estudado. Assim sendo, escolheu-se trabalhar em pH elevado (fluxo eletrosmótico alto), onde o tempo de análise era bem menor. Foi escolhido então o tampão de tetraborato de sódio (pH 9).

Figura 10: Curva de mobilidade efetiva *versus* pH para alguns contaminantes do ácido tereftálico de fabricação industrial.

A análise eletroforética de pequenos ânions derivados do ácido carboxílico está bem estabelecida na literatura [15], e pode ser conduzida de diversas maneiras. Geralmente este tipo de separação é realizado sob polaridade reversa e fluxo eletroosmótico invertido [16]. Contudo, também é possível conduzir a separação sem fluxo invertido, porém, desta maneira se consome um longo tempo de análise [17]. A **Figura 11 A** apresenta o eletroferograma de uma amostra de CTA registrado sob fluxo invertido e polaridade negativa, enquanto que a **Figura 11 B** apresenta a situação de análise sob fluxo normal e polaridade positiva na extremidade da injeção. Note que a ordem de eluição foi dependente do tipo de análise empregada. No caso da análise sob fluxo invertido e polaridade negativa, o ânion de maior mobilidade (no caso o próprio tereftalato que possui duas cargas negativas) eluiu na frente de todos. Na análise sob fluxo normal e polaridade positiva a situação se inverteu. Como a componente de velocidade eletroforética do ânion se opõe à do fluxo, o ânion de maior mobilidade resiste mais e foi arrastado por último [15]. A escolha do modo de análise foi diretamente relacionada com a forma assimétrica do pico do ácido tereftálico, que apresenta uma cauda pronunciada em meio de tampão tetraborato/CTAB, em razão de sua elevada concentração. Embora o tempo de análise sob fluxo invertido fosse mais favorável, os contaminantes do ácido tereftálico eluíram na cauda do tereftalato, dificultando sua identificação e quantificação. As condições

experimentais poderiam ser otimizadas para expandir a janela de eluição e talvez obter todas as impurezas de interesse separadas do pico do ácido tereftálico. Contudo, qualquer mudança nas condições de separação, empregando o tampão escolhido, resultaria num tempo de análise maior, e ainda assim, se a separação não fosse completa, o efeito da cauda do pico do tereftalato comprometeria a quantificação das impurezas. Já na análise sob fluxo normal (utilizando o tetraborato de sódio como eletrólito), os ácidos monocarboxílicos eluíram antes do ácido tereftálico. Esta situação foi favorecida pela forma aguda do início da banda do pico do tereftalato. Neste caso, a janela de eluição, compreendida entre o início da corrida e o início da banda do ácido tereftálico, poderia ser manipulada facilmente (por exemplo, diminuindo a concentração da amostra e/ou aumentando a concentração do tampão) para encontrar a separação completa das impurezas de interesse.

Figura 11: Comparação da análise de ácido tereftálico cru (CTA) sob: (A) fluxo eletroosmótico invertido e (B) fluxo eletroosmótico normal. Condições: (A) 20 mmol/L tetraborato/0,2 mmol/L de CTAB, pH 9; -30 kV, injeção (1s, 169 mBar), detecção 200 nm; concentração do CTA: 10000mg/L em 0.15 mol/L de NaOH; (B) 20 mmol/L tetraborato, +30 kV, outras condições como em (A). Legenda: 1- pico do sistema, 2- ácido 4-hidroximetilbenzóico, 3- ácido *p*-toluóico, 4- 4-carboxibenzaldeído, 5- ácido benzóico, 6,7,8,9- impurezas desconhecidas, 10- ácido tereftálico.

Foram otimizadas as condições de voltagem, concentração do tampão e tempo de injeção. A variação da voltagem aplicada foi testada para a amostra de PTA (com tempo de injeção de 1 segundo) a 15, 20, 25 e 30 kV. Quanto maior a voltagem aplicada, mais rápida é a análise. Como não houve variação no perfil dos eletroferogramas em relação à voltagem aplicada, optou-se por realizar as análises no menor tempo com uma voltagem de 30 kV. Foram testadas as concentrações de tampão tetraborato a 20, 40 e 60 mmol/L. Quanto maior a concentração do tampão, menor é o fluxo eletroosmótico e mais demorada a análise, no entanto, consegue-se uma melhor separação dos compostos [18]. Nas concentrações de 40 e 60 mmol/L, a janela para análise dos contaminantes entre o solvente e o ácido tereftálico era bem maior, porém, a alta corrente gerada produzia uma sobrecarga constante no equipamento e

este desligava-se automaticamente. Optou-se então por utilizar-se uma concentração de tetraborato de sódio a 20 mmol/L. Nesta concentração, as impurezas de interesse eram visualizadas e o tempo de análise era menor. Foram testados os tempos de injeção de 1, 2,5 e 5 segundos para a amostra de PTA a 10000 mg/L. Numa análise de ânions sob fluxo eletroosmótico normal, os ânions com carga -1 (no caso, os contaminantes) chegam primeiro ao detector e os ânions com carga -2 (no caso, o ácido tereftálico) chegam posteriormente [16]. O aumento do tempo de injeção também aumenta a largura dos picos e assim como os picos dos contaminantes são aumentados, o do ácido tereftálico também é. Ocorre então que o pico do ácido tereftálico, ao alargar-se, encobre os picos dos contaminantes. Optou-se então por se conduzir a análise com um tempo de injeção de 1 segundo, o qual possibilitou visualizar o maior número de contaminantes do PTA nesta concentração. Tempos inferiores a 1 segundo de injeção também foram testados, mas a sensibilidade da análise nas condições estudadas foi muito baixa.

4.3. – Identificação de componentes

Como os subprodutos do ácido tereftálico podem ser gerados através de sua oxidação incompleta, suspeitou-se que o pico n.9 (**Figura 11**) poderia ser de um monoéster ou de um composto bromado, pois se empregam catalisadores à base de bromo no processo industrial. Foram analisados então vários padrões de compostos que, segundo a literatura [3], poderiam estar presentes como impurezas no ácido tereftálico industrial (**Tabela III**).

As **Figuras 12-14** mostram a separação de alguns dos possíveis contaminantes do ácido tereftálico. A **Figura 12** mostra a separação dos padrões dos compostos iônicos analisados. Podemos notar que ocorreram duas coeluições com os picos do pTOL e do 4-CBA (picos 3-4 e 5-6). Estas coeluições não significam que estes dois compostos (que estão eluindo na mesma região do pTOL e do 4-CBA) estejam presentes no ácido tereftálico industrial. Este fato também não afeta a quantificação destas impurezas no ácido, uma vez que tanto o pTOL quanto o 4-CBA são analisados e quantificados industrialmente por outras técnicas diferentes de CE, e os

resultados são consistentes. Foram estudadas outras condições de voltagem e concentração de tampão para tentar separar os picos coeluidos, mas a separação destes não foi obtida. Dois dos compostos bromados (sintetizados) também foram analisados (**Figura13**), mas nenhum deles correspondeu ao pico desconhecido (n.9 da Figura 11).

Figura 12: Separação da mistura dos compostos iônicos. Condições: tampão borato 40 mmol/L, injeção 1s, 169 mBar, detecção 200 nm, temperatura: 25°C, voltagem de corrida + 25 kV. Legenda: 1) ácido 4-hidroxi-metil benzóico 2) 4-hidroxi 3-metil benzaldeído, 3) ácido p-toluóico, 4) ácido p-metil hidroxibenzóico, 5) metil 4-formil benzoato, 6) 4-carboxibenzaldeído, 7) ácido benzóico, 8) ácido m-hidroxibenzóico.

Figura 13: Separação da mistura dos compostos bromados. Condições: tampão borato 40 mmol/L, injeção 1s, 169 mBar, detecção 200 nm, temperatura: 25°C, voltagem de corrida + 25 kV. Picos: 1) ácido 3-bromo-4-metil benzóico e 2) ácido 4-bromo benzóico, 3) ácido 2-bromo tereftálico.

A **Figura 14** mostra a separação dos compostos iônicos e neutros analisados por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). Ocorreu uma melhor separação dos compostos iônicos nesta condição, mas as coeluições dos compostos 3,4 e 5,6 ainda continuaram. O tempo de migração foi aumentado devido às interações dos compostos com as micelas. A comparação dos tempos de migração dos compostos neutros mostrou que os mesmos eluíram na região do 4-CBA e também não coincidiram com o pico de interesse.

Apesar de terem sido estudados um número apreciável de compostos, infelizmente o pico n.9 não pode ser identificado com os padrões disponíveis.

Figura 14: Separação dos padrões de compostos iônicos e neutros em MEKC. Condições: tampão tetraborato 20 mmol/L + 20 mmol/L de SDS, injeção 1s, 169 mBar, detecção 200 nm, temperatura: 25°C, voltagem de corrida +20 kV. Legenda: 1) ácido 4-hidroxi-metil benzóico 2) 4-hidroxi 3-metil benzaldeído, 3) ácido p-toluóico, 4) ácido p-metil hidroxibenzóico, 5) metil 4-formil benzoato, 6) 4-carboxibenzaldeído, 7) Ácido benzóico, 8) ácido m-hidroxibenzóico, 9) cumeno, 10) dimetil tereftalato, 11) tereftaldeído mono dietilacetal, 12) metil 4-metil benzoato.

4.4 - Análise do CTA

Como nas amostras de CTA, o teor de 4-CBA é elevado, uma quantidade menor de amostra foi pesada. Esta diluição por um fator de dois, permitiu a resolução entre o 4-CBA e o pTOL e as impurezas puderam ser melhor visualizadas para tratamento quantitativo. A **Figura 15** apresenta o eletroferograma de uma amostra típica de CTA preparada a 5000 mg/L, nas condições otimizadas. Ao lado do 4-CBA e do pTOL, o ácido 4-hidroximetilbenzóico (HMB) e o ácido benzóico (BZ) (picos 2 e 5, respectivamente) foram identificados no eletroferograma. As impurezas menores (picos 6, 7 e 8) observadas na condição prévia (**Figura 11**), diminuíram consideravelmente após a diluição, e não são vistas nesta condição. A diluição da amostra também diminuiu a largura da base do pico do ácido tereftálico, o que afetou o tempo de migração de todos os picos.

Figura 15: Eletroferograma de uma amostra típica de ácido tereftálico cru de fabricação industrial. Condições: tampão de tetraborato de sódio 20 mmol/L, (pH 9,0), +30 kV, injeção (1s, 169 mBar), 200 nm; concentração do CTA: 5000 mg/L em 0.15 mol/L de NaOH. Legenda: *vide* Figura 11.

Eletroferogramas de soluções padrão de ácido *p*-toluóico, 4-carboxibenzaldeído, ácido benzóico e ácido tereftálico, na faixa de concentração entre 0,080 – 3,5 mg/L foram registrados e curvas de calibração construídas. A **Tabela IV** apresenta os parâmetros estatísticos das curvas de calibração utilizadas na avaliação dos limites de detecção para os padrões

acima, analisados em um capilar de 75 μm de diâmetro interno. O critério usado para cálculo do limite de detecção (LOD) foi baseado no valor da concentração (y) obtida somando-se a intersecção (y_B) e 3 vezes a estimativa do desvio padrão da intersecção (S_B) [19]. Vale a pena mencionar que o limite de detecção obtido desta forma é simplesmente um parâmetro da curva de calibração e, portanto depende do intervalo de concentração escolhida para os padrões.

Tabela IV: Parâmetros estatísticos das curvas[#] de calibração usadas no cálculo dos limites de detecção para o ácido tereftálico e suas impurezas em capilar regular de 75 μm .

COMPOSTO	INCLINAÇÃO	INTERSECÇÃO	R^2	S_B	LIMITE DE DETECÇÃO ^{##} (mg/L)
Ácido <i>p</i> -toluóico	7377,4	- 33,3	0,998	601,3	0,24
4-Carboxi benzaldeido	2591,6	- 74,9	0,997	264,1	0,31
Ácido benzóico	3212,4	- 71,7	0,998	246,6	0,23
Ácido teretálico	5739	- 312,2	0,995	715,9	0,37

[#] intervalo de concentração: 0,080 – 3,5 mg/L; baseado na área do pico.

^{##} calculado por interpolação: $y - y_B = 3s_B$, onde y_B é a intersecção e s_B é o erro associado com a estimativa da intersecção.

A **Tabela V** apresenta a quantificação para 5 lotes de ácido tereftálico cru, mostrando a comparação entre a análise por CE e os dados analíticos da Tereftalatos Mexicanos (TEMEX) para o 4-CBA, usando polarografia. Podemos observar que os níveis de 4-CBA analisados pelo método descrito estão próximos aos obtidos pela TEMEX (Tereftalatos Mexicanos), embora ligeiramente maiores (20%). A TEMEX não realizou análises do pTOL nestes lotes na época e não dispomos então de dados para comparação deste composto. Os níveis de ácido benzóico encontrados são parecidos com os de 4- CBA.

Tabela V: Análise do ácido tereftálico cru segundo a metodologia otimizada usando capilar de sílica (75 μm).

AMOSTRA	pTOL (ppm) CE [#]	4-CBA (%)			BZ (ppm) CE [#]
		CE [#]	TEMEX ^a	Desvio ^{##} %	
A	303 $\pm$ 13	0,312 $\pm$ 0,003	0,278	12	202 $\pm$ 13
B	147 $\pm$ 23	0,166 $\pm$ 0,002	0,139	19	252 $\pm$ 12
C	231 $\pm$ 3	0,283 $\pm$ 0,007	0,252	12	268 $\pm$ 11
D	221 $\pm$ 23	0,307 $\pm$ 0,016			296 $\pm$ 77
E	380 $\pm$ 4	0,220 $\pm$ 0,001			61 $\pm$ 6

[#] 3 medidas

^{##} calculado como diferença entre os valores da TEMEX e CE relativo ao valor da TEMEX.

^apolarografia

ppm em g do contaminante/ 10^6 g do produto sólido; portanto, valores de ppm e % se referem à razão da massa do contaminante/massa do produto.

4.5 - Análise do PTA

A **Figura 16-A** apresenta o eletroferograma de uma amostra típica de PTA analisado em capilar normal. Podemos observar que a proporção relativa das impurezas está alterada em relação ao observado para o produto cru, sendo o 4-CBA dificilmente visualizado. Foi necessário pesar uma quantidade maior de PTA, uma vez que o teor de 4-CBA no composto puro é muito inferior ao teor no produto cru, o que confirma que a purificação industrial foi eficiente na remoção deste composto. Qualquer tentativa para melhorar a área do pico do 4-CBA, seja aumentando a concentração ou injetando um grande volume de amostra comprometeria a resolução entre os picos. Uma maneira de melhorar a sensibilidade, sem manipular a concentração da amostra, foi usar uma cela óptica de alta sensibilidade, cela HS (discutida na Introdução) [20]. A **Figura 16-B** mostra o eletroferograma da mesma amostra de PTA analisada em cela HS. O aumento proporcionado por esta cela já foi suficiente para que a análise fosse efetuada e foi possível identificar e quantificar as impurezas menores, incluindo o 4-CBA.

Figura 16: Análise de uma amostra industrial de ácido tereftálico altamente purificado realizada em (A) capilar normal de 75 μm (i.d.) e (B) cela HS. Condições: tampão de tetraborato de sódio 20 mmol/L, (pH 9,0), +30 kV, injeção (1s, 169 mBar), 200 nm; concentração do PTA: 10000 mg/L em 0.15 mol/L de NaOH. Legenda: *vide* Figura 11.

Foram preparadas soluções padrões de 4-CBA, pTOL e BZ na faixa de concentração entre 0,080 – 1,00 mg/L e construída a curva de calibração. Os resultados são apresentados na **Tabela VI**. Os critérios para os cálculos do LOD na HS foram os mesmos utilizados na análise do produto cru (CTA) em capilar normal. Quando a cela HS foi usada os LOD diminuíram por um fator de 10. Como os níveis esperados para o 4-CBA no PTA estão no intervalo de 10 a 20 ppm (w/w), os quais correspondem a 0.10 a 0.20 mg/L na amostra injetada (devido à baixa solubilidade do ácido tereftálico em água, as impurezas são diluídas por um fator de 100, durante a preparação da amostra), a determinação do teor de 4-CBA em amostras de PTA não pode ser realizada em capilares comuns. Note que o LOD para 4-CBA, em capilar normal, era de 0.31 mg/L (**Tabela IV**). Então, para as propostas quantitativas, torna-se necessário o uso da cela HS.

Tabela VI. Parâmetros estatísticos das curvas[#] de calibração usadas no cálculo do limite de detecção para as impurezas do ácido tereftálico na cela HS.

COMPOSTO	INCLINAÇÃO	INTERSECÇÃO	R ²	S _B	LIMITE DE DETECÇÃO ^{##} (mg/L)
Ácido <i>p</i> -toluóico	76338,7	- 126,1	0,9998	553,6	0,022
4-Carboxi benzaldeido	53076,4	- 20,3	0,9995	610,5	0,034
Ácido benzóico	49834,7	26,4	0,9997	444,0	0,027

[#] intervalo de concentração: 0,080 – 1,00 mg/L; baseado na área do pico.

^{##} calculado por interpolação: $y - y_B = 3s_B$, onde y_B é a intersecção e s_B é o erro associado com a estimativa da intersecção.

A **Tabela VII** mostra os resultados de uma análise utilizando cela HS para 4 lotes de PTA fornecidos pela TEMEX (Tereftalatos Mexicanos). Os resultados correspondentes da TEMEX para o 4-CBA e pTOL são também apresentados e comparados aos dados por CE. As análises por CE foram conduzidas com um padrão de calibração (AMOCO), do qual os níveis de impurezas estão mostrados na **Tabela VII**. Os níveis de ácido benzóico no padrão industrial AMOCO não foram fornecidos, mas foram determinados eletroforeticamente em relação a um padrão puro (Sigma). Os resultados não apresentaram grandes diferenças para os lotes industriais. Podemos observar que o erro relativo em relação aos dados fornecidos pela TEMEX estão em torno de 20 % para os lotes investigados, mas para uma comparação mais confiável seria necessário analisar um número maior de amostras.

