UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO (OSCILOMÉTRICA) PARA
ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA E CROMATOGRAFIA MICELAR
ELETROCINÉTICA

JOSÉ ALBERTO FRACASSI DA SILVA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: CLAUDIMIR LUCIO DO LAGO

SÃO PAULO
MARÇO / 2001

ÍNDICE

I. Agradecimentos	3
II. Resumo	7
III. Glossário	10

Capítulo 1 - Introdução e Objetivos

1.1 Introdução à Técnica	13
1.2 Migração Eletroforética e Fluxo Eletroosmótico	15
1.3 Modalidades de Separações Eletroforéticas	19
1.4 Dispersão	22
1.5 Detecção	24
1.5.1 Detecção Condutométrica em Eletroforese Capilar	26
1.6 Objetivos	30

Capítulo 2 - Construção dos Equipamentos de Eletroforese Capilar

2.1 Introdução	31
2.2 Interface	34
2.3 Fontes de Alimentação	34
2.4 Fontes de Alta Tensão	35
2.5 Controle da Temperatura	39
2.6 Injeção de Amostra	42
2.6.1 Injeção Eletrocinética	43
2.6.2 Injeção Hidrodinâmica por Gravidade	44
2.6.3 Injeção Hidrodinâmica por Aplicação de Pressão	48
2.7 Amostrador	52
2.8 Software	55
2.9 Considerações Gerais	57

Capítulo 3 - Capilares e Reagentes	59
---	-----------

Capítulo 4 - Detecção

4.1 Introdução	62
4.2 Geradores de Sinal	66
4.3 Circuito eletrônico	67
4.4 Cella e Confeção dos Eletrodos	69
4.5 Avaliação e Caracterização do Detector	75
4.6 Otimização dos Parâmetros	88
4.7 Simulação do Circuito Equivalente	95
4.8 Considerações Gerais	102

Capítulo 5 - Aplicações

5.1 Introdução	103
5.2 Metais Alcalinos, Alcalinos Terrosos e Amônio	104
5.3 Análise de Cátions em Solução para Hemodiálise	109
5.4 Análise de Cátions e Ânions em Água de Chuva	112
5.5 Detecção Indireta de Espécies de Baixa Mobilidade	115
5.6 Análise de Formaldeído	118
5.7 Análise de Álcoois e Espécies Neutras por MEKC	120

Capítulo 6 - Conclusões

IV. Bibliografia

V. Curriculum Vitae

VI. Apêndices

VI.I Software	135
VI.II Planilhas de simulação	159

I. Agradecimentos

Gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos às pessoas que tornaram este trabalho possível. Não somente aos colegas acadêmicos, mas também àquelas que, durante esta longa trajetória, contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal. As pessoas que figuram nestas páginas são aquelas que, por razões misteriosas, eu me recordo no momento. Mas foram tantas as pessoas que me ajudaram que talvez algumas passem despercebidas nos porões da minha memória. Por favor, que me perdoem, pois esta não foi a minha intenção, pois elas sempre retornam à lembrança nas ocasiões mais inesperadas.

À Sheila, Alzira, Fernanda, Roni, e todos os demais familiares, que mesmo me achando “meio maluco”, apoiaram minhas resoluções. Em memória de meus avôs e avó Luis, Antônio e Agripina.

Aos amigos de vários anos, Antônio “Migão” Lopes, Marco Bello, Eduardo Magu, Cláudia, Valéria, Patricya, Luis Fernando, Kátia, Adriano, Fernando Dutra, Jorge Benante, Gerson, Carla, Márcia Santos, Rogério Telles, Marcos Andreo, Luciano e Aldo. Realmente, eu poderia escrever algumas páginas para cada um deles.

Aos amigos Flávio, Adalgiza e Marcone que têm trabalhado em conjunto e contribuído para o desenvolvimento destas pesquisas. Devo muito a estas pessoas.

Aos amigos do laboratório Robinson, Carol, Zé Geraldo, Dosil, Heron, Carlos, Tácio, Renato, Eduardo, Adriana, André, Marco Antônio, Márcio, William, Valberes, Jairo, Bia, Patrícia, Carlinha, Gustavo, Pillar, Fabiano, Fernando, Zé Maria, Alexandre, Osmar, Ricardo, Rodrigo e Lúcia pelo ótimo ambiente de trabalho que proporcionaram e também pelas horas de descontração.

Aos colegas da pós-graduação Vânia Mori, PC, Ulisses, Fabinho, Rodrigo, Flávio, Luis, Sílvio, Lurdinha, Alessandra, Beths, Gustavo, e demais colegas da

Analítica.

Aos Profs. Drs. Gutz, Lúcio, Marina e Dr. Norberto Guzman pelas frutíferas discussões, pela experiência transmitida e eventuais colaborações. Aos professores Mauro, Dalva, Márcia Temperini, Osvaldo Sala, Sílvia Serrano, Sérgio Massaro, Sílvia Agostinho, Jonas Gruber, Bronislaw Polakiewicz, por tudo.

Aos amigos da graduação: Malu, Virgínia, Florípes, Marcelo De Carli, Alê, Galano, Sócrates e Altair.

Ao pessoal do Césio 137 Cover: Maurício “Guarabira”, Maria Fernanda, Décio, Paulinho, Geléia, Darius, Marcelo, Greg, Fernando Macas, Emiliano Mimi, Cicinho, Chiquinho Lalá e Luís.

Ao pessoal da Assistência Acadêmica Silvana, Kali e Airton, além do Francisco e do Jailton (xérox), pelo apoio sempre disponível. Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, graduação, copa, limpeza, audiovisual, almoxarifado, biblioteca, portaria e protocolo, por todos os serviços e pela ajuda dispensada.

Ao pessoal do futebol (e que eu ainda não citei acima): Moacir, Leo, Mario, Pio e Wellington, pelos hematomas e canelas roxas (às suas, óbvio).

Às secretárias Marlene, Dora, Célia da Analítica e Alice do Departamento de Química Fundamental.

Um agradecimento à parte para os inventores da fita crepe, sem a qual este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

E por último (apenas para dar destaque, além do toque de suspense), àquela que tem me presenteado com tanta felicidade, amor, compreensão, carinho, etc, etc, etc. À mulher maravilhosa e inteligente que sempre traz consigo palavras de incentivo e determinação. A quem eu também gostaria de dedicar este trabalho, e por que não estes esforços. À Nara L. Ricelli.