Tabela VII. Análise do ácido tereftálico purificado segundo a metodologia otimizada usando cela HS.

AMOSTRA	CE [#]	pTOL (ppm)		CE [#]	4-CBA (ppm)		BZ (ppm)
		TEMEX ^a	Desvio ^{##} %		TEMEX ^b	Desvio ^{##} %	
A	101 ± 4	124	18,7	15,5 ± 2,5	15,2	-2,17	6,61 ± 0,23
B	134 ± 3	155	13,5	17,5 ± 1,4	15,3	-14,6	6,54 ± 0,34
C	131 ± 2	113	-15,7	29,4 ± 3	24,9	-18,0	5,73 ± 0,59
D	91 ± 2			6,04 ± 0,93			6,27 ± 0,35

Padrão de calibração (AMOCO) : pTOL = 122 ppm ; 4-CBA = 20,5 ppm; BZ = 8,2 ppm.

[#] 3 medidas, baseadas na área do pico

^{##} calculado como diferença entre os valores da TEMEX e CE relativo ao valor da TEMEX.

^a cromatografia gasosa

^b polarografia

Para caracterizar a metodologia por CE em cela HS, foram realizados estudos de reprodutibilidade de tempo de migração, área e altura de pico para 10 injeções consecutivas de uma amostra de PTA. Foi feita uma análise com um ponto de calibração (padrão certificado AMOCO disponível), e comparado com a análise deste lote efetuada pela TEMEX. Estes experimentos mostraram 0,52 % de reprodutibilidade no tempo de migração ($7,999 \pm 0,042$ min), 4,8 % de reprodutibilidade na área do pico e 2,4 % de reprodutibilidade para a altura do pico do pTOL, e 0,51 % no tempo de migração ($8,262 \pm 0,043$ min), 14,8 % na área do pico e 7,4 % na altura do pico para o 4-CBA. Os resultados indicam uma reprodutibilidade bastante boa dos tempos de migração, mostrando que não há necessidade de lavagem da coluna com hidróxido de sódio entre injeções consecutivas. A reprodutibilidade da análise baseada em altura de pico é em geral melhor que a feita com base na área do pico. O desvio padrão na análise de 4-CBA é maior porque este contaminante se encontra em concentração inferior ao pTOL. Esta amostra também foi usada na comparação entre a metodologia proposta por CE e as metodologias implementadas previamente pela TEMEX (**Tabela VIII**). Os resultados estatísticos indicam que para ambas as impurezas, as três técnicas são igualmente precisas. Tomando como referência os resultados de análise dos métodos utilizados na fábrica, em termos de exatidão, a análise baseada em altura de pico favorece os resultados para o 4-CBA, enquanto que a área de pico favorece os resultados para o pTOL.

Tabela VIII: Avaliação comparativa das impurezas do ácido tereftálico altamente purificado empregando metodologias diferentes.

TÉCNICA	PTOL (ppm)		4-CBA (%)	
	MÉDIA	DESVIO	MÉDIA	DESVIO
Cromatografia gasosa [#]	155	16,0		
Polarografia [#]			15,4	1,5
Eletroforese capilar ^{##}	150	7,0	14,0	2,0
t-test	0,910		1,33	
F-test		5,22		1,78

[#]4 medidas

^{##}10 medidas

Valores tabelados [16]:

t-parâmetro (95% CL) = 1,80

F-parâmetro (pTOL) = 3,86; F-parâmetro (4-CBA) = 8,81

4.6 - Estratégias de aumento de sensibilidade

Como não foi possível quantificar o teor de 4-CBA em PTA utilizando capilar normal de sílica devido ao valor do LOD (**Tabela IV**), foram estudadas alternativas para aumentar a sensibilidade de detecção em capilar normal.

Os estudos de reprodutibilidade mostraram que a cela HS era adequada para a quantificação de 4-CBA, porém, ela tem algumas desvantagens: o preço é excessivo, tem uma grande facilidade de quebra e podem ocorrer entupimentos quando se trabalha com amostras muito contaminadas, não filtradas corretamente, ou eletrólitos concentrados.

Várias alternativas foram testadas visando conduzir a análise do ácido tereftálico em capilares normais para diminuição do custo de análise, mas os resultados não foram satisfatórios. A principal dificuldade em testar as estratégias de pré-concentração baseadas no "stacking" para as amostras de PTA é que o PTA não é solúvel em água e todas as estratégias de aumento de sensibilidade baseadas na concentração em linha da amostra necessitam que a amostra esteja dissolvida em um meio de baixa condutividade. A adição de NaOH produzia um meio de alta condutividade que inviabilizava a aplicação de todas estas estratégias.

Como o objetivo principal deste trabalho era pesquisar as estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar e como o ácido tereftálico não se mostrou adequado, nós optamos por trocar a amostra por uma outra que também fosse de interesse industrial, mas que fosse solúvel em água. Neste contexto, avaliamos alguns compostos farmacêuticos, entre eles, o besilato de atracúreo e o α -anfentanil, para encontrar uma amostra onde fosse de interesse o aumento de sensibilidade para detectar contaminantes a nível de traços e que ao mesmo tempo possibilitasse o estudo comparativo das estratégias de pré-concentração por CE. O besilato de atracúreo foi então escolhido.

5 - CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou a viabilidade da determinação de impurezas em ácido tereftálico de fabricação industrial por eletroforese capilar. As impurezas no produto cru puderam ser analisadas em capilares de diâmetro normal (75 μm) enquanto que no produto purificado, elas foram quantificáveis em capilares especiais (cela de alta sensibilidade). A vantagem da metodologia proposta sobre os métodos adotados nos laboratórios de controle de qualidade industrial (cromatografia gasosa e a polarografia) foi a possibilidade de determinar simultaneamente todos os contaminantes relevantes utilizando uma única técnica com um tempo de análise substancialmente menor (menos que 7 min).

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] <http://www.abiquim.org.br/quim1.htm>
- [2] <http://www.cheminfotech.com/PEP>
- [3] Roffia, P.; Calini, P.; Motta, L.; Tonti, S. Byproduct identification in the terephthalic acid production process and possible mechanisms of their formation, *Ind. Eng. Chem. Res. Dev.*, **1984**, 23, 629.
- [4] *The Merck Index*, 7. ed., Rahway, **1960**.
- [5] Koshy V.J. *et al.* Investigations on intermediate acetal formation during polarographic estimation of certain benzaldehyde derivatives, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 307(1), 55.
- [6] Uno, B.; Okumura, N.; Kawai, S. Reversed-phase high performance liquid-chromatographic behavior of phthalic acid and terephthalic acid in the pH region around the second pKa values, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1994**, 67, 3356.
- [7] Viola, A.; Cao, G. Rapid direct analysis of p-xylene oxidation products by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chrom. Science*, **1996**, 34, 27.
- [8] Cao G. *et al.* kinetics of p-xylene liquid-phase catalytic oxidation, *AIChE. J.*, **1994**, 40, 1156.
- [9] Cao G.; Pisu M.; Morbidelli M. A lumped kinetic model for liquid-phase catalytic oxidation of p-xylene to terephthalic acid, *Chem. Eng. Sci.*, **1994**, 49, 5775.

- [10] Pereira, E.A.; Cardoso, A.A.; Tavares, M.F.M. Alternative methodologies for the determination of aldehyde by capillary electrophoresis, *J. AOAC International*, **1999**, 82, 1562.
- [11] Buchberger, W.; Winna, K. Optimization of separation of polycarboxylic acids by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1996**, 739, 389.
- [12] Jones, W.R.; Jandik. Various approaches analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis, *P. J. Chromatogr.*, **1992**, 608, 385.
- [13] Moraes, M.L.L. *et al.* Analysis of impurities in crude and highly-purified terephthalic acid by capillary electrophoresis, *Anal.Quim.Acta*, submetido.
- [14] Tavares, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos, *Química Nova*, **1996**, 19, 173.
- [15] Jandik, P.; Bonn, G. *Capillary electrophoresis of small molecules and ions*, VCH Publishers, Inc., New York, **1993**.
- [16] Colombara R. *et al.* Method development strategy for the analysis of anionic solutes by capillary electrophoresis, *J. Cap. Elec.*, **1996**, 3, 147.
- [17] Tindall G.W.; Perry R.L. Separation of fast anions by capillary electrophoresis without flow reversal, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 696, 349.
- [18] Altria, K.D. *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, instrumentation, operation, and applications*; Methods in Molecular Biology, Series 52; Human Press, **1995**.
- [19] Leite, F. *Validação em análise química*, Átomo, **1998**.
- [20] Moring, S.E.; Reel, R.T.; van Soest, R.E.J. Optical Improvements of a Z-shaped cell for high-sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3454.

CAPÍTULO III
BESILATO DE ATRACÚREO

1 - AGENTES BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES

Os agentes bloqueadores neuromusculares são drogas potentes comumente administradas em conjunto com anestésicos para garantir o relaxamento muscular durante procedimentos cirúrgicos. Uma característica particular nestas drogas é a reversão rápida do seu efeito, o que faz com que sua ação possa ser controlada de uma maneira prevista. Nos últimos anos, os bloqueadores neuromusculares tem sido também empregados nas unidades de terapia intensiva para promover o relaxamento muscular, facilitar a ventilação mecânica e controlar o consumo de oxigênio em situações clínicas específicas, como pós-operatórios, etc [1]. Estas drogas possuem uma estrutura similar ao neurotransmissor acetilcolina e competem com a mesma pelos sítios de ligação. Contudo, esta competição entre a acetilcolina e o agente bloqueador neuromuscular é favorecida em favor do último, porque, enquanto são necessárias duas moléculas de acetilcolina para ativar as unidades do receptor, apenas uma molécula deste agente é suficiente para bloquear o efeito da acetilcolina e prevenir a contração muscular. Uma vez que o receptor de acetilcolina é bloqueado, o músculo relaxa e não responde mais aos estímulos [2].

Desde a introdução da turbocurarina nos meados de 1940, vários agentes bloqueadores neuromusculares tem surgido no mercado. Estas novas drogas geralmente são associadas a uma ação mais precisa, uma duração da ação menor e mais previsível, e poucos efeitos adversos. Outros agentes bloqueadores com estrutura similar à da turbocurarina tem sido desenvolvidos, entre eles, o besilato de atracúreo [2-5], que foi introduzido nos Estados Unidos no ano de 1983, sendo classificado como droga de duração de ação intermediária.

1.1 - Besilato de Atracúreo

Nos últimos anos o besilato de atracúreo tem se posicionado como um dos mais importantes relaxantes musculares em uso na prática diária para cirurgias de curta ou longa duração. Ele também é desejável para a intubação endotraqueal, especialmente, quando o relaxamento muscular é necessário. A apresentação comercial deste produto constitui-se na mistura de três isômeros: *cis-cis*, *cis-trans* e *trans-trans* na proporção de 59:35:6, respectivamente [6]. Embora o produto já esteja sendo usado em algumas partes do mundo (inclusive Brasil) há algum tempo, ainda não está descrito em nenhuma farmacopéia, portanto não existem especificações oficiais quanto aos dados analíticos nem quanto ao teor e composição de impurezas presentes.

A **Figura 17** apresenta as características estruturais do besilato de atracúreo. Ele é designado quimicamente como dibenzenossulfonato de 2,2'-[1,5-pentanodilbis-[oxi (3-oxo-3,1-propanodil)]]bis[1 - [3,4-dimetoxifenil)-metil] - 1,2,3,4 - tetraidro-6,7- dimetoxi-2-metilisoquinolíneo]. Possui uma massa molecular de 1.243,49 e sua fórmula molecular é $C_{65}H_{82}N_2O_{18}S_2$ [7]. O besilato de atracúreo é uma molécula complexa, na qual podem ocorrer diferentes configurações estereoquímicas. A simetria da molécula, todavia, limita os diferentes isômeros possíveis em apenas 10, ao invés de 16 [4,6]. O processo de fabricação do besilato de atracúreo faz com que esses isômeros sejam produzidos em quantidades desiguais, mas com uma proporção consistente. Três configurações estereoquímicas são possíveis considerando a orientação dos grupos no final da molécula: *cis-cis*, *cis-trans* e *trans-trans*, cada uma exibindo uma potência de bloqueamento neuromuscular particular [5,6]. O atracúreo possui quatro centros quirais posicionados no carbono(1) e nitrogênio(2) nas duas unidades de tetrahidropapaverina (**Figura 17**). A configuração *cis* é definida arbitrariamente como aquela na qual os dois substituintes no carbono(1) e nitrogênio(2), $-CH_2-(3,4-dimetoxi-benzil)$ e o grupo alquil ester, respectivamente, estão dispostos do mesmo lado com respeito à ligação C-N [6].

Besilato de atracúreo

cis

trans

Figura 17: Fórmula estrutural do besilato de atracúreo, mostrando a configuração *cis* e *trans* da molécula.

1.2 - Rotas de Decomposição

O atracúreo tem uma característica única na qual sua eliminação é independente de ambas as funções hepática e renal. Após a administração intravenosa tanto a seres humanos quanto a animais de laboratório, este fármaco é predominantemente degradado sob condições fisiológicas (temperatura e pH) a um derivado inativo, o que proporciona uma recuperação rápida do paciente. Como o atracúreo sofre decomposição enzimática (sob condições fisiológicas), a duração de sua ação pode ser bem controlada, pois, uma vez decomposto a seus metabólitos, estes exibem baixa potência e a ação do bloqueador pode ser revertida rapidamente [8].

O atracúreo sofre degradação através de dois mecanismos: a eliminação da Hofmann que ocorre em valores elevados de pH produzindo laudanosina e monoacrilato quaternário (**Figura 18**) e a hidrólise do éster (ocorre em pH 3 ou

menores) produzindo ácido e álcool quaternário, os quais são eventualmente degradados a laudanosina [3,7-10].

Figura 18: Rota de decomposição do besilato de atracúreo.

Contudo, para a análise de besilato de atracúreo durante a produção, controle de qualidade, estudos de armazenagem, etc., precisa-se de técnicas capazes de discriminar ao menos a proporção dos três isômeros e determinar o conteúdo de isômero total. As metodologias analíticas para o besilato de atracúreo são baseadas em procedimentos cromatográficos. A cromatografia em fase líquida (HPLC) tem sido a técnica utilizada para a determinação de

besilato de atracúreo e seus produtos de decomposição [6-9], particularmente em fluidos biológicos [8,9, 11-13]. Contudo, estes métodos são frequentemente laboriosos e o tempo de análise pode ser comprometido.

As propriedades físico químicas do besilato de atracúreo, particularmente, seu caráter iônico e sua solubilidade em água, o tornam interessante para a análise eletroforética.

2 - OBJETIVOS

- Desenvolver metodologia para análise dos isômeros do besilato de atracúreo por eletroforese capilar.
- Identificar as impurezas presentes em formulações comerciais de besilato de atracúreo.
- Efetuar estudos de estabilidade dos isômeros.

3- PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Instrumentação

Os experimentos em CE foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo 270A-HT, Perkin-Elmer, Applied Biosystems Div., Foster City, CA, USA), equipado com um detector UV-Vis variável a 200 nm, um sistema de controle de temperatura mantido a 25 °C e um software para aquisição e tratamento de dados (TurbochromTM, PE Nelson, Cupertino, CA, USA). As análises foram conduzidas sob polaridade normal e voltagem constante de +20 kV. Um capilar de sílica fundida com dimensões: 70 cm de comprimento total x 42 cm comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno, foi usado nos estudos de otimização. Uma célula óptica de alta sensibilidade (LC Packings, Amsterdam, Holanda), que consiste de um capilar curvado em ângulo reto em forma de “Z”, com dimensões 75 µm i. d., 70 cm de

comprimento total (42 cm ao detector), e 3 mm de caminho óptico foi usada na avaliação das impurezas nas ampolas comerciais. As análises dos compostos de decomposição foram realizadas em um equipamento P/ACE System 5510 (Beckman Incorporation, CA, USA) com detector PDA (Photodiodearray) ajustado em 211 nm, temperatura controlada em 25 °C e um sistema de aquisição e tratamento de dados (P/ACE Gold). Neste sistema foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) de 75 µm de diâmetro interno x 67,0 cm de comprimento total (60,0 cm até o detector).

As análises por HPLC foram conduzidas num cromatógrafo (Thermo-Separation Products, San Jose, CA, USA), equipado com uma bomba para gradiente, operado com um fluxo de 2,0 mL/min, um loop de 20 µL e um detector por absorbância ($\lambda = 235$ nm). As separações foram conduzidas utilizando uma coluna C18 (Waters Corp., Milford, MA, USA) com dimensões: 30 cm x 3.9 mm diâmetro interno e tamanho de partícula de 10 µm.

3.2 - Soluções e padrões

Todos os reagentes foram de grau analítico e os solventes eram de pureza cromatográfica. Para as análises de besilato de atracúreo comercial foram preparadas soluções estoque de fosfato de sódio (100 mmol/L) a partir de H_3PO_4 e NaH_2PO_4 ou NaH_2PO_4 (pH_{final} 2,5) e Na_2HPO_4 (pH_{final} 4,0 e 7,0). A partir destes estoques, foram preparados tampões contendo:

- 1 – Fosfato 40 mmol/L (pH 2,5)
- 2 – Fosfato 40 mmol/L + 20 mmol/L de βCD + 4 M de uréia (pH 4,0)
- 3 – Fosfato 40 mmol/L + 20 mmol/L de βCD + 4 M de uréia (pH 7,0)
- 3 – Fosfato 40 mmol/L + 20 mmol/L de βCD + 5 % de MeOH (pH 4,0)
- 5 – Fosfato 60 mmol/L (pH 2,5)
- 6 – Fosfato 60 mmol/L + 20 mmol/L de βCD + 4 M de uréia (pH 4,0).