Dedico este trabalho

*À minha mãe Rosa Maria Fracassi da Silva e
Em memória de meu pai Valdir Teixeira da Silva*

E também ao mestre e amigo Claudimir L. do Lago

II. Resumo

Este trabalho descreve a construção e avaliação de um detector condutométrico sem contato (oscilométrico) para sua aplicação em eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocinética (MEKC).

A construção do detector contou com a avaliação de diversos materiais e métodos para a confecção dos eletrodos, tão bem como o aperfeiçoamento do seu circuito eletrônico. O seu comportamento e desempenho foram verificados através do estudo dos diversos parâmetros que influenciam sua resposta, como frequência e amplitude do sinal aplicado, temperatura e condutividade do meio. Além disso, a simulação do circuito equivalente da cela de detecção auxiliou no entendimento das propriedades do detector frente a alterações na condutividade do meio, na frequência de operação e nas dimensões da cela. A otimização dos parâmetros operacionais foi racionalizada pela formulação de equações analíticas que descrevem o fator de resposta do detector a partir de parâmetros obtidos experimentalmente.

Para o desenvolvimento do sistema de detecção, dois equipamentos completos de eletroforese capilar foram construídos. Sistemas de injeção de amostra por pressão, por gravidade, e eletrocinética foram desenvolvidos. Um dos equipamentos permite que a injeção da amostra seja feita do lado aterrado da fonte de alta tensão. Conseqüentemente, o detector é posicionado próximo do ponto de aplicação da alta tensão. Este é, de que se tem notícia, o primeiro sistema de detecção eletroquímico para eletroforese capilar com essa característica.

A termostatização dos capilares foi efetuada por convecção forçada de ar. De maneira a aumentar o grau de automação e facilitar o seu manuseio, os dois equipamentos foram interfaceados a microcomputador.

Os equipamentos de eletroforese com detecção oscilométrica construídos permitiram a análise de diversas substâncias em matrizes variadas, como por

exemplos íons orgânicos e inorgânicos em água de chuva e material particulado, ácidos graxos de cadeia linear em gordura de coco, formaldeído na fase gasosa da atmosfera, e, pela primeira vez, espécies neutras, como álcoois alifáticos, separadas por MEKC.

Abstract

This work describes the construction and evaluation of a contactless conductometric (or oscillometric) detector, for its application in capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography (MEKC).

The materials and methods used for the construction of the electrodes, as well as the improvements on the electronic circuit, were evaluated. The behavior and performance of the detector were studied by changing the parameters that affect its response, e. g., the frequency and amplitude of the input signal, temperature and solution conductivity. The simulation of the cell equivalent electric circuit helped to understand the detector properties related to the variations in the solution conductivity, frequency, and cell dimensions. The optimization of the parameters was conducted by the formulation of analytical equations that describe the response factor using experimental data.

For the detection development, two complete capillary electrophoresis equipments were constructed. Pressure, gravity, and electrokinetic sample injection systems were developed. One of the equipments allows the sample injection on the grounded side of the capillary. Consequently, the detector is placed near the high voltage application point. This is the first electrochemical detector described for capillary electrophoresis with this characteristic.

The capillary thermostating was made by passing a forced air stream. Both equipments were interfaced to microcomputers.

The capillary electrophoresis equipments with oscillometric detection were applied to the analysis of many types of compounds in different matrices, such as organic and inorganic ions in rainwater and particulate material, fatty acids in cocoa oil, formaldehyde in the atmosphere and, for the first time, neutral species, like aliphatic alcohols, separated by MEKC.

III. Glossário

Abreviaturas e definições

AO – Amplificador Operacional

ACN – Acetonitrila

Ac⁻ – Acetato

CD – Detecção Condutométrica Convencional

CE – Eletroforese Capilar

CI – Circuito Integrado

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

CZE – eletroforese capilar de zona

d-β-CD – Dimetil-β-ciclodextrina

DC – Aqui se refere a corrente ou potencial contínuos

DCE – Dupla camada elétrica

d. e. – Diâmetro externo

d. i. – Diâmetro interno

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

EOF – Fluxo eletroosmótico

For⁻ – Formiato

His – Histidina

HLac – Ácido láctico

HMS – Hidroximetanosulfonato

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

i/e – Corrente/Tensão

IHP – Plano interno de Helmholtz

ITP – Isotacoforese

LOD – Limite de detecção

MES – Ácido 2-N-[morfolino]etanosulfônico

MEKC – Cromatografia micelar eletrocínética

MeOH – Metanol

OHP – Plano externo de Helmholtz
OD – Detecção Oscilométrica
 P_{atm} – Pressão atmosférica
PC – Plano de cisalhamento
PTFE – Politetrafluoretileno
RSR – Relação sinal/ruído
SDS – Dodecilsulfato de sódio
SMD – Refere-se a dispositivos de montagem em superfície
UV-vis – Refere-se à região do espectro eletromagnético compreendida entre o ultravioleta e visível.
 V_{dc} – Tensão contínua obtida na saída do seguidor de tensão (ponto TP1)
 V_{nr} – Tensão não-regulada
 V_{pp} – Tensão de pico-a-pico do sinal senoidal aplicado ao eletrodo
 V_{reg} – Tensão regulada
t- β -CD – Trimetil- β -ciclodextrina
TTL – Aqui se refere aos níveis de tensão para o acionamento de circuitos lógicos (0 – 5 V)

Símbolos

C_o – Capacitância parasitária (relativa à transmissão externa do sinal aplicado)
 C_s – Capacitância da solução
 C_w – Capacitância da parede do capilar
 k – Fator de capacidade
 κ – Condutividade da solução
 l – Distância entre o ponto de injeção e o detector
 L – Comprimento total do capilar
 μ_e – Mobilidade eletroforética
 μ_{eff} – Mobilidade eletroforética efetiva
 R_s – Resistência da solução que preenche o capilar

σ_{ads}^2 – Dispersão causada pela adsorção na parede do capilar
 σ_{det}^2 – Dispersão introduzida pelo sistema de detecção
 σ_{dif}^2 – Dispersão devida à difusão longitudinal
 σ_e^2 – Dispersão introduzida pelas distorções no campo elétrico que recai sobre as zonas (eletrodispersão)
 σ_{inj}^2 – Dispersão introduzida no processo de injeção de amostras
 σ_o^2 – Outros tipos de dispersão
 σ_{total}^2 – Dispersão total do sistema
 σ_{Joule}^2 – Dispersão causada pelo aquecimento do sistema
 v_a – velocidade aparente
 v_{eof} – Velocidade do fluxo eletroosmótico
 v_{mc} – Velocidade micelar
 t_o – Tempo de retenção do fluxo eletroosmótico
 t_m – Tempo de migração
 t_{mc} – Tempo de retenção micelar
 w – Largura na base do pico
 $w_{1/2}$ – Largura do pico à meia altura
 X_w – Reatância capacitiva da parede do capilar
 X_o – Reatância capacitiva referente à transmissão direta do sinal aplicado

1 – Introdução e Objetivos

1.1 Introdução à Técnica

Há várias décadas, conhece-se o fenômeno de migração iônica originado quando uma diferença de potencial é aplicada a uma solução contendo eletrólito. Desde o início do século XX, percebeu-se que a diferença na velocidade de migração entre diferentes substâncias poderia ser utilizada na separação e quantificação de misturas das mesmas.

A separação de substâncias baseada na diferença das velocidades de migração denomina-se eletroforese. Li [1] fornece uma boa visão do desenvolvimento histórico da eletroforese desde seus primórdios.

Praticamente desde a metade do século XX, a eletroforese passou a ser utilizada rotineiramente na separação de compostos biologicamente ativos, como proteínas, enzimas, nucleotídeos, etc. Até os dias de hoje são empregadas placas gelatinosas (*slab gel*) que, devido à porosidade do gel, servem de suporte e meio de separação, sendo esta baseada no tamanho das moléculas da amostra. Devido às altas concentrações dos eletrólitos utilizados e à grande área das placas, a corrente que flui pelo sistema também é alta, causando o aquecimento do meio

(Efeito Joule) e possibilitando a degradação térmica do material biológico. Para contornar este efeito baixos potenciais são empregados, o que aumenta em demasia o tempo de análise, além de diminuir a eficiência do processo de separação devido à difusão do material.

De modo a minimizar os indesejáveis efeitos causados pelo aumento da temperatura, Hjérten [2] construiu um aparato onde os componentes da amostra eram separados em um tubo sob rotação. Desta maneira, seria lançado o primeiro passo no sentido da moderna eletroforese capilar (CE). Hjérten ainda contribuiria significativamente para o desenvolvimento da técnica com a adaptação da eletroforese em gel para tubos capilares [3]. Logo se percebeu a vantagem da utilização de tubos de reduzido diâmetro interno (d. i.) na dissipação de calor, conseguida devido à alta relação entre a área de contato e o volume interno do capilar.

Outro passo importante foi dado em 1979 por Everaerts e colaboradores [4], no sentido da descrição analítica do processo de eletrodispersão de bandas. A contribuição de Everaerts foi, e continua sendo, muito importante para o desenvolvimento de diversos aspectos da CE (como exemplo, ver item 1.5.1).

A mais bem aceita demonstração das potencialidades analíticas da CE foi conduzida por Jorgenson e Lukacs [5,6]. Nesse trabalho destacam-se o desenvolvimento de equações analíticas, a discussão dos efeitos que influenciam a dispersão de bandas, e pela primeira vez, a utilização de capilares de 75 μm (d. i.). Foi conseguida altíssima eficiência e ótima resolução na separação de aminoácidos e proteínas.

A partir 1983, o número de artigos envolvendo aspectos instrumentais e aplicações da CE cresceu vertiginosamente. Merece destaque a introdução, em 1984, da cromatografia micelar eletrocinética (MEKC) por Terabe e colaboradores [7], que possibilitou a separação de compostos neutros por CE. O que se seguiu, como processo natural, foram contribuições no sentido do aprimoramento instrumental da técnica e aplicações aos mais variados tipos de substâncias e matrizes e, em 1987, seria lançado o primeiro equipamento comercial de CE.

Atualmente, a CE está bem estabelecida como técnica analítica de

separação. Devido ao mecanismo de seleção completamente distinto dos mecanismos que regem as separações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), particularmente a cromatografia de íons, a CE tornou-se complementar a esta técnica. Através dos seus modos de separação, as aplicações da CE englobam a análise de misturas de compostos inorgânicos e orgânicos, compostos de interesse biológico (aminoácidos, peptídeos, enzimas, proteínas, DNA, carboidratos, oligossacarídeos, etc.), compostos farmacêuticos, enantiômeros, surfactantes, dentre outros [8]. A CE é, deste modo, de grande interesse na análise de amostras clínicas, ambientais e industriais.

1.2 Migração Eletroforética e Fluxo Eletroosmótico

A velocidade que um determinado íon adquire (v_e), quando submetida à ação de um campo elétrico, é dependente de propriedades da solução, como por exemplo, a viscosidade, e de características do íon, como a relação entre a carga e o raio hidratado. A velocidade será proporcional ao campo elétrico aplicado (E):

$$v_e = \mu_e E \quad \text{Eq. 1.1}$$

onde a constante de proporcionalidade μ_e é conhecida como mobilidade eletroforética do íon.

Em casos onde a espécie em questão participa de reações em equilíbrio, a sua carga, e conseqüentemente a sua mobilidade, podem variar. Se o equilíbrio se estabelece rapidamente, como por exemplo, reações envolvendo protonação (equilíbrios ácido-base), ou complexação com ligantes lábeis, verifica-se que as espécies envolvidas no equilíbrio se movimentam como uma banda única, cuja mobilidade efetiva (μ_{eff}) depende das mobilidades eletroforéticas (μ_i) e dos graus de dissociação (α_i) das n espécies individuais envolvidas:

$$\mu_{eff} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \mu_i \quad \text{Eq. 1.2}$$

Nos casos onde o íon não participa de reações de equilíbrio, a mobilidade efetiva se iguala à eletroforética ($n = 1$ e $\alpha = 1$).

A superfície da sílica fundida, material de confecção da grande maioria dos capilares utilizados em CE, possui propriedades ácidas, adquirindo carga negativa devido à desprotonação dos grupos silanol. O aparecimento destas cargas na superfície do material é balanceado pela interação eletrostática de cátions da solução, causando o aparecimento da dupla camada elétrica (DCE) [9]. O modelo combinado da DCE, de Gouy-Chapman-Stern-Grahame, prevê a forte interação dos cátions da camada adjacente à superfície, mas segundo este modelo a presença de moléculas de solvente e mesmo de ânions da solução também é plausível. Na medida em que a distância da superfície aumenta, a interação dos cátions da solução vai se tornando mais fraca, dando origem à região difusa da DCE. A distribuição de cátions segue o mesmo perfil exponencial de potencial (Ψ) exibido ao longo da DCE. A figura 1.1 ilustra a estrutura simplificada da DCE segundo este modelo.