3.3 - Amostras

As amostras de besilato de atracúreo foram preparadas a partir das ampolas comerciais de nome: Tracur® (*Núcleo de Desenvolvimento Cristália*, São Paulo, Brazil) e Tracrium® (Glaxo Wellcome S.A., Rio de Janeiro, Brazil). Estas ampolas possuem uma concentração de 10mg/mL de besilato de atracúreo, sendo o pH ajustado a 3,25-3,65 com ácido benzenossulfônico. Elas foram estocadas a 10° C até a análise. Nos experimentos de HPLC, as amostras foram preparadas numa concentração de 20 mg/50 mL e nos experimentos de CE, as ampolas foram diluídas com água deionizada a 1:50, 1:100 e 1:500 (v/v) e analisadas.

3.4 - Procedimento Analítico

HPLC

Acetonitrila e as soluções dos tampões foram filtradas e degaseificadas no ultrassom. O condicionamento da coluna de HPLC foi realizado lavando a coluna com a fase móvel durante 30 min antes da injeção. A fase móvel foi composta de (A) acetonitrila e (B) 0,1 M de fosfato de sódio, pH 4,5. O gradiente de eluição foi: 79%A:21%B de 0-60 min; 71%A:29%B de 60-80 min.

CE

Soluções novas de eletrólito eram preparadas diariamente e filtradas em filtro de membrana de poro 0.22 µm (Millipore). No início do dia, o capilar era condicionado com NaOH 1M (20 min), seguido de uma lavagem com água deionizada (10 min) e eletrólito (30 min). As amostras foram injetadas eletrocineticamente com voltagem de 5 kV durante 0,5 s (Applied Biosystems) e 5 kV durante 2 s (Beckman). O sistema foi operado sob voltagem constante e polaridade normal e, após cada corrida, o capilar era lavado com solução nova do eletrólito (2 min).

3.5 - Impurezas

A tetrahidropapaverina foi comprada da Aldrich (Milwaukee, WI). Os possíveis compostos que poderiam estar presentes como impurezas no besilato de atracúreo foram sintetizados no laboratório de Síntese Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo Prof. Bronislaw Polakiewicz. A laudanosina foi sintetizada por metilação da tetrahidropapaverina com dimetil sulfato na presença de acetona em meio alcalino. O ácido quaternário foi sintetizado usando iodeto de metila e o correspondente ácido na presença de clorofórmio.

4 - RESULTADOS

4.1 - Otimização das condições de análise.

4.1.1 - Avaliação do tampão:

A resolução de isômeros posicionais pode ser fortemente influenciada pela composição do eletrólito [14,15]. Deste modo, a seleção de um sistema tampão apropriado, sua concentração, força iônica, pH e a presença de aditivos deve ser considerada cuidadosamente. Primeiramente foram testados vários tampões de corrida para promover a separação dos três isômeros de uma amostra comercial de besilato de atracúreo. A molécula de atracúreo é uma tetrahidropapaverina e possui duas aminas quaternárias [10]. A pHs inferiores a 9,0, os grupos amina se tornam protonados e o composto migra eletroforicamente como cátion. Para a separação de isômeros de compostos básicos, são usados tampões ácidos, assim, o fluxo eletroosmótico é diminuído e a resolução aumenta [16]. Foi testada então a separação dos isômeros utilizando uma solução de fosfato 40 mmol/L a pH =2,5 (**Figura 19 A**). Contudo, a separação não teve sucesso, ocorrendo uma coeluição parcial dos isômeros maiores, *cis-cis* e *cis-trans*, indicando a necessidade do uso de um aditivo.

As ciclodextrinas são aditivos de tampões usados extensamente na separação eletroforética de isômeros quirais, sendo que as separações

ocorrem através da formação de complexos de inclusão [14-16]. A **Figura 19 B** mostra a separação do besilato de atracúreo numa solução de tampão fosfato 40 mmol/L contendo β -ciclodextrina dissolvida em 5 mL de metanol. O solvente orgânico melhorou consideravelmente a solubilidade da β -ciclodextrina e agiu ele mesmo como um seletor, alterando a constante de ligação dos isômeros sobre o complexo de inclusão. A discriminação dos isômeros *cis-cis* e *cis-trans* melhorou, mas a resolução na linha de base ainda não foi obtida.

Normalmente a uréia é utilizada para facilitar a dissolução da β -ciclodextrina. Na **Figura 19 C**, o metanol foi trocado por uma solução de uréia concentrada. A melhora na resolução foi substancial. Este resultado sugeriu que a uréia não trabalhou apenas como um simples solvente, mas parece que ela favoreceu a interação entre o soluto e a ciclodextrina.

Na **Figura 19 D** foi testado um aumento no pH para tentar reduzir o tempo de análise, mas os resultados não foram satisfatórios. A pH 4,0, os analitos encontraram separação quase completa, mas quando utilizou-se um fluxo eletroosmótico maior (pH 7,0) a perda na resolução foi considerável. O aumento no fluxo eletroosmótico fez com que os isômeros coeluissem completamente, deixando pouco tempo para a interação entre a molécula do soluto e a ciclodextrina acontecer. Fluxos eletroosmóticos muito rápidos (pH altos) reduzem o tempo gasto pelo analito para o equilíbrio de inclusão-complexação e diminuem a resolução.

Figura 19: Efeito da composição do sistema de eletrólitos sobre a resolução dos isômeros posicionais do besilato de atracúreo: (A) Fosfato 40 mM (pH 2,5), (B) Fosfato 40 mM + 20 mM de β CD + 5% de MeOH, (pH 4), (C) Fosfato 40 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia, (pH 4), (D) Fosfato 40 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia, (pH 7). Amostra: Tracur®, diluição 1/50 (v/v). Condições: equipamento Perkin Elmer, voltagem: +20 kV; injeção: +5 kV, 0,5s; detecção: 200 nm. Legenda: (1) *trans-trans*, (2) *cis-trans*, (3) *cis-cis* e (4) laudanosina.

Quando as ciclodextrinas são empregadas é recomendado também um controle eficiente da temperatura para prevenir perdas na resolução. Um aumento de temperatura causaria uma diminuição na viscosidade do tampão e uma diminuição do tempo de migração. Uma mudança na temperatura do capilar poderia influenciar fortemente a estabilidade do complexo de inclusão formado entre o analito e a ciclodextrina (um aumento na temperatura causa uma diminuição na constante de ligação) [17,18], por isto a temperatura do cartucho foi controlada em 25°C.

4.1.2 - Avaliação da injeção e voltagem:

Foram testadas as injeções hidrodinâmica (1 segundo e 16.9 KPA de pressão) e eletrocinética (5 KV) durante 0,1; 0,5 e 1 segundo (**Figura 20**). Em geral, as separações onde se utilizam injeção eletrocinética têm uma eficiência maior do que as que utilizam injeção hidrodinâmica [18]. Aumentando o tempo de injeção eletrocinética resulta num aumento da área do pico, pois quanto maior o tempo de injeção, maior quantidade de amostra é transferida para a coluna. A 0,1 segundo, a quantidade de amostra injetada foi muito pequena e o sinal foi comprometido. Com o tempo de injeção de 1,0 segundo ocorreu um aumento da área do pico, porém, as bandas sofreram maior alargamento. A melhor resolução na linha de base para a injeção eletrocinética foi encontrada com 0,5 segundo.

Figura 20: Efeito do modo de injeção na análise de uma amostra de besilato de atracúreo (Tracur®). Condições: equipamento Perkin Elmer, tampão: Fosfato 60 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia, (pH 4); voltagem: +20 kV; detecção: 200 nm, diluição da amostra 1:50; injeção eletrocinética utilizando +5 kV durante: (A) 0,1s, (B) 0,5s e (C) 1s; e injeção hidrodinâmica: (D) 1s, 169 mBar. Legenda: *vide* Figura 19.

Foram testados dois valores para a voltagem de corrida (20 e 30kV) (**Figura 21**). Quando se utilizou voltagens maiores (30 kV), a análise tornou-se mais rápida, porém, isso implicou em picos mais finos e também mais unidos. No caso do atracúreo, os picos saíram em aproximadamente em 6 minutos contra 11 minutos utilizando voltagem menor (20 kV), porém, como o interesse era a separação dos isômeros na linha de base, o que foi melhor visualizado utilizando uma voltagem menor, esta foi a escolhida para as separações. Neste caso, a concentração do fosfato de sódio empregado como tampão foi aumentada de 40 para 60 mmol/L, o que favoreceu ainda mais a resolução dos isômeros.

Figura 21: Efeito da voltagem de corrida na análise de uma amostra de besilato de atracúreo (Tracur®). Condições: equipamento Perkin Elmer, tampão: fosfato 60 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia (pH 4); injeção: +5 kV, 0,5 s; detecção: 200 nm. Outras condições e legenda: *vide* Figura 19.

4.1.3 - Estudo da diluição da amostra

A ampola comercial de Tracur® vem com uma concentração de 10 mg/mL. Quando injetada, esta amostra era muito concentrada, o que não permitia observar a separação dos isômeros, pois os picos se sobrepunham um ao outro. A amostra da ampola foi diluída com água deionizada e injetada em condições diferentes para encontrarmos o melhor fator de diluição. Com um fator de 1:500 (1 mL da ampola :500 mL de água), a amostra ficou muito diluída, sendo os picos mal visualizados (**Figura 22 A**). Foram testadas as diluições de 1:100 e 1:50 e ambas mostraram-se adequadas (**Figura 22 B e C**). Diluições inferiores de 1:20 e 1:10 também foram testadas, mas os picos ficaram mal resolvidos e não foram considerados. Foi escolhida a proporção de 1:50 para a diluição das amostras para análise.

Figura 22: Efeito da diluição da amostra de besilato de atracúreo (Tracur®) em água. (A) 1:500, (B) 1:100 e (C) 1:50. Condições: equipamento Perkin Elmer, tampão: Fosfato 60 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia, (pH 4), voltagem: +20 kV; injeção: +5 kV, 0,5s; detecção: 200 nm. Legenda: *vide* Figura 19.

4.2 - Comparação da análise do besilato de atracúreo em HPLC e em CE.

A **Figure 23 (A e B)** apresenta uma comparação entre uma separação por CE otimizada e uma análise por HPLC dos isômeros do besilato de atracúreo em ampolas de Tracur®. A análise por HPLC foi conduzida rotineiramente no laboratório de controle de qualidade do *Núcleo de Desenvolvimento Cristália*. A diferença marcante entre as duas técnicas empregadas foi o tempo de análise [19]. Como pode ser visto, a resolução completa dos três isômeros em HPLC foi obtida com um tempo de corrida muito maior, 60 min contra 13 min para a análise por CE. É interessante notar que a ordem de eluição foi idêntica em ambos os procedimentos. Contudo as ampolas submetidas à análise não foram as mesmas.

Figura 23: Comparação entre HPLC e CE na análise do besilato de atracúreo. Amostra: Tracur®, diluição 1/50: (A). Condições do HPLC: detector UV a 235 nm, loop: 20 μ L, fluxo: 2,0 mL/min, fase móvel: acetonitrila/0,1M tampão fosfato, pH 4,5, fase estacionária: ODS, (B) Condições otimizadas do CE: tampão de corrida: fosfato 60 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia, pH 4, voltagem: +20 kV; injeção: +5 kV, 0,5 s; detecção: 200 nm. Legenda: vide Figura 19.

4.3 – Estudos de Estabilidade

4.3.1- Degradação térmica da amostra

Segundo o fabricante, as ampolas de Tracur® perdem lentamente a potência com o decorrer do tempo a uma taxa de aproximadamente 6 % ao ano sob refrigeração (5°C) e 5 % ao mês à 25°C, motivo pelo qual é recomendado conservar as ampolas sob refrigeração entre 2-8°C. Para avaliar

a influência da temperatura na degradação dos isômeros, uma amostra de Tracur® foi deixada num banho de água com temperatura controlada de 60°C durante 4 horas. A ampola foi quebrada à temperatura ambiente, diluída com água deionizada, (1/50, v/v) e analisada por CE. Outra amostra estocada a 10°C, sob refrigeração, foi analisada nas mesmas condições e em CE e também por HPLC. A Tabela IX apresenta os resultados dos experimentos comparando a razão entre os isômeros. Os resultados foram baseados na área do pico dos três isômeros.

Tabela IX. Decomposição induzida por aquecimento do Tracur®.

	CE		HPLC
Razão de isômeros esperada	Amostra estocada a 10°C*	Amostra submetida à degradação térmica (4h/60°C)*	Amostra estocada a 10°C*
6 <i>trans-trans</i>	5,90	5,02	5,88
35 <i>cis-trans</i>	35,4	35,1	35,3
59 <i>cis-cis</i>	58,7	58,1	58,8

* ampolas do mesmo lote.

Pode-se observar que a decomposição induzida pelo calor não causou uma variação significativa na proporção relativa dos três isômeros, o que indica que o problema maior na degradação da amostra não deve ser somente a temperatura.

4.3.2- Estudos de Estocagem

Com o objetivo de avaliar a estabilidade do produto durante o tempo de estocagem, uma ampola de Tracur® mantida a 10°C (refrigerador) foi analisada após um período de 7 meses e comparada a uma outra de lote mais recente (**Figura 24**). Os resultados indicaram que durante o período de estocagem em refrigerador, os isômeros foram decompostos e constatou-se um aumento excessivo da laudanosina.

Figura 24: Comparação da análise por CE de uma ampola de Tracur® após estocagem. Condições: equipamento P/ACE, tampão: fosfato 60 mM + 20 mM de β CD + 4 M de uréia, (pH 4), voltagem: +20 kV, injeção (+5 kV, 2s), detecção: 211 nm. Legenda: *vide* **Figura 19**.

A fim de avaliar melhor este resultado, uma ampola de Tracur® foi aberta em 01/10/98, diluída 1:50 em água deionizada e separada em dois recipientes fechados. Um deles foi mantido sob refrigeração a 10 °C e o outro foi guardado no armário à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em períodos aleatórios e a decomposição dos isômeros foi acompanhada através do aumento da proporção de laudanosina no produto (**Figura 25**).

Figura 25: Gráfico da variação da área da laudanosina em uma amostra de Tracur® estocada a temperatura ambiente comparada a outra refrigerada a 10°C. (média 3 amostras).

A porcentagem de decomposição foi maior para a amostra estocada sem refrigeração. O teor de laudanosina aumentou gradativamente com o passar do tempo, tanto para a amostra refrigerada quanto para a estocada a temperatura ambiente (dados que estão de acordo com o fabricante), indicando que a estabilidade do produto não depende somente da temperatura, mas também do tempo de estocagem.

4.4 - Identificação de impurezas

A **Figura 26** mostra o eletroferograma de duas formulações comerciais de besilato de atracúreo: Tracur® (*Núcleo de Desenvolvimento Cristália*) e Tracrium® (Glaxo Wellcome), utilizando uma cela óptica de alta sensibilidade. Os eletroferogramas indicam a semelhança entre as duas amostras e um número considerável de impurezas. Podemos observar que além da laudanosina, ocorrem três pares de picos. Estes picos parecem indicar os isômeros *cis* e *trans* do ácido e do álcool quaternário, originados da quebra da molécula do atracúreo segundo a rota de hidrólise do éster, e o monoacrilato quaternário, produto intermediário da eliminação de Hofmann (*vide* Figura 18) [6,9].

Figura 26: Análise por CE de duas formulações comerciais de besilato de atracúreo. (A) Tracur® (*Núcleo de Desenvolvimento Cristália*) e (B) Tracrium® (Glaxo Wellcome) usando uma cela HS. Condições: equipamento P/ACE, tampão fosfato 60 mM (pH 2,5) sem aditivos, voltagem 20 kV, injeção (+5 kV, 2s), detecção: 211 nm. Legenda: *vide* Figura 19.

Na tentativa de identificar estes picos, foi injetada uma amostra de Tracur® diluída em água deionizada (1:50) e comparados os tempos de migração com uma mistura padrão contendo algumas das impurezas sintetizadas (laudanosina, tetrahidropapaverina e ácido quaternário). Como o interesse era a identificação das impurezas, não foram adicionados aditivos no tampão, então os picos dos isômeros não foram separados. Foi identificado além da laudanosina, o ácido quaternário (**Figura 27**). Como houve uma pequena variação no tempo de migração dos compostos, este resultado foi confirmado através de “spiking”, adicionando o padrão do ácido quaternário à amostra de Tracur® e injetando novamente. A tetrahidropapaverina, representada por um pico que eluiu muito próximo à laudanosina, não foi identificada em nenhuma das amostras estudadas.

Figura 27: Identificação das impurezas do Tracur®. Condições: equipamento P/ACE, tampão: fosfato 60 mmol/L (pH 2,5), sem aditivos, voltagem: 30 kV, detecção a 200 nm, temperatura 25°C, injeção eletrocinética (+5 kV, 2,0s). Legenda: (1) *trans-trans*, (2) *cis-trans*, (3) *cis-cis* - 4 – laudanosina, 5- tetrahidropapaverina, 6- ácido monoquaternário.

5 - CONCLUSÕES

A metodologia otimizada em CE para análise do besilato de atracúreo foi aplicável na avaliação da razão dos isômeros e das impurezas em formulações comerciais. Ela forneceu as mesmas informações que o HPLC, mas com um tempo de análise muito mais curto.

A decomposição dos isômeros a laudanosina não foi somente dependente da temperatura, mas principalmente do tempo de estocagem.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lewis, K.S.; Rothenberg, D.M. Neuromuscular blockade in the intensive care unit, *Am J Health-Syst Pharm*, **1999**, 56, pg 72.
- [2] Larijani, G.E. Evaluating neuromuscular blocking agents, *Am J Health-Syst Pharm*, **1999**, 56 (suppl 1), pg 53.
- [3] Stenlake, J.B. *et al.* Biodegradable neuromuscular blocking agents – Part 4:atracurium besylate and related polyalkylene di-esters, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **1981**, 16, n. 5, 515.
- [4] Stenlake, J.B. *et al.* Biodegradable neuromuscular blocking agents – Part 6: Stereochemical studies on atracurium and related polyalkylene di-esters, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **1984**, 19, n. 5, 441.
- [5] Tsui, D.; Graham, G.G.; Torda, T.A The pharmacokinetics of atracurium isomers in vitro and in humans, *Anesthesiology*, **1987**, 67, 722.
- [6] Nehmer, U. Separation of *cis-cis*, *cis-trans* and *trans-trans* isomers of (+) atracurium besylate and *cis* and *trans* isomers of its major quaternary decomposition products and related impurity by RPHPLC, *J. Chromatogr.*, **1988**, 457, 127.
- [7] Nehmer, U. Simultaneous determination of atracurium besylate and its major decomposition products and related impurities by RPHPLC, *J. Chromatogr.*, **1988**, 435, 425.