Quando um campo elétrico paralelo à superfície é aplicado, há a movimentação dos cátions da solução em direção ao cátodo, tão bem como a de ânions em direção ao ânodo. Obviamente as cargas negativas da superfície do capilar não se movimentam, reduzindo drasticamente a velocidade de migração dos cátions eletrostaticamente a elas ligados. Por outro lado, os cátions da camada difusa, fracamente ligados, também migram em direção ao cátodo, arrastando consigo as moléculas neutras do solvente.

Figura 1.1 – Modelo simplificado da DCE. PC refere-se ao plano de cisalhamento.

A movimentação de moléculas de solvente pela aplicação de um campo elétrico denomina-se eletroosmose.

A velocidade do fluxo de solvente, ou fluxo eletroosmótico (EOF), é proporcional ao campo elétrico aplicado:

$$v_{eof} = \mu_{eof} E \quad \text{Eq. 1.3}$$

onde μ_{eof} é a constante de proporcionalidade denominada de mobilidade do fluxo eletroosmótico.

A mobilidade do fluxo depende de fatores como a constante dielétrica (ϵ) e a viscosidade (η) da solução, e do potencial definido no plano de cisalhamento na região difusa, ou potencial zeta (ζ):

$$\mu_{eof} = \frac{\zeta \epsilon}{4\pi\eta} \quad \text{Eq. 1.4}$$

Devido à presença do EOF, a velocidade aparente (v_a) dos íons deve ser vetorialmente somadas à velocidade do fluxo:

$$v_a = (\mu_{eff} + \mu_{eof})E \quad \text{Eq. 1.5}$$

É possível determinar o tempo de migração (t_m), ou seja, o tempo que o íon leva para alcançar o detector a partir do ponto de injeção, utilizando as informações de mobilidade e parâmetros operacionais:

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{eff} + \mu_{eof})V} \quad \text{Eq. 1.6}$$

onde l é a distância do ponto de injeção até o detector, L é o comprimento total do capilar e V o potencial aplicado.

Uma característica importante do fluxo eletroosmótico é o seu perfil radial linear, que não induz a dispersão das bandas e garante alta eficiência na separação, em comparação com técnicas que utilizam pressão para movimentar a solução, como, por exemplo, HPLC. Neste ultimo caso o perfil do fluxo é parabólico, favorecendo a dispersão radial das bandas.

A presença do EOF é muito importante, uma vez que diminui consideravelmente o tempo de análise de compostos que possuam mobilidade no mesmo sentido que a mobilidade do fluxo, e permite que moléculas neutras se movam no interior do capilar. Além disso, tem importância fundamental no mecanismo de separação por MEKC. Por outro lado, em técnicas como a isotacoforese, a focalização isoeétrica e eletroforese capilar em gel, a presença do EOF é indesejável.

O controle, ou mesmo eliminação, do EOF pode ser feito (1) através da adição de modificadores ao tampão de corrida, devido às alterações na

viscosidade e constante dielétrica da solução [10], (2) através da modificação da superfície do capilar, pela adição de surfactantes [11] ou pela imobilização covalente de recobrimento [12], ou (3) através da aplicação de campo radial externo ao capilar [13].

1.3 Modalidades de Separações Eletroforéticas

Dentre as modalidades de separação mediadas por campo elétrico conhecidas [14], utilizou-se neste trabalho a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia micelar eletrocinética (MEKC).

A CZE é a modalidade de separação mais utilizada, devido à facilidade de implementação e otimização de parâmetros operacionais. Na CZE, a amostra é injetada entre o tampão de corrida (TC), como visto na figura 1.2a. Com a aplicação do potencial, e devido às diferenças na mobilidade efetiva (μ_{ef}) entre os diferentes componentes da amostra (A), estes separam-se em zonas distintas (1, 2 e 3). A velocidade com que cada zona se desloca é dependente do campo elétrico no capilar, das mobilidades dos analitos e do fluxo eletroosmótico. Em CZE, após a separação, as fronteiras móveis são sempre definidas entre as zonas dos analitos e o tampão de corrida [15]. Não existe restrição de mobilidade entre os analitos e o co-íon do tampão de corrida, mas a sua relação é determinante do formato dos picos obtidos, além de influenciar a sensibilidade em determinados sistemas de detecção.

O registro do sinal do detector é denominado eletroferograma, e seu aspecto é semelhante ao de um cromatograma. A resolução (R) e a eficiência da separação (N) podem ser calculadas através das equações 1.7 e 1.8, respectivamente, utilizando-se informações obtidas nos eletroferogramas.

Figura 1.2 – Esquema de separação por CZE. (a) A amostra (A) é injetada entre o tampão de corrida (TC); (b) As zonas dos analitos (1, 2 e 3) separam-se e deslocam-se em direção ao detector com velocidades distintas.

$$R_{2,1} = 2 \cdot \left(\frac{t_{m2} - t_{m1}}{w_1 + w_2} \right) \quad \text{Eq. 1.7}$$

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Eq. 1.8}$$

onde, t_{mi} e w_i são, respectivamente, o tempo de migração e a largura do pico para o analito i , e $w_{1/2}$ é a largura à meia altura do pico.

A separação de espécies neutras por eletroforese capilar pode ser conseguida de diversas maneiras. Técnicas de complexação e derivatização de compostos visam a adição de carga, ainda que parcial, de modo a conferir mobilidade eletroforética a estas substâncias. A utilização de grupos cromóforos ou fluoróforos na etapa de derivatização promove, ainda, condições adequadas de detecção por absorção no UV-vis ou fluorescência.

Em 1984 foi introduzida por Terabe [7,16] a cromatografia micelar eletrocinética (MECC ou MEKC). Basicamente, a separação de espécies neutras é

conseguida pela sua interação com uma fase pseudo-estacionária constituída por micelas - embora ciclodextrinas também tenham sido utilizadas neste sentido. Nestes estudos pioneiros, Terabe descreve o mecanismo de separação por MEKC, onde micelas formadas por dodecilsulfato de sódio (SDS), carregadas negativamente, se deslocam no sentido do fluxo eletroosmótico, com velocidade v_{mc} . Utilizando-se polaridade normal, moléculas neutras que não possuam interação com as micelas de SDS deverão se mover com a velocidade do fluxo eletroosmótico, v_{eof} . Moléculas neutras com alto caráter apolar se comportam de maneira a ficarem retidas no interior das micelas, e portanto adquirindo velocidade v_{mc} . Moléculas com polaridade intermediária se deslocam com velocidade entre v_{eof} e v_{mc} . O fator de capacidade, k , pode ser obtido e associado ao grau de interação entre o analito e as micelas, sendo igual a zero para os analitos que não sofrem nenhum tipo de interação e infinito para aqueles completamente retidos. Esta é uma diferença fundamental entre MEKC e HPLC. Enquanto que em HPLC a janela temporal é teoricamente infinita, em MEKC ela é definida pelos tempos de migração do fluxo eletroosmótico, t_{eof} e o tempo de migração das micelas, t_{mc} . As equações de resolução e eficiência em MEKC foram derivadas daquelas utilizadas em HPLC, levando-se em consideração as correções que devem ser feitas devido à diferença na janela temporal.