- [8] Varin, F.; Ducharme, J.; Besner, J.G. Determination of atracurium and laudanosine in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **1990**, 529, 319.
- [9] Simmonds, R.J. Determination of atracurium, laudanosine and related compounds in plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **1985**, 323, 431.
- [10] Stenlake, J.B. *et al.* Biodegradable neuromuscular blocking agents – Part 3: bis-quaternary esters, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **1981**, 16, n. 6, 508.
- [11] Schopfer C; Benakis A. Simplified method for the determination of atracurium and laudanosine in pig plasma by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection, *J. Chromatogr. B*, **1990**; 526; 223.
- [12] Neill E.A.M.; Jones CR. Determination of atracurium besylate in human plasma, *J. Chromatogr. B*. **1983**; 274; 409.
- [13] Bjorksten A.R.; Beemer G.H.; Crankshaw D.P. Simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of the non-depolarizing neuromuscular blocking drugs in clinical anesthesia, *J. Chromatogr. B* **1990**; 533; 241.
- [14] Nishi H; Terabe S. Optical resolution of drugs by capillary electrophoretic techniques, *J. Chromatogr. A* **1995**; 694; 245.
- [15] Nishi H. *et al.* Chiral separation of drugs by capillary electrophoresis using β -cyclodextrin polymer, *J. Chromatogr. A* **1994**, 678, 333.
- [16] Altria, K.D. Quantitative aspects of the application of capillary electrophoresis to the analysis of pharmaceutical and drug related impurities, *J. Chromatogr. A*, **1993**; 646, 245.

- [17] Fanali, S. Use of cyclodextrins in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1991**, 545, 437.
- [18] Weinberger, R. *Practical capillary electrophoresis*, Academic Press, Inc. San Diego, USA, **1993**.
- [19] Moraes, M.L.L. Comparative evaluation of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for the separation of *cis-cis*, *cis-trans*, and *trans-trans* isomers of atracurium besylate, *J. Cap. Elec.*, **1998**, 5:1/2, 33.

CAPÍTULO IV
ESTRATÉGIAS PARA
AUMENTO DE SENSIBILIDADE

1 – INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

Nos últimos dez anos tem sido desenvolvido um grande número de estratégias para pré-concentrar amostras e/ou aumentar a quantidade da amostra que pode ser inserida na coluna, sem afetar a eficiência da separação. Estas estratégias podem ser divididas dentro de dois grupos baseados nos fenômenos físico-químicos usados para concentrar os analitos. Um deles envolve a manipulação da velocidade eletroforética do analito e inclui as estratégias de “stacking” (concentração) em campo amplificado, injeção de grande volume, isotacoforese transiente, “stacking” mediado por pH e “matrix switching” (manipulação da composição do eletrólito). O outro grupo utiliza a partição dentro de uma fase estacionária ou pseudoestacionária que influencia a pré-concentração do analito. Este grupo inclui as estratégias de pré-concentração cromatográfica e “sweeping” [1].

A estratégia mais simples para pré-concentrar amostra é o “stacking” em campo amplificado, que foi explicado pela primeira vez por Mikkers e co-autores em 1979 [2]. Este método inclui a injeção da amostra dissolvida em um tampão de baixa condutividade. Burgi e Chien [3] descreveram um modelo para otimizar a concentração do tampão na amostra e no capilar, e tem discutido as limitações da eficiência desta estratégia. Estes mesmos autores melhoraram a concentração e a capacidade de preenchimento da amostra injetando no capilar uma banda de água imediatamente após a injeção da amostra [4]. Friedberg e co-autores [5] demonstraram os efeitos de pH, força iônica e composição do tampão com e sem acetonitrila na matriz. Chien e Burgi [6] e Albin e co-autores [7] discutiram em detalhes o “stacking” em campo amplificado. Foram reportados aumentos de sensibilidade da ordem de 1000 vezes [8].

A injeção em grande volume foi também projetada por Chien e Burgi [9] dissolvendo a amostra em água e injetando-a hidrodinamicamente até preencher cerca de um terço ou metade do comprimento do capilar. McGrath e Smyth [10] reportaram 10 vezes de aumento de concentração para a análise de drogas catiônicas numa amostra de urina.

O "stacking" mediado por pH pode ser realizado utilizando diferentes estratégias para a titulação da banda de amostra. Aebersold e Morrison [11] injetaram uma amostra diluída de peptídeos dissolvidos numa matriz altamente básica dentro de um capilar contendo um tampão ácido. Schwer e Lottspeich [12] descreveram a injeção hidrodinâmica de base forte, seguida pela injeção de uma amostra de peptídeos, e então a injeção de uma banda de ácido forte. Aumentos da ordem de 300 vezes foram encontrados utilizando as estratégias de "stacking" mediado por pH [13].

A isotacoforese transiente (tITP) foi primeiro reportada por Verheggen e co-autores [14]. Kaniasky e Marak [15] demonstraram o acoplamento em linha da isotacoforese com a CE. Krivankova *et al.* [16] e Krivankova e Bocek [17] tem recomendado vários eletrólitos que podem agir como eletrólito líder e terminador. Krivankova [16,18] discutiu em detalhes a transição da ITP para CZE em tITP.

O pré-tratamento da amostra utilizando extração em fase sólida (SPE) era comumente realizado no modo "off-line". O conceito de pré concentradores "on-line" para eletroforese capilar foi primeiramente desenvolvido por Guzman [19,20]. Este autor também descreveu o conceito geral de adsorção não específica dos analitos dentro de uma fase sólida apropriada [21], os concentradores de analito específicos [19] e os arranjos em capilares com canais [22]. Cai e Rassi [23] desenvolveram um pré-concentrador em tubo aberto para CE, modificando a parede do capilar com C18. Tomlinson e co-autores [24,25] demonstraram a pré-concentração inserindo membranas impregnadas com C18 no capilar (mPC), na tentativa de resolver os problemas referentes ao empacotamento do capilar em SPE-CE em linha.

O uso de um capilar expandido no ponto de detecção (cela HS) foi descrito por Chervet *et al.* [26]. Estes mesmos autores avaliaram a separação de peptídeos utilizando uma cela com 2-3 mm de expansão, encontrando um aumento de 6 vezes no sinal-ruído, mas com perda da eficiência [27].

As estratégias de pré-concentração em MEKC (como o "sweeping") e outros melhoramentos das estratégias de pré-concentração em linha nos

últimos 10 anos são discutidos em maiores detalhes na revisão de Osbourn *et al.* [1]. A Tabela X mostra o aumento obtido e os comentários gerais para algumas das estratégias de pré-concentração de amostra em CE.

Tabela X: Aumento obtido e comentários gerais para algumas das estratégias de aumento de sensibilidade [7].

Estratégia	Aumento em sensibilidade	Comentários
"Stacking"	10-100	Simples, depende da força iônica da amostra em relação ao tampão de separação
"Stacking" em campo amplificado	50-1000	Não pode ser aplicada a cátions e ânions simultaneamente
Isotacoforese transiente (tITP)	100-1000	Necessidade de desenvolvimento de método para analitos diferentes, escolha dos tampões deve ser cuidadosa
Cela em Z 3 mm (75 μ m)	10-20	Aplicabilidade a métodos de detecção apenas direta, disponível comercialmente
Concentração em fase sólida em linha	100-1000	Difícil de manufaturar, não disponível comercialmente

Podemos observar que o aumento de sensibilidade é da mesma ordem para as estratégias de isotacoforese transiente e para os pré-concentradores, porém os concentradores não estão disponíveis comercialmente, sendo necessária a confecção dos mesmos. Já para a isotacoforese deve haver uma escolha criteriosa dos tampões que funcionam como eletrólito líder e terminador, o que, nos dois casos, pode levar a um valor menor no aumento de sensibilidade obtido.

O "stacking" em campo amplificado produz um aumento maior de sensibilidade que o "stacking" e, apesar de não poder ser aplicado à ânions e cátions simultaneamente, é uma estratégia bem simples e reprodutível.

A cela HS, sendo disponível comercialmente, também é reprodutível e induz um aumento razoável. Seu maior problema é o alto preço e a fragilidade do capilar curvado a 90°.

2 – MODOS DE INJEÇÃO EM CE

2.1 - Injeção Hidrodinâmica

Em eletroforese capilar, as amostras podem ser introduzidas no capilar de duas formas: por injeção hidrodinâmica ou por injeção eletrocinética [28]. Na primeira, um pequeno volume de amostra é transferido para o capilar pela aplicação de um gradiente de pressão, que pode ser estabelecido por pressurização ou vácuo em um dos reservatórios da solução, ou por gravidade (quando um dos reservatórios é elevado em relação ao outro), sendo a amostra introduzida por sifonagem (**Figura 28-A**).

Figura 28: Esquema representativo da injeção hidrodinâmica por: (A) pressão, (B) vácuo e (C) sifonagem, e (D) esquema da injeção eletrocinética.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra e é usualmente mais precisa que a injeção eletrocinética, pois é baseada estritamente na transferência de volume. Este método de injeção é o mais largamente usado. O cálculo do volume injetado depende de vários fatores físico químicos, entre eles a viscosidade do tampão, as dimensões do capilar, a pressão aplicada e o tempo de injeção. Para a injeção por pressão, o volume pode ser calculado usando a equação de Hagen-Poiseuille [29-30].

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L_{tot}} \quad [5]$$

onde: V é o volume injetado

ΔP é a diferença de pressão através do capilar

d é o diâmetro do capilar,

t_{inj} é o tempo de injeção,

η é a viscosidade do tampão e

L_{tot} é o comprimento total do capilar.

Por exemplo, assumindo que uma pressão de 25 mbar é aplicada durante 2s a uma solução aquosa a 20°C, com um capilar de 75 cm de comprimento e 50 μm de diâmetro interno, o volume injetado é de 1 nL.

As injeções por pressão (**Figura 28-B**) também podem ser feitas aplicando vácuo no reservatório destinatário enquanto a entrada do capilar permanece no reservatório da amostra. O volume de injeção e o comprimento da banda de amostra injetada podem ser calculados pelas mesmas equações descritas acima.

Como o volume injetado depende da pressão aplicada, é importante contar com uma fonte de pressão (ou vácuo) constante, para não afetar a reprodutibilidade. O tempo de injeção deve ser pequeno para minimizar os efeitos de sifonamento que podem provocar variações do volume de injeção, levando a picos não reprodutíveis e comprometendo a quantificação [29-32].

Nas injeções por gravidade (**Figura 28-C**) coloca-se a ponta do capilar no reservatório contendo a amostra e eleva-se o mesmo acima do reservatório de destino, permitindo que a amostra entre no capilar por sifonamento. O volume injetado pode ser calculado através da equação [5], sendo ΔP calculado por:

$$\Delta P = \rho \, g \, \Delta H \quad [6]$$

onde: ΔP é a variação da pressão

ρ é a densidade do tampão no capilar ($0,9972 \text{ g.mL}^{-1}$, para a água a 20°C),

g é a constante gravitacional (980 cm.s^{-2}) e

ΔH é a diferença de altura entre os dois reservatórios.

2.2 - Injeção Eletrocinética

Na injeção eletrocinética é estabelecido um gradiente de potencial ao longo do capilar por um período de tempo conhecido e a amostra é introduzida como resultado da combinação entre as velocidades eletroosmótica e eletroforética (**Figura 28-D**). A quantidade de material injetado é resultado da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e do meio condutor, e da magnitude do fluxo eletroosmótico [28]. Ocorre então uma discriminação entre as espécies iônicas com mobilidades diferentes sendo que os íons com mobilidade maior estarão presentes em quantidade maior dentro do capilar, podendo ser preferencialmente enriquecidos comparados àqueles de mobilidade menor. Devido a este fenômeno, a injeção eletrocinética não é tão reprodutível quanto a hidrodinâmica, mas pode proporcionar um aumento de sensibilidade, dependendo das condições da amostra e do meio. Neste caso, a quantidade injetada (Q_{inj}) é dada por [30,31]:

$$Q_{inj} = \frac{V \pi c t r^2 (\mu_{ef} + \mu_{osm})}{L_{tot}} \quad [7]$$

onde: V é a voltagem aplicada,

c é a concentração da amostra,

t é o tempo de aplicação da voltagem,

r é o raio do capilar,

L_{tot} é o comprimento total do capilar e

μ_{ef} e μ_{osm} são as mobilidades eletroforética e eletroosmótica, respectivamente.

3 – ESTRATÉGIAS BASEADAS NA INTRODUÇÃO DA AMOSTRA NO CAPILAR

Alguns parâmetros podem ser controlados para melhorar a resolução e a sensibilidade em CE, entre eles o volume de injeção da amostra. A quantidade de amostra injetada (ou mais propriamente o comprimento da banda de injeção) deve ser pequena para evitar a formação de bandas largas e mal resolvidas. Normalmente para um capilar que possui um volume de 2 μL , deve-se injetar menos que 2% do volume total do capilar ($\pm 40 \text{ nL}$). Porém, quando se trabalha com amostras muito diluídas ou pouco concentradas, é necessário injetar uma quantidade maior de amostra, que deve ser pré-concentrada quando a voltagem é aplicada. Algumas destas estratégias serão discutidas a seguir.

3.1 - “Stacking” mediado por força iônica

O “stacking” é obtido quando uma grande banda de amostra dissolvida num solvente com condutividade elétrica menor que a do tampão de corrida, é introduzida hidrostáticamente dentro do capilar (**Figura 29**). Após a aplicação da voltagem, como o solvente na banda da amostra tem uma baixa concentração de íons, a resistividade nesta região é maior que a resistividade no restante da coluna e um alto campo elétrico é desenvolvido na zona da amostra, causando uma migração rápida dos íons. Quando estes alcançam o limite entre a zona da amostra (alto campo elétrico local) e a zona do tampão (baixo campo elétrico local), eles são desacelerados causando uma contração da zona da amostra. Este efeito é contínuo até que todos os íons presentes na região da amostra sejam concentrados numa banda fina. O campo elétrico torna-se então homogêneo e os íons são separados segundo os princípios convencionais da eletroforese capilar [30]. O mecanismo de “stacking” ocorre para ambas as espécies positiva e negativamente carregadas. As espécies positivas se concentram na frente da banda da amostra enquanto que as espécies negativas se concentram na parte de trás. Os compostos neutros são deixados na banda da amostra e co-eluem.

Figura 29: Esquema representativo do “stacking” mediado por força iônica.

Teoricamente, a extensão com a qual o “stacking” ocorre é proporcional à resistividade (ou inverso da condutividade) entre o eletrólito na região da amostra e o tampão no restante da coluna. Estas diferenças entre as condutividades na banda da amostra e no tampão podem ser expressas quantitativamente como [3, 30]:

$$\frac{E_1}{E_2} = \frac{\rho_1}{\rho_2} = \frac{C_2}{C_1} = \gamma \quad [8]$$

onde: C_1 e C_2 são as concentrações do tampão dentro da banda de amostra e no restante da coluna, respectivamente.

E_1 e E_2 são o campo elétrico nestas regiões

ρ_1 e ρ_2 as resistividades respectivas

γ é o fator de aumento de campo

Em geral as resistividades são inversamente proporcionais à concentração do tampão (para tampões com a mesma composição). No caso de amostras preparadas em água ou em tampões de concentração muito baixa, os efeitos de impurezas e dos íons da amostra sobre a resistividade total

devem ser considerados. Contudo, o fator de enriquecimento de campo pode ser da ordem de centenas de vezes para amostras preparadas em água [3].

Uma vez que o fluxo de íons que passa através do capilar deve ser constante dentro de cada banda, a concentração no estado de equilíbrio dos solutos $[S_1]$ e $[S_2]$ é inversamente proporcional à força do campo elétrico e por essa razão, sua velocidade eletroforética fica:

$$[S_1] v_1 = [S_2] v_2 \quad [9]$$

onde: $[S_1]$ e $[S_2]$ são as concentrações do soluto dentro da banda da amostra e no restante da coluna, respectivamente.

v_1 e v_2 são as velocidades eletroforéticas nestas regiões.

Como a velocidade eletroforética dos íons (dos solutos) é proporcional ao campo elétrico, temos:

$$\frac{[S_2]}{[S_1]} = \frac{C_2}{C_1} = \gamma \quad [10]$$

A equação [10] mostra que a concentração dos íons da amostra (que migram dentro da região de tampão de alta concentração) seria aumentada em proporção ao fator de enriquecimento de campo. Devido à conservação da massa, o comprimento da banda de amostra na região do tampão de alta concentração deveria diminuir (comprimir) pelo mesmo fator. Negligenciando os efeitos de difusão, o comprimento da banda de amostra após o “stacking” seria dado por:

$$x_s = \frac{x_i}{\gamma} \quad [11]$$

onde x_s é o comprimento da banda da amostra na região de alta concentração do tampão após o “stacking”.

e x_i é o comprimento da banda inicial de amostra injetada.

A equação [11] mostra que o comprimento da banda efetiva é inversamente proporcional ao fator de enriquecimento de campo. Quanto maior as diferenças nas concentrações entre a banda da amostra e o tampão de corrida dentro da coluna, mais finos os picos se tornam e mais efetivo é o “stacking” (maior é o γ) [3].

Contudo, se utilizamos grandes diferenças de concentração entre as duas bandas distintas, como por exemplo, dissolver a amostra em água ou num tampão de concentração muito baixa e utilizar uma alta concentração para o tampão de corrida, pode ocorrer alargamento das bandas pré-concentradas devido ao fluxo laminar [3]. O fluxo laminar é resultado das diferenças no campo elétrico nas bandas da amostra e do tampão, o qual causa velocidades de fluxo eletrosmótico diferentes em cada banda. Estas velocidades diferentes criam uma pressão eletrosmótica que leva ao fluxo laminar. Este fenômeno produz um perfil de velocidade parabólico, (contrário ao perfil horizontal, normalmente observado em CE) [31], que pode levar a um alargamento de picos. Devido aos íons da amostra não gastarem quase tempo nenhum na banda de injeção, a perturbação sobre o “stacking” originada pela velocidade média laminar na região de baixa concentração é muito pequena. Normalmente o “stacking” é obtido quando se prepara a amostra num tampão que seja 10 vezes menos concentrado que o tampão de corrida [3]. Outra alternativa é adicionar acetonitrila na amostra [33].

Considerando o fluxo laminar, difusão e volume finito de amostra como causas de alargamento de banda, é possível deduzir a seguinte expressão para γ [3]:

$$\gamma = (A/B)^{1/4} \quad [12]$$

onde A e B são definidos em termos de parâmetros conhecidos do sistema.

$$A = \frac{L^2}{24 D t} \quad \text{e} \quad B = \left(\frac{r_o^2}{2 D t} \right) \left(\frac{v_{eo1}^2 t^2}{24 D t} \right) \quad [13]$$

3.1.1 – Avaliação do “Stacking” mediado por força iônica

A demonstração do “stacking” mediado por força iônica é apresentada na **Figura 30**. Uma ampola de besilato de atracúreo (Tracur®) foi aberta e diluída na proporção 1:50 em várias concentrações de eletrólito e em água deionizada. Quando a ampola de Tracur® foi diluída diretamente no tampão de corrida (fosfato 60 mmol/L + 20 mmol/L de β CD + 4 mol/L de uréia), praticamente não foram observados picos (**Figura 30-A**), o que indicou que o tampão de corrida não foi um bom meio para se dissolver a amostra. Tomou-se o tampão de corrida e fez-se uma diluição do mesmo a 10% em água. A ampola de Tracur® foi diluída neste meio e analisada (**Figura 30-B**). Foram observados alguns picos, mas o sinal ainda continuava baixo. Preparou-se então uma solução de fosfato 10 mmol/L e manteve-se a concentração dos aditivos (β CD e uréia) (**Figura 30-C**). Novamente a ampola foi diluída neste meio e injetada. A sensibilidade melhorou um pouco indicando que o “stacking” deveria estar ocorrendo. De acordo com a literatura o melhor resultado de “stacking” seria encontrado se a amostra fosse diluída num tampão que tivesse uma força iônica entre a água e o tampão de corrida, aproximadamente a 10 % do valor da concentração do eletrólito de corrida [34], pois tampões menos concentrados poderiam gerar fluxo laminar causando alargamento de pico. Preparou-se então uma solução de fosfato 6 mmol/L, mantendo-se novamente a concentração dos aditivos (**Figura 30-D**). Visualmente não houve muita diferença entre a condição da **Figura 30 C e D**. O melhor resultado de “stacking” foi obtido quando a amostra de Tracur® foi dissolvida diretamente em água deionizada (**Figura 30-E**).

Figura 30: Variação da dissolução de uma amostra de Tracur®. Condições: amostra dissolvida em: (A) tampão de corrida*, (B) tampão de corrida diluído a 10% em água, (C) fosfato 10 mmol/L + 20 mmol/L β CD + 4 mol/L uréia, (D) fosfato 6 mmol/L + 20 mmol/L β CD + 4 mol/L uréia, (E) água. Outras condições: equipamento P/ACE, tampão de corrida*: fosfato 60 mmol/L + 20 mmol/L β CD + 4 mol/L uréia, capilar de sílica fundida (75 μ m i.d. x 67,0 cm de comprimento total (60,0 cm até o detector)), detector PDA (211 nm), 25 °C, +20 kV, injeção: 2,0s, 34 mBar. Legenda: 1 - *trans-trans*, 2 - *cis-trans*, 3- *cis-cis*, 4- laudanospina.

3.2 - “Stacking” eletrocinético ou Injeção Amplificada por Campo.

A pré-concentração em campo amplificado é similar ao “stacking” mediado por força iônica. Neste caso, a amostra deve ser originalmente dissolvida em água. Uma melhora significativa ocorre quando uma banda de água é inserida no capilar por pressão antes da introdução da amostra (**Figura 31**). A amostra pode ser injetada por injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. Quando a voltagem é aplicada forma-se uma região de alto campo elétrico na banda de água que é maior que no restante da solução. Os íons migram através da zona de amostra e são acelerados na região da banda de água. Quando estes íons ultrapassam o limite entre a zona de água e o tampão de corrida, eles encontram um campo elétrico menor e são desacelerados se concentrando em um banda fina no limite entre estas duas regiões [31]. Assim que os campos elétricos são igualados, os analitos são separados

normalmente. A injeção desta pequena banda de água garante um elevado campo elétrico local no ponto de injeção [34]. Uma consequência desta estratégia é a injeção seletiva de íons [35]. É possível melhorar a seletividade e a velocidade de separação pela introdução de espécies exclusivamente catiônicas ou aniônicas. A inclinação dos picos esperada para injeção eletrocinética é reduzida (porém não eliminada) e podem ser empregadas voltagens maiores na injeção.

Figura 31: Esquema representativo do "stacking" em campo amplificado.

O mecanismo de compressão do pico é similar ao "stacking" mediado por força iônica e à isotacoforese. A banda de água diferencia a forma da compressão do pico em relação ao "stacking" convencional. O comprimento da banda de injeção pode ser estimado por [30]:

$$X_i = \left(\frac{\mu_{eo}}{r} + \mu_{ep} \right) Et \quad [14]$$

onde r = razão das resistividades do eletrólito suporte e a solução de injeção.

Para a injeção eletrocinética convencional $r = 1$. Então em campo amplificado, o impacto do fluxo eletroosmótico sobre a largura da banda é reduzido. Neste caso, voltagens e tempos de injeção maiores podem ser utilizados sem comprometer a resolução (sem proporcionar alargamento de banda).

3.2.1 – Avaliação do “Stacking” eletrocinético

Para as análises em campo amplificado partiu-se de uma amostra de Tracur® já dissolvida em água (1:50). Como o interesse era acompanhar a pré-concentração do pico da laudanosina (e não a separação dos isômeros), a amostra foi injetada em tampão fosfato 60 mmol/L (pH 2,5), sem aditivos. A **Figura 32** mostra que a injeção de uma pequena banda de água (5s por pressão) antes da eletroinjeção da amostra, proporcionou um aumento razoável do pico das impurezas. É interessante notar que apesar do tempo de injeção da amostra ser o mesmo nos dois casos (2 segundos utilizando 5 kV), ocorreu uma pequena diminuição no tempo de migração da amostra injetada em campo amplificado, devida à introdução da banda de água.

Figura 32: Eletroferograma de uma amostra de Tracur® mostrando o “stacking” em campo amplificado (5s de injeção por pressão de água) antes da eletroinjeção da amostra. Condições: equipamento P/ACE, fosfato 60 mmol/L (pH 2,5), capilar de sílica fundida (75 μ m i.d. x 67,0 cm de comprimento total (60,0 cm até o detector)), detector PDA (211 nm), temperatura: 25 °C, voltagem de corrida: +20 kV, tempo de injeção da amostra: 2s, 5 kV. Legenda: vide Figura 31.

Foram feitas algumas injeções de Tracur® e acompanhou-se a reprodutibilidade do tempo de migração para a laudanosina em campo amplificado (injetando 5s de água) e sem a injeção da água antes da eletroinjeção da amostra (**Figura 33**). As amostras injetadas em região de campo amplificado tiveram tempos de migração menores, pois a banda da amostra se encontra mais próxima do detector.

Figura 33: Variação do tempo de migração da laudanosina devido ao aumento do tempo de injeção em campo amplificado injetando 5s de água, e sem injetar água antes da amostra.

Uma das formas de se aumentar a sensibilidade é aumentar o tempo de injeção da amostra. Porém, este aumento é acompanhado pela perda da resolução, pois ocorre um efeito de alargamento dos picos que é proporcional ao aumento do tempo de injeção [34]. Quando se emprega tempos de injeção menores, a largura do pico é dominada por difusão, já para tempos de injeção maiores, ela é dominada pelo comprimento da banda da amostra e aumenta linearmente quanto maior o tempo de injeção [33], piorando a resolução entre bandas eventualmente separadas.

Foi acompanhada a variação na resolução entre o picos de duas impurezas do Tracur® quando aumentou-se o tempo de injeção da amostra sem aplicar banda de água e injetando água durante 5s antes da introdução da amostra (**Figura 34**). Podemos observar que em campo amplificado a perda da

resolução entre os picos é menos pronunciada para tempos de injeção maiores. Isto é possível porque para amostras injetadas em campo amplificado, há uma contração das bandas, independente do tempo de injeção da amostra. Estas bandas passam pelo detector sem sofrerem alargamento, garantindo uma alta resolução [33].

Figura 34: Variação da resolução entre os picos de duas impurezas do Tracur® devida ao aumento do tempo de injeção em campo amplificado (5 s de água) e sem injetar água antes da injeção da amostra.

Foi avaliado também o aumento do tempo de injeção da banda de água. Este efeito foi acompanhado pela observação da área da laudanosina na amostra de Tracur® (**Figura 35**). O tempo de injeção da amostra de Tracur® foi mantido em 2s utilizando injeção eletrocinética (5 kV) e aumentou-se o tempo de injeção da banda de água (injetada por pressão). Observou-se que ocorreu um pequeno aumento da área do pico da laudanosina com a introdução de 5s de água. Em injeção eletrocinética, quando a voltagem é aplicada, os íons de maior mobilidade migram primeiro que os íons de menor mobilidade para dentro do capilar [29, 32]. Quando se utiliza campo amplificado (a injeção da água garante um campo elétrico elevado no ponto de injeção), estes íons são acelerados na banda de água e se concentram no limite entre a banda de água e o tampão. Ocorre então um aumento da área da amostra que é devido a introdução de uma maior quantidade de íons com alta mobilidade no capilar [8]. Foi estudado o efeito do aumento da banda de água

sobre a sensibilidade. Foram injetadas bandas de água entre 5 e 40 segundos e verificou-se que o ganho foi maior quando aumentou-se o tempo da injeção de água para 10s, mas sofreu uma ligeira queda com o aumento até 25s, mantendo-se constante até 40s. Este decréscimo na sensibilidade está associado à força do campo elétrico. A magnitude do campo elétrico é resultado da voltagem aplicada e do comprimento da banda de água [31]. Se a voltagem é mantida constante, quanto maior for o comprimento da banda de água, menor será o campo elétrico naquela região [3,8]. Sendo assim, os íons terão uma velocidade de migração menor dentro da banda de água e se concentrarão em menor quantidade na interface até que um estado estacionário seja atingido.

Figura 35: Variação do aumento de sensibilidade para a laudanosina em amostras de Tracur® devido ao aumento do tempo de injeção de água em campo amplificado

3.3 - “Stacking” por injeção em grande volume.

Quando se trabalha com amostras muito diluídas, às vezes é necessário injetar uma quantidade maior de amostra no capilar para garantir boa sensibilidade. Neste caso, o campo elétrico através da banda de amostra muda, mas o campo elétrico total permanece constante. Como a força do campo elétrico está concentrada praticamente na banda da amostra, o campo elétrico no tampão de corrida é praticamente zero. Quando os solutos alcançam o tampão de corrida, sua velocidade chega quase a zero e eles são

conduzidos pelo eof, o qual é dominado pela velocidade eletroosmótica da banda de amostra. Como consequência disto, os solutos não são separados. Quanto maior o volume injetado, maior é o alargamento das bandas de acordo com a equação:

$$V_{inj} = QV_{coluna} / N^{1/2} \quad [15]$$

Onde: V_{inj} é o volume de injeção

V_{coluna} é o volume da coluna

Q = fração de alargamento de pico permitida

N = número de pratos para a separação.

A melhor resolução é quando o comprimento da banda de amostra é menor do que 1% do comprimento total do capilar [31]. Quando se injeta grandes volumes também ocorrem diferenças significativas na condutividade entre a banda da amostra e o tampão de corrida. Formam-se altas temperaturas na banda de amostra (mais diluída). Vinther e Solberg [36] reportaram temperaturas de quase 100°C nesta banda. Estas altas temperaturas podem causar decomposição térmica de alguns solutos e até mesmo efervescência da amostra [31]. Para resolver estes problemas Chien e Burgi desenvolveram uma estratégia de “stacking” para injeções de grandes volumes [9].

Neste tipo de “stacking”, o capilar inteiro ou uma grande parte dele é preenchido com a amostra que é injetada por pressão (Figura 36). O fluxo eletroosmótico foi invertido para dirigir os solutos catiônicos para o polo positivo e assim, o tampão entrou no capilar pelo lado do detector. Como o fluxo eletroosmótico é sempre de maior magnitude que o fluxo eletroforético, os íons são “empurrados” de volta ao ponto de injeção sendo concentrados no limite entre a zona da amostra e o tampão de corrida. Isto é acompanhado pela leitura da corrente elétrica. Quando o valor da corrente atinge 95-99% do valor inicial da corrente do tampão de corrida (medida anteriormente), a polaridade é invertida e os analitos são separados [30].

Figura 36: Esquema representativo do "stacking" por injeção em grande volume.

3.3.1 – Avaliação do "Stacking" por injeção em grande volume

Para o caso de cátions, aplica-se primeiramente uma voltagem positiva no polo de injeção (após a introdução da amostra no capilar) e os íons começam a migrar para o eletrodo negativo. Como a laudanosina nas formulações de besilato de atracúreo está protonada (catiônica), para utilizar esta estratégia foi preciso trabalhar em fluxo eletroosmótico invertido. Para inverter o fluxo eletroosmótico normalmente são adicionados surfactantes ao eletrólito [37,38]. Neste estudo foi adicionado um surfactante catiônico: brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ao tampão de fosfato. Como o fluxo foi invertido, a ordem de eluição dos compostos também foi invertida (**Figura 37**). Podemos observar que as impurezas (que tinham um tempo de migração maior) foram detectadas antes dos isômeros. Neste caso não foram adicionados aditivos como β CD e uréia ao eletrólito pois o interesse era verificar se houve aumento de sensibilidade em relação ao pico da laudanosina e não promover a separação dos isômeros. Podemos observar através da

Figura 37, que houve um ganho em sensibilidade quando se efetuou o “stacking”. Houve uma pequena variação do tempo de migração dos compostos.

Figura 37: Amostra de tricur® injetada em fluxo invertido com e sem “stacking” por injeção em grande volume. Condições: equipamento Perkin Elmer, tampão fosfato 60 mmol/L + 0,1 mmol/L CTAB, detecção 211 nm, temperatura: 25 °C, voltagem de corrida: -25 kV, tempo de injeção da amostra: 10s, 169 mBar. Legenda: *vide* Figura 31.

3.4 – Isotacoforese Transiente (tITP).

A isotacoforese (ITP) é uma modalidade da eletroforese capilar que difere da eletroforese em solução livre (CZE) no fato que em CZE o sistema de eletrólitos é contínuo, ou seja, coloca-se o mesmo eletrólito nas duas extremidades do capilar, já em isotacoforese ele é descontínuo, sendo necessário utilizar dois eletrólitos distintos [29,18]. A escolha dos eletrólitos é fundamental para o sucesso da isotacoforese. A amostra é inserida entre duas soluções, de mobilidade iônica cuidadosamente selecionada, o eletrólito líder e o eletrólito terminador [37]. O nome “isotaco” vem do grego e significa “mesma velocidade”. Os íons com mobilidades distintas se separariam formando bandas individuais. Já as bandas com mobilidade maior, conduziriam as outras bandas, ditando a velocidade do sistema [29].

Tanto solutos catiônicos quanto aniônicos podem ser analisados por esta estratégia, desde que em misturas distintas; temos assim a ITP catiônica e a ITP aniônica, respectivamente.

Existem duas características marcantes em isotacoforese: a formação de um estado de equilíbrio em que todas as bandas migram com a mesma velocidade, adjacentes umas às outras, e o fato de que cada banda é essencialmente focalizada, sendo a focalização resultante da normalização da velocidade. Quando a voltagem é aplicada, os solutos migram com a mesma velocidade (isotacoforética) (**Figura 38**). Os cátions do tampão líder tem mobilidade maior, mas se movem com a mesma velocidade que qualquer um dos cátions da amostra, pois campos elétricos locais de magnitudes diferentes ocorrem em cada banda. Os cátions da amostra vão se arranjando na ordem de suas mobilidades, neste caso, da maior para a menor. Após algum tempo é alcançado o equilíbrio e os solutos se distribuem no capilar, migrando com o tampão para o detector [37]. Os íons presentes em baixa concentração formariam bandas finas durante a isotacoforese e os íons de concentração maior apresentariam bandas alargadas, sendo o comprimento de cada banda proporcional à quantidade de íon individual na amostra original [29,39].

Figura 38: Representação esquemática da isotacoforese capilar

A isotacoforese transiente (tITP) é um método de pré-concentração que combina a isotacoforese (ITP) e a eletroforese de zona (CZE) em um único capilar [40]. A ITP-CZE (ou tITP) foi primeiro reportada por Verheggen e co-autores [14], sendo uma estratégia relativamente simples, de fácil automação e aplicável em todos os equipamentos comerciais.

Um dos modos de se realizar a tITP é estabelecer as condições de ITP primeiramente injetando um eletrólito líder que tenha uma mobilidade maior do que os analitos de interesse, antes da injeção da amostra [37]. O eletrólito terminador, o qual deve ter a mobilidade menor que os analitos de interesse é injetado depois da banda de amostra. Inicialmente, se existem as condições adequadas de eletrólito líder e terminador, a amostra se pré-concentraria como em isotacoforese, de acordo com a função de Kohlrausch [40]. Neste tipo de isotacoforese, após a etapa de focalização das bandas, o eletrólito terminador é trocado pelo tampão de corrida e os analitos são separados por CZE convencional (**Figura 39**). Os componentes são então pré-concentrados durante o passo de ITP e analisados durante a CZE. Esta estratégia é denominada transiente porque o mecanismo de migração dos solutos no capilar muda da ITP para CZE.