As equações 1.9 e 1.10 definem, respectivamente, o fator de capacidade k e a resolução encontrada em MEKC:

$$k = \frac{t_m - t_o}{t_o \left(1 - \frac{t_m}{t_{mc}} \right)} \quad \text{Eq. 1.9}$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\frac{k_2}{k_1} - 1}{\frac{k_2}{k_1}} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \left(\frac{1 - \frac{t_o}{t_{mc}}}{1 + k_1 \frac{t_o}{t_{mc}}} \right) \quad \text{Eq. 1.10}$$

onde, t_m , t_o e t_{mc} são os tempos de migração do analito, do EOF e da micela, respectivamente.

A figura 1.3 exemplifica um processo de separação por MEKC.

Figura 1.3 – Mecanismo de separação por MEKC. Os compostos apolares (a) interagem fortemente com o interior das micelas, adquirindo velocidade v_{mc} ; os compostos polares (c) não sofrem interação com as micelas e migram com velocidade v_{eof} ; os compostos de caráter intermediário (b) interagem de maneira diferenciada com as micelas, migrando com velocidade entre estes dois extremos.

1.4 Dispersão

A largura das bandas obtidas no eletroferograma é consequência da dispersão total do processo de separação e pode ser avaliada pela sua variância (σ_{total}^2). Esta por sua vez pode ser dividida em várias porções correspondentes às diversas etapas deste processo, que podem ser somadas por serem independentes. Assim, há uma variância atribuída à injeção da amostra (σ_{inj}^2), à dispersão longitudinal (σ_{dif}^2), à eletrodispersão (σ_e^2), ao sistema de detecção (σ_{det}^2), à adsorção (σ_{ads}^2), à dissipação de calor (σ_{Joule}^2), dentre outros fatores (σ_o^2), como por exemplo, a cinética de partição e transferência intermicelar do analito em MEKC:

$$\sigma_{total}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{dif}^2 + \sigma_e^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{ads}^2 + \sigma_{Joule}^2 + \sigma_o^2 \quad \text{Eq. 1.11}$$

Enquanto que a dispersão causada por diversos fatores, como a injeção de amostra, difusão longitudinal, dissipação de calor e detecção, podem ser analiticamente avaliadas, a influência de fatores como adsorção e eletrodispersão não são facilmente mensuráveis, por depender do analito em questão.

Um dos fatores que mais contribui para a dispersão, quando se trabalha com detecção condutométrica é a eletrodispersão. A eletrodispersão é causada pelas diferenças de condutividade entre as zonas dos analitos e do tampão de corrida. Estas diferenças são justamente a garantia do sucesso da detecção condutométrica.

Uma vez que determinada zona possui condutividade diferente, o campo elétrico que recai sobre esta zona também é diferente, sendo maior nos casos onde a condutividade da zona é baixa. Como a velocidade dos íons é dependente do campo elétrico, estes se deslocam mais rapidamente em zonas de menor condutividade. Com velocidade maior, estes íons alcançam a fronteira móvel definida pelas zonas do analito e do tampão de corrida. Como neste caso a zona referente ao tampão possui condutividade maior, os íons têm sua velocidade novamente reduzida. Como resultado, há a concentração dos íons na fronteira da banda. A este fenômeno dá-se o nome de *stacking*. A eletrodispersão é responsável pelo formato triangular dos picos obtidos, e neste exemplo os picos aparecerão com uma cauda (*tailing peaks*). Em casos onde a condutividade da zona é maior do que a condutividade do tampão de corrida, o campo elétrico incidente é menor, reduzindo a velocidade dos íons e causando a sua concentração na fronteira móvel posterior da zona, também introduzindo distorções nos picos (*front peaks*).

1.5 Detecção

Os métodos de detecção em CE são similares aos adotados em HPLC. Em todos os casos, devido ao reduzido diâmetro interno dos capilares, a região (ou cela) de detecção possui volume muito inferior aos utilizados em HPLC, o que cria a necessidade de sistemas de detecção bastante sensíveis. De fato, vários esforços têm sido conduzidos no sentido do aprimoramento destes sistemas e no desenvolvimento de estratégias de aumento dos limites de detecção (LOD) [17].

Os métodos de detecção podem ser divididos em:

- (1) Fotométricos – Absorção de radiação no UV-vis ou infravermelho, fluorescência, Raman, quimiluminescência e índice de refração (e absorbância termo-óptica);
- (2) Eletroquímicos – Amperométricos, potenciométricos, voltamétricos, condutométricos e oscilométricos (ou condutométricos sem contato);
- (3) Acoplados – Sistemas acoplados à espectrometria de massas, espectrometria de emissão por plasma indutivamente acoplado, fotometria de chama e ressonância magnética nuclear.
- (4) Outros – Métodos de detecção menos comuns como o radiométrico e de vibração induzida por laser.

Os LOD obtidos em CE normalmente expressam a sensibilidade característica da técnica empregada. Assim, há sistemas altamente sensíveis, como por fluorescência e amperométricos, contrastando com sistemas não tão sensíveis como absorção no UV-vis e condutométricos. É comum em CE referir-se à quantidade mínima de material que se pode detectar (em mols) em detrimento ao LOD expresso em concentração. Isto é devido aos baixos volumes empregados em CE. Haber [18] dá uma boa visão dos LOD para diversos métodos de detecção quando aplicados à CE. A tabela 1.1 mostra alguns valores de LOD conseguidos em CE para alguns métodos de detecção.

Tabela 1.1 – Faixa típica de LOD conseguidos em CE para alguns métodos de detecção.