Figura 39: Esquema geral da separação de dois compostos (A e B) em isotacoforese transiente TE= eletrólito terminador, LE= eletrólito líder. BGE= eletrólito de corrida. (A) condições de injeção inicial, (B) pré-concentração por ITP, (C) transição entre a ITP e a CZE, (D) predominância do processo de separação por CZE.

A combinação destes dois modos pode ser realizada no mesmo capilar ou em capilares acoplados, sendo possível injetar grandes volumes de material diluído. O uso de um único capilar é mais interessante, pois a tITP pode ser realizada em instrumentos convencionais de eletroforese, eliminando os problemas de acoplamento de capilares. A detectabilidade pode ser maior que 10^3 vezes e o LOD da ordem de 10^{-9} mol/L [41].

Um parâmetro importante com respeito ao tempo de focalização isotacoforética é a quantidade de carga elétrica (Q_s) que passa através da coluna. O tempo de focalização em ITP de dois componentes A e B pode ser relacionado diretamente a Q_s , dependendo da quantidade de íons introduzidos (n) e das suas mobilidades (μ):

$$Q_s = \frac{F \cdot n_a \mu_a (1 - \mu_R/\mu_a) + n_b \mu_b (1 - \mu_R/\mu_b)}{\mu_a - \mu_b} \quad [16]$$

onde: μ_a e μ_b representam as mobilidades absolutas ou iônicas dos componentes A e B.

n_a e n_b é a quantidade de íons de cada componente A e B

F é a constante de Faraday

μ_R é a mobilidade absoluta do contra-íon, R.

A carga que passa pela coluna, antes da banda da amostra alcançar o detector é obtida pela expressão:

$$Q_1 = F n_1 (1 - \mu_R / \mu_1) \quad [17]$$

onde: n_1 é a quantidade de íons do eletrólito líder no capilar.

Um aumento na quantidade ou na mobilidade dos íons líder, ou em ambos, resultaria num aumento da condutividade elétrica e uma baixa queda de potencial sobre a banda do tampão líder. Consequentemente, o E na banda do terminador e da amostra é aumentado, e, por esta razão, ou a amostra é focalizada num tempo menor, ou podem ser introduzidos grandes volumes de amostra. Para encontrar este estado estacionário antes das bandas da amostra

alcançarem o detector ou deixarem o capilar, a Q_1 deveria ser ao menos igual à carga de separação. Isto é de particular importância nas separações em CITP-CZE, porque o tempo e o comprimento do canal de separação necessário para a focalização em ITP afetam a separação por CZE. Por isto, o tempo e a separação em CZE é limitado pelo comprimento da banda de amostra introduzida. Se esta banda é muito grande, o caminho de separação e o campo elétrico são reduzidos, o que pode resultar numa diminuição da resolução. Deve ser feito um compromisso entre a resolução e o preenchimento do capilar, quando se injetam grandes volumes de amostra. Por exemplo, para um capilar de 75 μm , 30-50% da coluna poderia ser preenchida (o que equivale a 1 μL), a fim de manter uma boa separação e eficiência. O tempo de focalização da ITP deveria estar no intervalo de 5-10 min, e a separação em CZE deveria ocorrer em 1-5 min [14].

Existem diferentes maneiras de se criar um sistema tampão descontínuo para que ocorra a concentração isotacoforética no início da separação [12]. Uma delas é a que utiliza o sistema com dois tampões diferentes (**Figura 40-A**). Neste caso, o capilar é preenchido com um eletrólito de baixa mobilidade, que age como terminador e na frente da amostra é injetada uma banda de um eletrólito que tenha alta mobilidade, o qual agiria como líder. A concentração da amostra é então adaptada à concentração do eletrólito líder. Como a banda do líder é injetada após uma banda de baixa mobilidade, ele mesmo migra eletroforéticamente na banda do terminador e se move para longe dos íons da amostra. Os analitos são separados por CZE no eletrólito terminador. O arranjo inverso, quando o capilar é preenchido com o líder e a banda do terminador é injetada a seguir, também levaria à pré-concentração dos analitos.

Outro método de isotacoforese usado quando uma separação requer um pH extremo é injetar a amostra entre uma banda de OH^- e H^+ (**Figura 40-B**) [12, 41]. Neste caso, quando a voltagem é aplicada, as bandas de ácido e base migrariam uma contra a outra, formando uma região de baixa condutividade no meio da banda de amostra, ou seja, o campo elétrico na banda de amostra se tornaria maior do que no restante da coluna devido à maior resistência. Este campo elétrico descontínuo resultaria numa diminuição na velocidade dos íons

da amostra quando estes cruzam o limite estacionário amostra/tampão, levando à pré-concentração dos íons. Os picos seriam assimétricos devido ao fato que a focalização da amostra ocorre apenas num lado da zona e não em ambos. Outro problema com amostras de baixa condutividade é a geração de calor excessivo na banda da amostra devido ao alto campo elétrico que pode degradar termicamente alguns ou todos os componentes da amostra [41]. Deve-se tomar cuidado para não injetar bandas de OH^- e H^+ muito longas.

Figura 40: Representação esquemática da isotacoforese transiente: (A) sistema de pré-concentração utilizando dois tampões diferentes, (B) sistema de pré-concentração utilizando um único tampão.

3.4.1 – Avaliação da isotacoforese transiente

Inicialmente, pensamos em utilizar como eletrólito terminador um composto que tivesse estrutura semelhante à laudanosina, mas com uma mobilidade menor. A **Figura 41** mostra as estruturas químicas de alguns dos compostos que foram avaliados como eletrólito terminador para isotacoforese transiente. Foram testados dois compostos de estrutura parecida com a laudanosina: o cloreto de benziltributilamônio (Massa Molecular 311,94 g/mol) e o cloreto de hexadecilpiridinium (Massa Molecular 358,01 g/mol), pois estes compostos também são aminas quaternárias. Eles foram injetados na mesma condição de análise do besilato de atracúreo para verificar se a sua mobilidade era menor que a das impurezas presentes na amostra, porém, estes dois compostos apresentaram mobilidade maior que as impurezas nas condições experimentais determinadas. Foi sintetizado então um quaternário de amônio (N-butil-tetrahidropapaverina) com um grupamento butil ao invés de um metil (laudanosina). Como a massa molecular do quaternário era maior (Massa Molecular 400,45 g/mol), achamos que sua mobilidade seria bem menor e que ele sairia com um tempo de migração bem maior que a laudanosina, o que não ocorreu. O pico do quaternário saiu ao lado do pico da laudanosina e como ele também absorvia no comprimento de onda de trabalho, quando realizássemos a pré-concentração, teríamos um aumento de sinal do eletrólito, o que provavelmente iria impedir a visualização da laudanosina.

Figura 41: Estruturas dos compostos que foram testados como eletrólito terminador para tITP.

Foram testados então outros compostos que não apresentavam absorção no comprimento de onda de 200 nm (λ de absorção da laudanosina). A **Figura 42** mostra a injeção de 30s (pressão) do padrão de laudanosina utilizando como eletrólito de corrida tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ác. 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES), ácido glutâmico (GLUT), fosfato de sódio (FOSF), e acetato de amônio (NH_4Ac), cada um preparado na concentração de 10 mmol/L. Podemos observar que nenhum destes compostos apresentou absorção no comprimento de onda de análise (200 nm), podendo então ser utilizados como eletrólito terminador. Em TRIS e em FOSF, observamos que o

pico da laudanosina se mostrou mais alargado do que nos outros eletrólitos, onde tivemos picos mais finos e com intensidade maior. Este efeito de alargamento normalmente é observado quando se trabalha com eletrólitos que tenham uma mobilidade muito diferente da amostra. Quanto menor a diferença de mobilidade entre o eletrólito de corrida e a amostra, mais fino o pico [37].

Figura 42: Injeção de laudanosina em diferentes eletrólitos avaliados para isotacoforese. Concentração de cada eletrólito = 10 mmol/L. Condições de análise: equipamento HP ^{3D}CE, voltagem de corrida +20 kV, detecção 200 nm, injeção 30s, 50 mBar.

Um outro sistema interessante discutido na literatura para isotacoforese catiônica é o que usa HCl 10 mmol/L (pH 2,0) como líder e a mesma concentração de TRIS (pH 8,5) como terminador [37]. A **Figura 43** mostra os resultados obtidos para o padrão de laudanosina. Como a largura do pico é função do tempo de injeção e tempos muito grandes de injeção levam a uma perda de eficiência maior num sistema sem “stacking”, foi injetada uma amostra de laudanosina a 30s por pressão para compará-la à mesma injeção utilizando uma banda de HCl antes ou depois da injeção da amostra, a fim de se observar a diminuição da largura do pico. A TRIS foi utilizada como eletrólito terminador (TE). Primeiramente o capilar foi preenchido com a TRIS, depois foi realizada as injeções na ordem dada na **Figura 44**, e então a voltagem foi aplicada utilizando TRIS como BGE. Observando a altura e a largura dos picos obtidos e a área dos mesmos, concluímos que não ocorreu a isotacoforese como previsto.

Figura 43: Isotacoforese: utilização de HCl 10 mmol/L (pH 2,0) como LE e TRIS 10 mmol/L (pH 8,5) como TE. Condições de análise: em todos os casos, o tampão de corrida = TRIS 10 mmol/L, equipamento HP ^{3D}CE, voltagem de corrida 20 kV, detecção 200 nm. Condições de injeção: (A) laudanosina (30s, 50 mBar); (B) injeção de laudanosina (30s, 50 mBar) e de HCl (20s, 5kV); (C) injeção de HCl (20s, 5kV) e de laudanosina (30s, 50 mBar).

Foi realizado então um estudo com relação à mobilidade dos tampões a serem utilizados como eletrólito líder e terminador na isotacoforese. Os compostos avaliados e suas respectivas mobilidades efetivas a pH 2,5 são mostrados na **Tabela XI**. Foi escolhido o pH 2,5 porque este é o pH usual do tampão de corrida para a análise do Tracur®. Os cálculos foram efetuados utilizando um simulador de separações eletroforéticas desenvolvido no laboratório [42]. Os dados de mobilidade iônica, pK_a e pK_b foram encontrados na literatura [43]. A mobilidade em pH 2,5 para a laudanosina e o quaternário de amônio sintetizado foram calculadas através da equação [18]:

$$(\mu_{ef})_i = \frac{L_{det} L_{tot}}{t_i V} \quad [18]$$

onde $(\mu_{ef})_i$ = mobilidade efetiva em pH 2,5, L_{det} = comprimento do capilar até o detector (cm), L_{tot} = comprimento total do capilar (cm), t_i = tempo de migração do composto iônico em pH 2,5, V = voltagem de corrida.

Tabela XI: Mobilidade efetiva em pH 2,5 de alguns compostos avaliados para eletrólito terminador.

no.	Composto	μ em pH 2.5 ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)
1	H^+	362,50
2	OH^-	-205,50
3	Cl^-	-79,10
4	Acetato	-0,23
5	Aspartato (ASP)	6,31
6	Glutamato (GLUT)	8,60
7	Fosfato (FOSF)	-24,77
8	ϵ -ác.aminocapróico (EACA)	28,90
9	Ácido 2- (N-morfolino) etanosulfônico (MES)	-0,01
10	3,5-dinitrobenzóico	-9,43
11	Glicina (cloridrato)	37,40
12	Sal de Amônio	75,67
13	Tris(hidroximetil) aminometano (TRIS)	29,49
14	Laudanosina (cloridrato)	23,3
15	N-butil-tetrahidropapaverina	23,1

As mobilidades efetivas de ácidos e bases fracos são fortemente dependentes do pH da solução. Para os cálculos de mobilidade efetiva a um pH desejado utilizam-se os valores de mobilidade iônica (tabelado na literatura), que são normalmente expressos em $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. As mobilidades do H^+ e do OH^- , em água, são as maiores de todas. O sinal positivo indica que se trata da mobilidade de cátions e o negativo de ânions, porém para efeito de cálculos, costuma-se trabalhar com valores de mobilidade de magnitude absoluta, o que permite uma comparação direta entre os valores [44]. A mobilidade da laudanosina em pH 2,5 foi de $23,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Isto indica que neste pH, para servir como eletrólito terminador, deveríamos escolher um composto com mobilidade menor que 23,3.

A **Figura 44** mostra a curva de mobilidade (obtida no simulador) para os compostos avaliados. Podemos notar que os tampões mais adequados para trabalhar como eletrólito líder são a glicina, a Tris(hidroximetil) aminometano e o ácido aminocaprílico, pois, além destes compostos terem mobilidade maior que a da laudanosina (**Tabela XI**), suas curvas se encontram mais próximas ao valor de mobilidade em pH 2,5 da mesma, evitando distorção de picos. Como eletrólito terminador os ácidos aspártico e glutâmico seriam os mais adequados, pois além das suas curvas estarem também próximas ao valor da mobilidade da laudanosina, estão também na região catiônica.

Figura 44: Curva de mobilidade para alguns compostos avaliados como eletrólito para tITP.

A **Figura 45** apresenta os eletroferogramas de uma amostra de laudanosina (padrão) analisada em isotacoforese transiente utilizando para TE o ácido glutâmico e a para LE a Tris(hidroximetil) aminometano. Foi utilizada como amostra a laudanosina porque os resultados desta estratégia para o Tracur® não foram satisfatórios. Foram realizadas injeções de laudanosina (padrão) utilizando concentrações iguais de GLUT e TRIS (10 mmol/L) a pH 2,5, mas os resultados não foram bons. O melhor resultado obtido foi quando utilizou-se uma concentração de TRIS de 60 mmol/L (pH 5,0), mantendo-se a concentração do GLUT em 10 mmol/L (pH 2,5). Em pH 5,0, a TRIS continua agindo como eletrólito terminador (**Figura 44**). O aumento de sinal obtido neste caso foi de aproximadamente 20 vezes (**Figura 45-A**). O pico da laudanosina, sem pré-concentração (**Figura 45-B**), saiu num tempo menor que a pré-concentrada, pois a banda de amostra injetada foi maior (30s).

Figura 45: Isotacoforese: utilização de TRIS como LE e GLUT como TE . Condições: equipamento HP ^{3D}CE, tampão de corrida = GLUT (10mmol/L) pH 2,5, voltagem de corrida 20 kV, detecção 200 nm. Condições de injeção: (A) injeção de TRIS 10 mmol/L, pH 5,0 (10s, 50 mBar) e laudanosina (10s, 50 mBar), (B) injeção de laudanosina (30s, 50 mBar). Legenda: 1- laudanosina.

Normalmente analisamos o Tracur® em tampão fosfato de sódio, pH 2,5 obtendo picos com bom perfil. Como trabalhamos em pH baixo, resolvemos testar a pré-concentração da amostra, injetando-a entre uma banda de ácido e base, como esquematizado na **Figura 40-B**. Os resultados são mostrados na **Figura 46**. Primeiramente foram feitas as diluições de uma amostra de tracrimum® até sinal/ruído (S/R) igual a 3, o que foi conseguido com 1 mg/L e injeção de 3s (**Figura 46 A-C**). A injeção de uma banda de OH⁻ e H⁺ durante 4s permitiu a injeção de um volume maior de amostra (tempo de injeção = 100s), garantindo uma pré-concentração, sem perda na resolução (**Figura 46 D**). Como o OH⁻ e o H⁺ estão migrando um para o outro, é formada uma banda de baixa condutividade, observada pelo decréscimo da corrente no começo da separação (**Figura 46-E**). Tanto o OH⁻ quanto o H⁺ podem agir como eletrólito terminador, levando à concentração isotacoforética dos analitos. Quando se injetou bandas maiores de ácido e base (acima de 6s), a pré-concentração não foi obtida. Neste caso, era obtido no eletroferograma um único pico de alta intensidade com t_{migr} de 2,7-3,0 min, provavelmente correspondente à formação da banda de baixa condutividade. Quando esta banda atingia o detector, ocorria uma variação no índice de refração, com a detecção deste pico.

Figura 46: Isotacoforese: utilização de ácido e base. Condições de análise: equipamento HP ^{3D}CE, tampão fosfato de sódio (20mmol/L) pH 2,5, voltagem de corrida 25 kV, detecção 200 nm. Todas as amostras foram injetadas sob pressão (50 mBar). Condições de injeção: (A) tracrimum® 10 mg/L (t_{inj} 3s), (B) tracrimum® 2 mg/L (3s), (C) tracrimum® 1 mg/L (3s), (D) NaOH 0,1 mol/L (4s) + tracrimum® 1 mg/L (100s) + H₃PO₄ 0,1 mol/L (4s), (E) traçado da corrente elétrica da corrida D. Legenda: 1-3 isômeros do atracúreo, 4- laudanosina.

4 - ESTRATÉGIAS BASEADAS NA GEOMETRIA DO CAPILAR

4.1 - Cella HS

Neste tipo de geometria de cela o capilar é expandido num formato em Z no ponto de detecção, aumentando a área de contato entre a luz e a amostra, ou seja, o caminho óptico (**Figura 47**). O fator mais crítico em desenhar uma interface óptica para detecção por absorbância é a capacidade de focalizar a luz dentro da abertura central do capilar. Bruin *et al.* [45] compararam vários desenhos de interface e avaliaram a sua performance com respeito a sensibilidade, ruído e linearidade. Sua avaliação, tão bem como o trabalho conduzido por Chervet e co-autores [26] mostraram que o caminho óptico estendido no qual o capilar era curvado numa configuração em forma de Z poderia resultar em um aumento significativo no sinal. Eles manufaturaram celas em Z com 3 mm de caminho óptico, contudo, o aumento de sensibilidade foi apenas da ordem de 5 vezes devido ao aumento no nível do ruído de fundo.

Figura 47: Esquema representativo de uma cela HS.