Modo de detecção	LOD / mol/L
Índice de refração	$10^{-5} - 10^{-6}$
Absorção no UV-vis	
Indireta	$10^{-4} - 10^{-5}$
Direta	$10^{-5} - 10^{-6}$
Fluorescência	
Indireta	$10^{-6} - 10^{-7}$
Direta	$10^{-7} - 10^{-8}$
Direta, induzida por laser	$10^{-9} - 10^{-12}$
Amperométrica	$10^{-8} - 10^{-9}$
Condutividade	$10^{-5} - 10^{-6}$
Espectrometria de massas	$10^{-4} - 10^{-9}$
Radiometria	$10^{-9} - 10^{-11}$

Assim como o LOD, a seletividade também acompanha as características da técnica utilizada. Pela seleção do comprimento de onda utilizado, os métodos por absorção de radiação (quando utilizados de maneira direta) podem se tornar bastante seletivos. Outras técnicas podem ser bastante seletivas, por trazer grande informação de caráter estrutural, como no caso do Raman, a utilização de múltiplos comprimentos de onda e detecção com arranjo de diodos (*diode array detection*), ou ainda o acoplamento com espectrometria de massas. Detecção amperométrica também permite razoável seletividade, a partir da seleção do potencial de trabalho. Do mesmo modo, a detecção potenciométrica responde somente a uma restrita classe de compostos. Por outro lado, a detecção condutométrica (CD), por índice de refração e os métodos indiretos por absorção, não apresentam nenhuma seletividade, o que pode ser interessante do ponto de vista de detecção universal.

1.5.1 Detecção Condutométrica em Eletroforese Capilar

Muito da instrumentação para CE foi adaptada da isotacoforese (ITP), cujo avanço ocorreu principalmente durante a década de 70. Durante toda esta década, a CD foi largamente empregada em ITP [19-24]. O primeiro trabalho relacionado à CD em ITP foi desenvolvido por Steen e colaboradores [19] em 1972. Neste trabalho eles utilizaram capilares de 0,45 mm (d. i.) onde dois cilindros metálicos foram perfeitamente acoplados ao capilar. Subseqüentemente, os eletrodos foram conectados a um condutivímetro convencional.

Em 1979, em um trabalho de fundamental importância para a técnica de CE, Everaerts e colaboradores [25] utilizaram um detector baseado na medida do potencial desenvolvido entre dois eletrodos inseridos no capilar, que de fato é uma medida indireta da condutividade do meio eletrolítico entre os eletrodos. Nesse trabalho pioneiro, foi demonstrada a separação de diversos ânions orgânicos e inorgânicos em capilar de PTFE de 200 μm (d. i.).

Durante as décadas de 80 e 90 muitos trabalhos foram publicados, abordando aspectos teóricos, construção e aplicações de detectores condutométricos em CE. Já em 1985, Bocek e colaboradores [26] e Everaerts e colaboradores [27] demonstraram a utilidade de dispositivos amostradores para eletroforese capilar de zona (CZE), onde as zonas eram detectadas com o auxílio de detectores condutométricos (também adaptados da instrumentação utilizada em ITP).

O primeiro trabalho dirigido para a construção e aplicação da CD em CZE data de 1987. Zare e colaboradores [28] inseriram microeletrodos de platina de 25 μm de diâmetro em capilares de 50 e 75 μm perfurados com o auxílio de um laser de CO_2 . Foram reportados volume detectado de 30 pL e limite de detecção de 10^{-7} mol/L para Li^+ , com resposta linear por 3 ordens de magnitude. Posteriormente, este detector foi utilizado na determinação de Li^+ em soro sanguíneo [29] e de ácidos carboxílicos de baixo peso molecular [30]. Ainda utilizando o mesmo esquema de detecção, Zare e colaboradores verificaram o aumento de sensibilidade, sem perda da resolução, quando da diminuição da

concentração do tampão de corrida [31] (mantendo constante a relação entre concentração do tampão e de amostra) e relacionaram os tempos de migração e as áreas dos respectivos picos [30]. Em 91, Zare e colaboradores propuseram modificações no formato da cela condutométrica e implementaram um detector posicionado na extremidade do capilar [32], modelo este que foi posteriormente aprimorado [33].

Considerações teóricas foram conduzidas por Everaerts e colaboradores [34,35]. Em 1988 foi utilizado duplo sistema de detecção para a determinação das mobilidades eletroforéticas de alguns íons pequenos [34]. Em 91, relacionaram as mobilidades das espécies separadas com as áreas de seus picos, encontrando uma relação aproximadamente linear para uma estreita faixa de mobilidade, para espécies completamente ionizadas e monovalentes [35].

A sensibilidade da CD está estritamente ligada à diferença de condutividade entre o tampão de corrida e a zona que migra no capilar, ou mais precisamente, à diferença de mobilidade entre o contra íon do tampão de corrida e o íon analisado. Se a zona analisada possuir condutividade maior que o tampão de corrida, então um pico positivo é registrado e a detecção é dita direta. Se o contrário ocorrer, a zona possuir condutividade menor que o tampão, um pico negativo é registrado e a detecção é dita indireta. A condutividade residual do tampão de corrida é, portanto, de fundamental importância e reflete diretamente a sensibilidade do sistema. De maneira a aumentar a sensibilidade da CD em CE, Dasgupta e Bao [36] e Avdalovic e colaboradores [37] propuseram, paralelamente, o uso de um trocador iônico acoplado ao capilar, para eliminar a condutividade residual, em um dispositivo equivalente à coluna supressora, introduzida para cromatografia de íons. Um estudo mais sistemático das condições de separação para detecção condutométrica com supressão foi feito por Avdalovic e colaboradores [38]. Posteriormente, Dasgupta utilizou seu sistema na determinação de espécies gasosas [39].

A CD tem encontrado diversas aplicações em CE, principalmente após o lançamento no mercado de aparelhos munidos de CD [40,41]. A determinação do fluxo eletroosmótico [42] e o estudo dos seus modificadores [43], a determinação

da mobilidade de monoaminas [44] e a previsão do formato de picos [45] têm sido conduzidas com o auxílio deste tipo de detecção.

Uma grande variedade de amostras tem sido analisadas, como pode ser demonstrado na determinação de ânions em matrizes ambientais [46-52], bebidas [53-55], banhos para eletrodeposição [56-58] e peróxido de hidrogênio [59], íons inorgânicos em amostras de fluido pulmonar [60] e cátions em fármacos [61] e em tubos renais de ratos *in vivo* [62]. Além disso, surfactantes têm sido separados e detectados indiretamente [63,64] e a degradação por bactérias tem sido caracterizada pela análise de espécies contendo enxofre na sua estrutura [65].