Um desenho simples que tem sido utilizado em detectores comerciais para CE consiste de uma fenda óptica para iluminação transversa de uma seção do capilar. A teoria foi discutida em detalhes por Moring e co-autores [46]. O caminho óptico (Λ) é definido pela integração do comprimento do raio através da abertura do capilar entre os limites da fenda, onde o comprimento médio para um capilar com um raio interno (r) dado é simplificado a:

$$\Lambda = \pi r / 2 \quad [19]$$

Um aumento na área de iluminação longitudinalmente ao longo do capilar não resulta num aumento na absorbância. Contudo, isto traz melhoramento na transmissão da luz, diminuição do ruído do detector e aumento na razão sinal/ruído.

O comprimento óptico pode ser estendido significativamente, se a focalização óptica é usada e a luz canalizada a aproximadamente um comprimento radial (Λ_T) no plano transversal, onde Λ_T é aproximadamente $2r$. Para isto, uma lente esférica feita de safira tem sido usada (índice de refração de 1,91 com 66% de transmitância a 200 nm) [46].

Em qualquer geometria de cela de detector, temos sempre um volume finito de fluido em contato com o detector a um dado tempo. Normalmente o intervalo de concentrações detectadas para um capilar cilíndrico é da ordem de $10^{-5} - 10^{-7}$ mol/L. O melhoramento óptico da cela em Z com lente de quartzo e 3 mm de caminho óptico proporciona mais que uma ordem de aumento de magnitude no sinal ruído (10^{-8} M) [46].

4.1.1 – Avaliação da Cela HS

Com o objetivo de se verificar o aumento de sensibilidade para um mesmo composto utilizando diferentes estratégias, foi analisada uma amostra de Tracur® em cela HS em comparação a um capilar normal (**Figura 48**). Pode-se observar através do eletroferograma o aumento do sinal tanto dos isômeros quanto do pico da laudanosina. Quando se utiliza a cela HS, ocorre um aumento no ruído de fundo. Este aumento não afetou a resolução entre os picos, porém, se considerarmos a relação sinal/ruído, este aumento no ruído foi considerável e afetou o ganho em sensibilidade.

Figura 48: Amostra de Tracur® analisada em capilar normal e em cela HS. Condições: equipamento Perkin Elmer, tampão fosfato de sódio 60 mmol/L + 20 mmol/L β CD + 4 mol/L de uréia, voltagem de corrida 20 kV, detecção 200 nm, injeção 1s, 169 mBar. Legenda: 1 - *trans-trans*, 2 - *cis-trans*, 3- *cis-cis*, 4- laudanosina.

5 – EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Uma outra estratégia para melhorar a sensibilidade em CE, permitindo a injeção de grandes volumes de amostra, é o uso de adsorventes cromatográficos dentro do capilar de sílica para a pré-concentração seletiva de analitos específicos [47-50]. Esta estratégia pode ser dividida em dois modos: um utiliza uma fase adsortiva que pré-concentra com baixa seletividade relativa, por exemplo: sílica em fase reversa (C18), podendo obscurecer os analitos de interesse que estiverem em baixa concentração, e outro que utiliza uma fase adsortiva que interage com alta seletividade e afinidade para um analito específico dentro de uma matriz (ex. suportes que exibem propriedades imunológicas específicas) [51]. Neste sentido, uma série de artefatos de microextração em fase sólida denominados concentradores de analito tem sido desenvolvidos para a pré-concentração seletiva e não seletiva em linha com a CE [22].

Várias estratégias tem sido descritas para o posicionamento de uma pequena seção de material de empacotamento (sílica, membranas impregnadas, microcanais recobertos, esferas recobertas com material adsorvente, esferas magnéticas, etc.) [19] dentro do capilar de eletroforese, para capturar os componentes da amostra dentro do concentrador (**Figura 49**). Num passo subsequente, um eluente é percolado através do empacotamento para remover o material adsorvido do canal de enriquecimento. O eluente pode ser composto de vários solventes: um pequeno volume de solvente orgânico, uma solução com força iônica maior, um tampão contendo aditivos especiais, etc. A proposta do canal de enriquecimento é permitir que um grande volume de amostra ($> 50 \mu\text{L}$) seja introduzido no capilar para depois ser eluído num pequeno volume ($< 50 \text{ nL}$) para a separação por CE dos analitos concentrados. Esta estratégia de extração em fase sólida em linha permite o melhoramento do LOD da ordem de 100-5000 vezes, dependendo do volume de amostra injetada [19].

Figura 49: Representação esquemática da SPE-CE. (A) pré-concentrador antes da introdução da amostra, (B) pré-concentrador depois da introdução da amostra, mostrando os analitos retidos na fase sólida, (C) eluição dos analitos com o solvente orgânico, (D) início da eletroforese mostrando o "stacking" dos analitos, (E) os analitos migram para fora da banda de eluição e se separam na fase aquosa.

Uma das limitações dos concentradores é que o uso dos solventes orgânicos requeridos para remover os analitos pode provocar alargamento das bandas, perda da eficiência de separação e comprometimento da resolução. Além disto deve-se tomar cuidado para o tampão não induzir a dessorção prematura do analito antes da aplicação da voltagem. Um outro problema é a construção de cartuchos reproduzíveis devido às dificuldades em produzir um empacotamento do material sólido consistente. O volume morto necessário para preencher o concentrador induz uma pressão de retorno que reduz o fluxo hidrodinâmico dentro do capilar, resultando num EOF reduzido e anormal que leva a não reprodutibilidade dos tempos de migração [47]. Para evitar este problema, alguns autores utilizam membranas impregnadas com a fase sólida [19].

Concentradores preenchidos com C18 ou material similar foram comercializados pela Millipore em 1993 e seu uso foi citado por Swartz e Merion [50], mas estes não se encontram disponíveis comercialmente, e a maioria dos autores confecciona seus próprios concentradores.

5.1 - Confeção dos concentradores

Neste trabalho foram avaliados apenas concentradores empacotados com C18. Eles foram confeccionados de duas formas:

(A) Os concentradores foram preparados tomando-se um pedaço (2 cm) de um tubo de teflon (75 μm de diâmetro interno e 367 μm de diâmetro externo) e inserindo um pequeno pedaço de membrana de Teflon (Zytex) no final do tubo. A membrana é cortada e inserida no teflon com a ajuda de uma agulha (sem ponta) de seringa hipodérmica. Este passo deve ser cuidadoso para que a membrana mantenha sua forma e permaneça no lugar. No próximo passo o tubo é preenchido com 3-4 mm de sílica (C18), manualmente. Uma nova membrana é inserida no tubo e cuidadosamente posicionada. São inseridos então dois capilares de sílica fundida (75 μm diâmetro interno e 365 μm de diâmetro externo), um de cada lado do tubo de teflon, sendo tomado cuidado para não comprimir a membrana e não arranhar a parede do tubo, o que poderia bloquear o cartucho e diminuir o fluxo hidrodinâmico. As partes são então coladas com uma cola epoxi e deixadas em repouso por 24 h (**Figura 50-A**). Após este período é necessário verificar se os concentradores não estão entupidos. Para isto, injeta-se água com uma seringa hipodérmica até que se observe a formação de uma gota de água do lado oposto.

(B) Um pequeno pedaço de capilar (100 μm de diâmetro interno) é cortado com aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento e empacotado totalmente com sílica (C18). Após, este capilar é inserido e posicionado no meio de um pequeno tubo de teflon (± 3 cm) com diâmetro interno de 300 μm . São colocadas duas membranas, uma de cada lado do teflon e inseridos dois capilares (75 μm diâmetro interno), também um de cada lado do tubo (**Figura 50-B**). Todo o sistema é colado e após 24 h verifica-se se ele não está entupido como descrito na parte A.

Figura 50: Representação esquemática do preparo dos concentradores em fase sólida. A – sílica empacotada diretamente no teflon. B- sílica empacotada dentro de um pedaço de capilar e todo o conjunto preso por um tubo de teflon.

A montagem dos concentradores deve ser realizada observando-se todos os passos num microscópio. O corte do capilar deve ser perfeito para que o mesmo não rompa a membrana e para que as conexões entre os capilares permita um fluxo contínuo. A **Figura 51** mostra a diferença entre um corte reto para o capilar e outro disforme. A sílica deve ser bem empacotada para que não se formem zonas prováveis de bolhas (**Figura 52**). Alguns autores utilizam uma bomba de HPLC para garantir que o capilar seja perfeitamente empacotado [49]. Os concentradores devem ser pequenos o bastante para não causarem alargamento de banda na separação por CE. A ativação da sílica é feita lavando-se o capilar com metanol ou acetonitrila e depois com o tampão de corrida [52].

Figura 51: Corte ideal para os capilares de um pré-concentrador.

Figura 52: Empacotamento adequado para um pré-concentrador. No caso, o material de recheio foi C18.

A **Figura 53 (A e B)** apresenta uma fotografia (obtida em microscópio) dos capilares confeccionados para este trabalho, mostrando o tubo de teflon, a membrana e os capilares. Para manter o material de preenchimento no lugar, ao invés da membrana, pode ser utilizada uma “frita” (sinterizando esferas de borosilicato no lugar apropriado) de modo que seja permitida a passagem de líquidos e materiais solúveis, num fluxo normal, sem reter os componentes da amostra [20]. Também podem ser utilizadas fibras de vidro ou membranas (como as de nitrocelulose ou polissulfonadas) [22]. No nosso caso, foi utilizada uma membrana porosa de teflon (tipo Zytex).

A

B

Figura 53: Fotografia em microscópio dos dois concentradores confeccionados para o trabalho.

5.2 - Avaliação dos concentradores

Os testes com os concentradores foram realizados num equipamento de eletroforese capilar HP ^{3D}CE (Agilent). Condições: capilar: 75 µm i.d. x 58,0 cm de comprimento total (50,0 cm até o detector), temperatura: 25 °C, detector: PDA a 211 nm. A voltagem de corrida, tempo e pressão de injeção da amostra foram variados. Este equipamento possui um sistema de pressurização externa que auxilia na introdução da amostra no capilar, visto que os capilares contendo concentradores promovem uma pressão de retorno induzida pelo segmento de capilar preenchido com a fase adsorvente.

Após instalado, o concentrador foi lavado com etanol por 10 min para remover qualquer bolha de ar remanescente no recheio. Para o condicionamento do concentrador foram testadas várias soluções de pré-tratamento. A melhor delas foi a que consistiu na lavagem por 2 min com uma solução contendo 50% de ACN em H₂O, seguida por 1 min de ACN pura e 2 min de H₂O. A amostra de laudanosina foi dissolvida em água e injetada com pressão de 50 mBar por períodos de 1 a 300s. O concentrador e o capilar foram então lavados para a retirada dos analitos não ligados, purgando (com o tampão ou com água) a alta pressão (2 Bar) por 1 min. Neste passo, o tampão não deve induzir a dessorção prematura dos analitos do concentrador antes de se injetar o solvente de eluição [52]. A eluição da amostra foi feita por injeção (a baixa pressão) de acetonitrila pura por 3-15 s. Foram também testadas diluições de acetonitrila em água a 20, 50 e 80%. O volume de solvente orgânico deve ser pequeno para evitar a redução do fluxo eletrosmótico e o comprometimento da performance da CE, embora isto tenha de ser contrabalanceado pois deve-se remover eficientemente todos os analitos do concentrador antes da eletroforese [25]. O potencial foi então aplicado e a separação foi conduzida.

A manufatura dos concentradores é crítica para um boa performance [53]. As conexões entre os capilares devem ser o mais perfeitas possíveis para se evitar a formação de bolhas que levam à queda de corrente. Como os

procedimentos de pré-tratamento necessitavam vários passos até a injeção da amostra, quando se aplicava a voltagem, a corrente sofria queda. Várias corridas foram perdidas. Para se evitar a formação de bolhas pode ser utilizada a adição de detergentes não iônicos (por exemplo, Nonidet P-40, Brij, etc) no tampão de corrida. A adição destes compostos parece prevenir a agregação do material de empacotamento e reduzir a formação de bolhas [22].

Para contornar este problema de queda de corrente, antes da injeção da amostra foi feito um condicionamento de 1 min com o tampão aplicando a voltagem de corrida. Quando conseguíamos manter a corrente no condicionamento, a amostra era injetada, e após aplicação da voltagem, a corrente se mantinha durante toda a corrida.

Primeiramente foi realizada a injeção de laudanosina empregando um concentrador confeccionado dentro de um tubo de teflon (como descrito na parte 5.1-A). Neste caso, a eluição dos analitos retidos foi feita empregando-se uma solução contendo 80% do tampão de corrida e 20 % de acetonitrila. Após várias tentativas de manter a corrente durante a eletroforese, obtivemos os eletroferogramas mostrados na **Figura 54**. O alargamento das bandas observado neste tipo de arranjo foi provocado provavelmente pela conexão entre os capilares e o tubo de teflon que continha a fase sólida. O tempo de migração da laudanosina variou quando foi realizada a eluição com ACN. Diferentes concentrações de ACN no eluente podem afetar a corrente e subsequentemente os tempos de migração dos compostos [50].

Figura 54: Amostra padrão de laudanosina injetada utilizando o concentrador. Condições de análise: tampão de corrida: fosfato de sódio 60 mmol/L (pH 2,5), detecção a 211 nm, voltagem de corrida 20 kV. Condições de injeção: injeção por pressão (50 mBar) durante 60s. (A) e (C) o capilar foi lavado com o tampão de corrida por 1 min e os analitos eluídos com uma solução contendo 80% do tampão e 20 % de acetonitrila antes da aplicação da voltagem. (B) mesmo que A e C, mas sem eluição dos analitos com solvente.

Uma melhor performance dos concentradores foi obtida com o arranjo descrito na parte 5.1-B. O preenchimento com a sílica diretamente dentro de um capilar que possui o mesmo diâmetro externo dos capilares de conexão resolveu os problemas de queda de corrente. Cuidados foram tomados para que o corte de todos os capilares fosse perfeitamente reto. Foi inserida uma membrana extremamente pequena no arranjo, apenas o suficiente para impedir a saída da sílica de dentro do concentrador.

A **Figura 55 A-B** apresentam uma amostra de Tracur® (a 10 e 2 mg/L) injetada em capilar sem concentrador, utilizando tampão fosfato de sódio 20 mmol/L (pH 2,5). Podemos identificar claramente o pico da laudanosina nos dois eletroferogramas. Foi utilizada uma concentração menor de fosfato a fim de gerar uma corrente mais baixa, para se evitar a sobrecarga do aparelho quando se emprega o concentrador. Os resultados obtidos com o concentrador instalado são mostrados na **Figura 55 C-E**. Após a injeção da amostra, o capilar foi lavado durante 180s com água (seguida de eletrólito) e aplicada a voltagem, sem a eluição com ACN (**Figura 55-C**). Os picos do Tracur® foram visualizados, mas em uma concentração muito baixa, pois a amostra deve ter ficado razoavelmente retida na fase sólida.

Um ponto importante a se determinar no método empregando concentradores é o volume e a proporção do solvente orgânico necessários para eluir os compostos do concentrador. A utilização de solvente orgânico pode ocasionar formação de bolhas quando a voltagem é aplicada [50]. Para eliminar este problema de bolhas, a quantidade de solvente orgânico injetada deve ser a menor possível. Porém, este solvente deve ultrapassar o volume morto (volume do capilar do ponto de injeção até o concentrador), para garantir que os analitos serão eluídos. Primeiramente foi realizado o cálculo do volume morto injetando-se 10s de ACN (sob pressão de 50 mBar). Como em pH 2,5 não há ocorrência de fluxo, o solvente ficará no começo do capilar. A seguir foi injetado tampão na mesma pressão para “empurrar” a banda da ACN anotando-se o tempo necessário para a mesma atingir o detector. Com base na velocidade da ACN naquele fluxo e no comprimento do volume morto do

capilar, foi calculado o tempo de injeção de tampão necessário para fazer a banda de ACN ultrapassar o concentrador. Foi testada a eluição com ACN 50% (em água), mas os resultados não foram satisfatórios. Outras concentrações de ACN em água foram testadas, mas também não se mostraram adequadas. A eluição dos compostos da fase sólida foi conseguida quando se utilizou uma injeção de 12s de ACN 100 pura seguida de injeção de tampão durante 40s. Os compostos foram todos eluídos num único pico, ocorrendo perda da resolução **Figura 55-D**.

A separação entre os picos e a concentração da amostra foi conseguida quando se injetou ACN pura durante um tempo menor (10s de injeção) e uma quantidade maior de amostra (300s contra 180s anterior) **Figura 55-E**. Não foram observados problemas com queda de corrente, nem alargamento de bandas nesta condição.

Figura 55: Avaliação dos concentradores. Condições de análise: tampão de corrida = fosfato de sódio (20mmol/L) pH 2,5, 25 kV, 200 nm, injeção por pressão (50 mBar). Condições de injeção: capilar sem concentrador: (A) Tracrium® 10 mg/L (t_{inj} 3s) e (B) Tracrium® 2 mg/L (t_{inj} 3s). Capilar com concentrador: (C) Tracrium® 2 mg/L (t_{inj} 180s), lavagem com água (t_{inj} 180s), sem eluição com ACN, (D) Tracrium® 2 mg/L (t_{inj} 180s), lavagem com água (t_{inj} 180s), eluição com ACN puro (t_{inj} 12s), (E) Tracrium® 2 mg/L (t_{inj} 300s), lavagem com água (t_{inj} 180s), eluição com ACN puro (t_{inj} 10s).

6 – COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTRATÉGIAS DE AUMENTO DE SENSIBILIDADE.