Particularmente interessante é a análise de traços por CE com CD. Kaniasky e colaboradores [66] empregaram o acoplamento das técnicas de ITP e CZE na determinação de ânions como micro-constituintes em água de chuva. A coluna de isotacoforese foi utilizada para separar previamente os macro-constituintes dos micro-constituintes, um problema freqüentemente encontrado em amostras reais. A introdução das zonas pré-separadas na coluna de CZE é realizada automaticamente. Haber e colaboradores utilizaram a isotacoforese transiente (t-ITP) para pré-concentração de ânions presentes em água de reatores nucleares [67]. Utilizando adição de padrão, foram obtidos ótimo limite de detecção e boa reprodutibilidade, mesmo para injeção eletrocínética de amostra.

Outros tipos de detectores condutométricos foram propostos. Dasgupta e colaboradores [68] propuseram a utilização de dois fios paralelos alinhados no capilar e de um detector condutométrico bipolar com pulso gerado por computador. Stulík e colaboradores [69] construíram uma cela condutométrica onde um dos eletrodos foi depositado sobre a saída do capilar. Zare e colaboradores [70] desenvolveram um detector com terra flutuante, e embora o desempenho desta versão seja inferior àquela de 1987 [28], este circuito evita a interferência dos altos potenciais utilizados na separação. Também com o intuito de eliminar o problema de interferência do campo elétrico utilizado na separação, Tuma e colaboradores [71] propuseram um detector condutométrico convencional onde a saída do capilar é colocada em contato com o eletrólito no compartimento através de uma fita plástica hidrofílica. Apesar da relativa simplicidade da

montagem, este arranjo apresenta como desvantagens (1) o fato de um dos eletrodos ser composto por resina condutiva de epóxi, (2) a necessidade de manter fixa a distância entre o capilar e o nível do eletrólito e (3) contribuir com cerca de 10 % para a dispersão das bandas, em relação à detecção fotométrica no UV-vísivel. Vaireanu e colaboradores [72] construíram um detector condutométrico com resposta em frequência. O bom isolamento entre os eletrodos e o circuito de medição, proporcionado por acoplamento capacitivo, torna o detector aplicável a eletroseparações.

Considerações teóricas sobre o sistema de detecção condutométrica foram conduzidas por Katzmayer e colaboradores [73] a respeito da otimização do tampão de corrida para detecção condutométrica em CE. Os autores encontraram que as diferenças de condutância e a relação sinal-ruído (RSR) são dependentes não somente das diferenças de mobilidade entre o analito e o co-íon do tampão, mas também do contra-íon utilizado. Lucy e Wu [74] consideraram os aspectos de calibração e de sensibilidade obtida para detecção direta e indireta para detecção condutométrica em CE.

Recentemente, a detecção condutométrica sem contato, ou detecção oscilométrica, tem ganho atenção como alternativa à detecção condutométrica convencional.

Neste tipo de detecção, um sinal alternado de alta frequência é aplicado a um ou dois eletrodos na cela de detecção. Como a reatância capacitiva diminui com o aumento da frequência, a impedância do capilar é reduzida, permitindo que as variações de condutividade da solução no interior do capilar sejam observadas mesmo com os eletrodos posicionados do lado externo do capilar. Este arranjo previne a contaminação e o desgaste dos eletrodos, além de eliminar a interferência dos altos potenciais utilizados na separação. Este tipo de detecção também é bastante apropriado para o monitoramento em linha de ambientes agressivos, caso comum em plantas industriais e também é utilizado na forma de titulações em alta frequência [75,76].

No campo da separação, a detecção oscilométrica também tem sido aplicada a HPLC [77,78] e ITP [79,80].

Recentemente, Zemann e colaboradores [81] e Fracassi da Silva e Lago [82] descreveram a utilização de detecção oscilométrica em CZE, na forma de protótipos operando a 20 ou 40 kHz e 600 kHz, respectivamente. A influência do diâmetro interno do capilar na resposta do detector foi considerada por Zemann e colaboradores [83]. Kaniánsky e colaboradores [84] utilizaram em CZE o detector previamente descrito para ITP [79,80]. Neste trabalho, parâmetros como a característica de resposta, o ruído branco e a sensibilidade foram avaliados. Os autores também aplicaram seu sistema na detecção de ânions utilizando α -ciclodextrina para promover a separação [85] e na caracterização da pureza de derivados da β -ciclodextrina [86]. Fracassi da Silva e Lago [87] utilizaram detecção oscilométrica na detecção de álcoois alifáticos separados por MEKC (capítulo 5).

1.6 Objetivos

O objetivo inicial deste trabalho era demonstrar a possibilidade de utilização de detecção condutométrica sem contato (também chamada de detecção oscilométrica) para eletroforese capilar. Para tanto, pretendíamos projetar, implementar e avaliar sistemas de detecção e aplicá-los em análises reais.

Devido à ausência de um equipamento de eletroforese capilar, passou também a ser objetivo a implementação deste com a idéia de produzir novas contribuições em alguns dos diversos subsistemas, bem como na aquisição de dados.

Dado o pequeno número de contribuições no sentido de utilizar a detecção condutométrica para diversos tipos de amostras e a total ausência da proposta de detecção oscilométrica na literatura, nosso objetivo foi também o de propor e avaliar este sistema de detecção para alguns tipos distintos de amostras.

2 - Construção dos Equipamentos de Eletroforese Capilar

2.1 Introdução

Desde o início, o objetivo primário deste trabalho foi o desenvolvimento do sistema de detecção oscilométrico (capítulo 4). Para tal desenvolvimento, foi necessária a construção de um equipamento de CE com um bom sistema de injeção de amostras e termostatização que servisse a este propósito. Neste escopo, logo se percebeu a dimensão da proposta. Após algum tempo, e várias modificações do projeto inicial, o primeiro protótipo do equipamento de CE entrou em operação rotineira, permitindo o aprimoramento do detector.

À medida que a CE foi se tornando mais familiar para os usuários de outras técnicas, e devido à sua inclusão na grade curricular dos cursos de graduação, a demanda pelo equipamento construído começou a aumentar. De fato, experimentos práticos foram introduzidos nos cursos de análise instrumental para os alunos de graduação dos cursos de farmácia e de química, além de alunos de pós-graduação do curso de CE e cromatografia líquida. Somando-se a isso o fato

de que componentes deste grupo de pesquisa também se propuseram a utilizar o equipamento em amostras ambientais, optou-se pela construção de um segundo equipamento de CE, que viesse a aliviar a demanda por este tipo de análise.