Conforme mencionado anteriormente, foi escolhido o pico da laudanosina para acompanhar os estudos relativos às estratégias para aumento de sensibilidade. A laudanosina foi escolhida por se tratar do maior produto de decomposição do atracúreo, sendo sempre detectada no eletroferograma da amostra de besilato de atracúreo, independente do tampão conter aditivos ou não. Em todas as estratégias foi injetada uma amostra de Tracur® diluída em água (diluição 1:50), e acompanhou-se o aumento do pico da laudanosina. Apenas no composto de referência para o cálculo do “stacking” mediado por força iônica, a ampola de Tracur® foi diluída no tampão de corrida. Nas demais estratégias de “stacking” e isotacoforese, tanto para a referência quanto para a referida estratégia, o capilar foi mesmo. No caso da cela HS, comparou-se a análise de uma amostra injetada em capilar comum com outra injetada na cela HS. No caso do concentrador, a referência também foi uma amostra injetada em capilar comum. A Tabela XII mostra a comparação dos resultados encontrados para a laudanosina (em ganho de área, altura e sinal-ruído (S/R)) nas diferentes estratégias de pré-concentração utilizadas neste trabalho.

Tabela XII: Comparação das estratégias de aumento de sensibilidade para o besilato de atracúreo.

ESTRATÉGIA	t e p _{inj} para cada situação	Área da laudanosina	Ganho em área	Altura da laudanosina	Ganho em altura	S/R [#]	Ganho em S/R
"STACKING" MEDIADO POR FORÇA IÔNICA	R (2s,34mBar)	7481		1104		4,7	
	E (2s,34mBar)	86889	11,6	7451	6,7	118	25
"STACKING" EM CAMPO AMPLIFICADO	R (2s, 5kV)	172121		24615		965	
	E* (2s, 5kV)	434840	2,5	58032	2,4	2583	2,7
	R (2s, 5kV)	10004		1127		8,7	
	E** (2s, 5kV)	51778	5,2	6961	6,2	65	7,5
"STACKING" POR INJEÇÃO DE GRANDE VOLUME	R (2s,169mBar)	722481		147839		2892	
	E (10s,169mBar)	1216711	1,7	186903	1,3	3094	1,1
CELA HS	R (1s,169mBar)	859		397,16		230	
	E (1s,169mBar)	5100	5,9	983,12	2,5	657	2,9
ISOTACOFORESE TRANSIENTE	R (30s,50mBar)	8		0,93		20	
	E [§] (100s,50mBar)	51	6,7	9,6	10,3	152	7,6
CONCENTRADOR	R (30s,50mBar)	8		0,93		20	
	E (300s,50mBar)	147	19,4	13,6	14,6	450	22,5

R : situação de referência

E: situação onde foi aplicada a estratégia

S/R calculado conforme anexo I, para uma média de 3 análises.

* analisado em tampão fosfato 60 mmol/L (pH 2,5)

** analisado em tampão fosfato 60 mmol/L + β CD 20 mmol/L + 4 moles/L de uréia (pH 4,0)

§ analisado em tampão fosfato 60 mmol/L (pH 2,5), injetando uma banda de H⁺ e OH⁻.

Obs. As estratégias de "stacking" mediado por força iônica e em campo amplificado foram avaliadas utilizando equipamento Beckman; o "stacking" em injeção de grande volume e a cela HS foi realizado no equipamento Perkin Elmer; a isotacoforese transiente e os testes com concentrador foram feitos utilizando equipamento da Agilent.

O valor obtido para o aumento na área da laudanosina utilizando o “stacking” mediado por força iônica foi calculado para a amostra dissolvida em água (diluição 1:50), em relação à amostra diluída no tampão de corrida (diluição 1:50, situação tomada como referência para os cálculos). Para as demais estratégias deve-se considerar o ganho relativo ao “stacking”, pois todas as outras amostras foram dissolvidas em água. Então, o aumento observado para a laudanosina é o aumento proporcionado pela estratégia e para o cálculo dos valores de aumento de sensibilidade total, deve ser incluído o ganho obtido com o “stacking”.

Entre os resultados obtidos (ganho em S/R) para as estratégias de pré-concentração baseadas na injeção de amostra, o “stacking” em campo amplificado (com tampão contendo aditivos (β CD e uréia) foi o mais vantajoso. Este valor ficou próximo ao obtido com a isotacoforese transiente e superior ao ganho obtido para a cela HS. Além disto, esta estratégia é simples e facilmente realizada em capilares comuns. Este resultado indica que é possível obter o mesmo aumento proporcionado pela cela HS em capilar comum quando se emprega as estratégias de campo amplificado, o que reduz grandemente os custos de uma análise, visto que o capilar comum é da ordem de 100 vezes mais barato que a cela HS e não ocorrem problemas de entupimento. Além disso, através do “stacking” podemos pré concentrar amostras analisadas por detecção indireta, o que não é possível na HS devido ao aumento do sinal do cromóforo junto com o sinal do analito. O baixo valor de S/R para a cela HS ocorre porque o ruído observado na cela HS é muito maior que em capilar normal [46].

Podemos observar que o “stacking” em injeção de grande volume foi a estratégia que obteve o menor ganho em sensibilidade. Isto pode estar associado à perda da amostra, pois ao se aplicar a voltagem positiva, o tampão entrará do lado oposto ao da injeção e simultaneamente a água deixará o capilar no polo de injeção junto com uma certa quantidade de amostra. Os resultados nesta estratégia de “stacking” podem ser melhorados se o capilar inteiro for preenchido com a amostra, pois assim, mesmo que ocorram perdas,

garante-se a pré-concentração.

A isotacoforese transiente, utilizando as bandas de ácido e base para pré-concentrar a banda da amostra, foi o melhor resultado obtido para as estratégias baseadas na injeção de amostra (em ganho em S/R). A isotacoforese utilizando ácido glutâmico como eletrólito terminador apresentou um bom ganho de sinal para a amostra padrão de laudanosina (aproximadamente 20 vezes de aumento), mas os resultados para o Tracur® não foram satisfatórios. Como os estudos relativos às estratégias para aumento de sensibilidade foram apresentados para a laudanosina na amostra de Tracur®, esta estratégia não foi comparada às demais na **Tabela XII**.

Comparações da área dos picos entre separações com e sem concentrador instalado no capilar não são estritamente corretas, pois, o aumento da resistência ao fluxo proporcionado pelo concentrador, leva a valores errados em termos de área e altura de pico. O ganho em área e altura para a laudanosina foi apresentado apenas para se ter uma idéia destes valores. Mas, a comparação correta do aumento de sinal proporcionado pelo concentrador em relação a um capilar comum, deve ser feita tomando-se o valor do S/R, que neste caso, foi o maior entre todas as estratégias.

Ao se escolher uma estratégia para pré-concentrar uma amostra, deve-se levar em conta a facilidade do método. Os pré-concentradores são pouco reprodutíveis e difíceis de confeccionar. Como não são disponíveis comercialmente, às vezes, é necessário construir vários concentradores até se obter um em condições de uso. A isotacoforese transiente apresentou o segundo maior valor em aumento de S/R, mas também é uma estratégia que necessita de um estudo cuidadoso até se escolher um eletrólito líder e terminador adequado, que proporcione as condições necesssárias à pré-concentração. Esta escolha depende também do pH da amostra que se deseja concentrar, pois a isotacoforese em ácido e base, apesar de ser simples de se realizar, só funciona quando se trabalha em pHs extremos [12]. A cela HS é encontrada comercialmente e muito simples de ser utilizada. Suas limitações

incluem alto custo e fragilidade.

Para o caso da laudanosina, dentre as demais estratégias, a mais simples de se realizar e a que proporcionou um aumento comparável ao da isotacoforese transiente foi o “stacking” em campo amplificado.

7 – CONCLUSÕES FINAIS

O melhor resultado de aumento de sensibilidade para o “stacking” mediado por força iônica foi quando se dissolveu a amostra em água.

O aumento de sensibilidade em campo amplificado foi maior usando-se um tampão com alta concentração de sal, sendo este aumento comparável ao obtido pela isotacoforese.

O aumento de sensibilidade não foi tão expressivo no “stacking” por injeção de grande volume, mas pode ser melhorado se o capilar inteiro for preenchido com a amostra.

A isotacoforese proporcionou o segundo maior aumento em valores de S/R, porém, a escolha dos eletrólitos líder e terminador deve ser cuidadosa.

O aumento proporcionado pelo concentrador foi o maior dentre todas as estratégias, mas a pouca reprodutibilidade e a dificuldade de confecção não o tornam atrativo para análises rotineiras.

Este trabalho mostrou que com o aumento de sensibilidade obtido utilizando as técnicas de pré-concentração, a eletroforese capilar pode ser empregada rotineiramente como técnica de análise, com grandes vantagens sobre o HPLC.

Com este estudo também foi possível obter uma idéia comparativa do ganho proporcionado por algumas das estratégias de aumento de sensibilidade para uma mesma amostra. Analisando-se outras amostras, estes valores podem ser diferentes.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Osbourn, D.M.; Weiss, D.; Lunte, C.E. On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 2768.
- [2] Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, T.P.E.M. High performance zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1979**, 169, 11.
- [3] Burgi, D.S.; Chien, R.L. Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 2042.
- [4] Chien, R. L.; Burgi, D.S. J. Field Amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis, *Chromatogr.*, **1991**, 559, 141.
- [5] Friedberg, M.A; Hinsdale, M.; Shihabi, Z.K. Effect of pH and ions in the sample stacking in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr., A*, **1997**, 781, 35.
- [6] Chien, R.L.; Burgi, D.S. On-column sample concentration using field amplified, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 489A.
- [7] Albin, M.; Grossman, P.D.; Moring, S.E. Sensitivity Enhancement for Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 489A.
- [8] Zhang, C.X.; Thormann, W. Head-Column Field-Amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis: a Robust Approach Providing over 1000-Fold Sensitivity Enhancement, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2523.
- [9] Chien, R.L.; Burgi, D.S. Sample stacking of an extremely large-injection volume in HPCE, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1046.

- [10] McGrath, G.; Smyth, W.F. Large-volume sample stacking of selected drugs of forensic significance by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **1996**, 681, 125.
- [11] Aebersold, R.; Morrison, H.D. Analysis of diluted peptide samples by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1990**, 516, 79.
- [12] Schwer, C.; Lottspeich, F. Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems, *J. Chromatogr.* **1992**, 623, 345.
- [13] Zhao, Y.; Lunte, C.E. pH-Mediated field amplification on-column preconcentration of anion in physiological samples for capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 3985.
- [14] Verheggen, T.P.E.M; Schoots, A.C.; Everaerts, F.M. Feasibility of capillary zone electrophoresis with suppression of electroosmotic flow in completely closed systems. *J. Chromatogr.* **1990**, 503, 245.
- [15] Kaniansky, D.; Marak, J. On-line coupling capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1990**, 498, 191.
- [16] Krivankova, L. *et al.* Options in electrolyte systems for on-line combined capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.*, **1993**, 638, 119
- [17] Krivankova, L.; Bocek, P. Synergism of capillary isotachopheresis and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, **1997**, 689, 13.
- [18] Krivankova, L.; Pantucková, P.; Bocek, P. Isotachopheresis in zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 838, 55.

- [19] Guzman, N.A. On-line bioaffinity, molecular recognition, and preconcentration in CE technology, *LC-GC*, **1999**, 17(1).
- [20] Tomlinson, A. *et al.* Preconcentration and microreaction technology on-line with capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1996**, 744, 3.
- [21] Guzman, N.A *et al.* Capillary Electrophoresis Technology, Marcel Dekker, New york, **1993**, p. 643.
- [22] Heegaard, N.H.H.; Nilsson, S.; Guzman, N.A. Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments, *J. Chromatogr. B*, **1998**, 715, 29.
- [23] Cai, J. El Rassi, Z. *J. Liq. Chromatogr.*, **1993**, 16, 2007.
- [24] Tomlinson, A.J.; Naylor, S. A strategy for sequencing peptides from diluted mixtures at the low femtomole level using membrane preconcentration-capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry (mPC-CE-MS/MS), *J. Liq. Chromatogr.*, **1995**, 18, 3591.
- [25] Tomlinson, A.J.; Guzman, N.A.; Naylor, S. Enhancement of Concentration Limits of Detection in CE and CE-MS: a review of on-line sample extraction, "cleanup", analyte preconcentration, and microreactor *technology*, *J. Cap. Elec.*, 002:6, **1995**, 247.
- [26] Chervet, J.P.; Van Soest, R.E.J.; Ursem, M. Z-shaped flow cell for UV detection in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.* **1991**, 543, 439.
- [27] Chervet, J.P *et al.* Ultra-sensitive UV detection in micro separation, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1989**, 12, 278.

- [28] Tavares, M.F.M. Eletroforese Capilar: conceitos básicos, *Química Nova* **1996**; 19 (2), 173.
- [29] Ewing, G.W. Analytical Instrumentation Handbook, Marcel Dekker Inc, New York **1997**, 2nd edition.
- [30] Weinberger, R. Practical capillary electrophoresis, Academic Press, Inc. San Diego, USA, **1993**.
- [31] Baker, D.R. Capillary Electrophoresis, John Wiley., New York, **1995**.
- [32] Heiger, D.N. High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction, Copyright, Hewlett-Packard Company, France **1992**, 2nd edition.
- [33] Shihabi, Z.K. Peptide stacking by acetonitrile-salt mixture for capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr., A* **1996**, 744, 231.
- [34] Chien, R. Helmer, J.C. Electroosmotic properties and peak broadening in field-amplified capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1354.
- [35] Chien, R.L.; Burgi, D.S. Field-amplified polarity-switching sample injection in high-performance capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1991**, 559, 153.
- [36] Vinther, A.; Soeberg, X.H. Temperature elevation of the sample zone in free capillary electrophoresis under stacking conditions, *J. Chromatogr.*, **1991**, 559, 27.
- [37] Tavares, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Química Nova*, **1997**, 20(5), 493.

- [38] Tavares, M.F.M.; Colombara, R.; Massaro, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis. Evaluation of electrolyte systems for anion analysis, *J. Chromatogr.* **1997**, 772, 171.
- [39] Gebauer, P. Bocek, P. Recent application and developments of capillary isotachopheresis, *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2154.
- [40] Church, M.N. *et al.* Transient isotachophoretic-electrophoretic separations of lanthanides with indirect laser-induced fluorescence detection, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2475.
- [41] Krivankova, L.; Gebauer, P.; Bocek P. Some practical aspects of utilizing the on-line combination of isotachopheresis and capillary zone electrophoresis, *J. Chrom. A*, 716 **1995**, 35.
- [42] Colombara, R.; Tavares, M.F.M. Simulação computacional da separação de ânions por eletroforese capilar 21ª Reunião Anual da SBQ. Livro de Resumos, Poços de Caldas, MG, **1998**.
- [43] Hirokawa, T. *et al.* Simulated quantitative and qualitative isotachopheresis indices of 73 amino acids and peptides in the pH range 6.4-10, *J. Chromatogr.*, **1993**, 628, 283.
- [44] Bocek, P. Analytical Isotachopheresis, cap. 10, pg 190, 2ª edição, .
- [45] Bruin, G.J.M. *et al.* Optimization and evaluation of the performance of arrangements for UV detection in high-resolution separations using fused-silica capillaries, *J. Chromatogr.*, **1991**, 559, 162.
- [46] Moring, S.E.; Reel, R.T.; van Soest, R.E.J. Optical improvements of a Z-shaped cell for high-Sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3454.

- [47] Yang, Q.; Tomlinson, A.J.; Naylor, N. Membrane preconcentration CE, *Anal. Chem. (News & Features)*, **1999**, 183 A.
- [48] Beattie, J.H.; Self, R.; Richards, M.P. The use of solid phase concentrators for on-line preconcentration of metallothionein prior to isoform separation by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **1995**, 16, 322.
- [49] Cole, J.C.; Kennedy, R.T. Selective preconcentration for capillary zone electrophoresis using protein G immunoaffinity capillary chromatography, *Electrophoresis*, **1995**, 16, 549.
- [50] Swartz, M.E.; Merion, M. On-line sample preconcentration on a packed-inlet capillary for improving the sensitivity of capillary electrophoretic analysis of pharmaceuticals, *J. Chrom.*, **1993**, 632, 209.
- [51] Dalluge, J.D.; Sander, L.C. Precolumn Affinity Capillary Electrophoresis for the Identification of Clinically Relevant Proteins in Human Serum: Application to Human Cardiac Troponin I, *Anal. Chem.*, **1988**, 70, 5339.
- [52] Strausbauch, M.A *et al.* Concentration and separation of hypoglycemic drugs using solid-phase extraction-capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 717, 279.
- [53] Morita, I.; Sawada, J. Capillary electrophoresis with on-line sample pretreatment for the analysis of biological samples with direct injection, *J. Chromatogr.*, **1993**, 641, 375.

ANEXO I

Cálculo do sinal ruído

O sinal-ruído (S/R) é um dado muito utilizado para descrever a qualidade de um método analítico ou a performance de um instrumento.

Para um dado sinal, o valor do sinal do pico (S) corresponde ao valor da altura do pico medido desde a linha de base até o ápice do pico. Já a magnitude do ruído (R) é definida como o desvio padrão (s) das médias das medidas do sinal do ruído. Então, o S/R é dado por [1,2]:

$$\frac{S}{R} = \frac{\text{valor do sinal do pico}}{\text{desvio padrão do ruído}}$$

Para um dado valor do ruído, o desvio padrão pode ser estimado facilmente, com 99% de confiança, dividindo a diferença entre o valor máximo e mínimo por 5. Neste trabalho, nós assumimos que as médias são randômicas e podem ser tratadas por métodos estatísticos.

Neste trabalho, o valor para o ruído foi obtido traçando-se o gráfico de uma parte da linha de base do eletroferograma, selecionando-se uma porção representativa do ruído e calculando-se a média e desvio padrão dos pontos.

A Figura 01 mostra a melhor linha obtida para o ruído. As linhas traçadas em verde claro e azul mostram as partes representativas do ruído.

Figura 01: Gráfico do ruído para um determinado eletroferograma.

O número de pontos considerados neste caso particular foi de 2143, a média foi $-0,00124$ e o desvio padrão foi de $0,05$. Portanto $R = 0,05$.

REFERÊNCIAS

- [1] – Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principles of Instrumental Analysis. Harcourt Brace & Company, USA, 1998.
- [2] – Ingle Jr., J.D.; Crouch, S.R. Spectrochemical Analysis. Prentice-Hall Inc., USA, 1998.