Assim, dois equipamentos completos foram construídos, designados aqui como EQ1 e EQ2. As figuras 2.1 e 2.2 mostram os diagramas de blocos destes dois equipamentos e a tabela 2.1 mostra algumas de suas características e diferenças.

Além das diferenças colocadas na tabela 2.1, o desenho do EQ2 foi modificado para conter todos os circuitos eletrônicos, os quais foram colocados em um módulo à parte do EQ1. Os softwares de controle e aquisição de dados também diferiram, sendo utilizados o Turbo Pascal 5.5 e o Delphi 5.0 (Inprise Corporation, Scotts Valley, CA, USA) no EQ1 e no EQ2, respectivamente.

Figura 2.1 – Diagrama de blocos do equipamento EQ1.

Figura 2.2 – Diagrama de blocos do equipamento EQ2.

Tabela 2.1 – Características dos equipamentos construídos

Item	EQ1	EQ2
Fonte AT	30 kV, bipolar	30 KV, unipolar
Injeção Eletrocinética	Sim	Sim
Injeção Hidrodinâmica	Gravidade	Pressão negativa
Deteção	Oscilométrica	Oscilométrica
Amostrador Automático	Não	Sim
Termostatização	Chaveamento AC	DC
Sistema operacional	DOS 5.0	Windows 95

2.2 Interface

A placa de interface utilizada (PCL711-S, Advantech, Taiwan) possui oito canais de entrada para conversão A/D e um canal de saída D/A. Ambos conversores são de 12 bits. A placa possui ainda 32 linhas (bits) de saída e entrada digital.

A saída analógica (DA) foi utilizada no controle do potencial aplicado pelas fontes de alta tensão. As entradas analógicas (AD) foram utilizadas no monitoramento dos sinais do detector, de potencial e corrente fornecidos pelas fontes de alta tensão e de temperatura. O controle das partes mecânicas, como motores DC e de passos ou ainda controle digital da polaridade da fonte AR-30 foram efetuadas com o auxílio das saídas digitais (DO). As entradas digitais (DI) foram utilizadas no monitoramento de sinais gerados para controle da posição amostrador, do braço injetor, e de dispositivo de segurança no EQ2.

2.3 Fontes de Alimentação

As fontes que alimentam os circuitos eletrônicos de ambos equipamentos são simétricas de $\pm 12 V_{reg}$ e foram construídas com base nos reguladores de tensão 7812 e 7912, cuja capacidade de corrente é de 1 A. O diagrama esquemático destas fontes pode ser visto na figura 2.3. A alimentação dos circuitos lógicos que trabalham com + 5 V foi derivada dos +12 V_{reg} gerados na fonte simétrica, pela redução da tensão a partir de um regulador 7805. Tensões não reguladas, entre 15 e 17 V, para a alimentação de motores e ventoinhas foram obtidas das saídas das etapas de retificação.

Tornou-se necessária a construção de fontes de +24 V_{reg} para a alimentação das fontes de alta tensão (item 2.4). Como a capacidade de corrente destas fontes deve ser de 2 A, utilizou-se reguladores variáveis LM350T (figura 2.4), sendo que a tensão pode ser ajustada no trimpot de 5 k Ω .

Figura 2.3 – Fonte de alimentação simétrica de $\pm 12 V_{reg}$.

Figura 2.4 – Fonte de alimentação de $+24 V_{reg}$.

2.4 Fontes de alta tensão

Foram utilizadas as fontes de alta tensão AR-30 (Bertan High Voltage Corp., Hicksville, New York), MJ30P400 (Glassman High Voltage Inc., Whitehouse Station, New Jersey), R15-30P e R15-30N (Matsusada Precision Inc., Huntington, New York). Todas as fontes possibilitam aplicação de potencial até o limite de 30 kV. Com exceção da fonte MJ30P400, que foi alimentada diretamente da rede elétrica, as fontes foram alimentadas com $+24V_{reg}$ (item 2.3).

O manuseio das fontes AR-30 e MJ30P400 é muito parecido, sendo, portanto tratado como item único. A tabela 2.2 traz a descrição dos sinais envolvidos no controle e operação das fontes AR-30 e MJ30P400, conectados à interface ou ao circuito de controle através de conectores DB15.

Tabela 2.2 – Descrição dos sinais das fontes AR-30 e MJ30P400

Pino	Função	
	AR-30	MJ30P400
1	-	-
2	V-prog (0-10V)	Comum
3	i-local	Comum
4	i-prog (0-10 V)	Comum
5	V-monitor (0-10 V)	Referência (10 V)
6	Polaridade (TTL)	-
7	Comum	-
8	Comum	Interlock
9	-	i-monitor (0-10V)
10	-	TTLEN (TTL)
11	-	i-prog (10 V)
12	Interlock (TTL)	GND
13	i-monitor (0-10 V)	V-prog (0-10 V)
14	-	V-monitor (0-10V)
15	+24V@2A	-

A figura 2.6 e ilustra as conexões físicas entre as fontes de AT acima descritas e o hardware do equipamento.

Figura 2.6 – Diagramas de conexão das fontes de AT.

Para evitar a exposição do usuário aos altos potenciais empregados, dispositivos de segurança foram instalados nos equipamentos. No EQ1, uma chave do tipo *reed-switch* foi instalada na porta do equipamento e ligada ao circuito da figura 2.7. O circuito permite que a fonte de AT seja desabilitada, toda vez que a porta do equipamento é aberta. Embora bastasse o simples envio de um sinal contínuo de valor zero pela saída DA, o que seria facilmente implementado por software, este circuito garante o desligamento da fonte, mesmo em casos de falhas ocorridas no computador.

Figura 2.7 – Circuito de inibição das fontes de AT. Os sinais TTLEN e INTERLOCK são ligados às fontes MJ400P30 e AR-30, respectivamente.

As fontes da série R15-30 possuem menos recursos, quando comparadas às outras duas utilizadas. Por isso, o circuito de proteção do EQ2 atua somente sobre o software de controle. Neste caso, a abertura da porta do equipamento é acompanhada através do monitoramento de um optoacoplador. A alta tensão é ajustada através da aplicação, via saída DA, de potencial contínuo entre 0 e 3 V. Estas fontes não possuem monitores, de modo que um circuito externo de medida de corrente teve de ser implementado no EQ2 (figura 2.8). Para permitir a rápida substituição das fontes positiva e negativa, um conector do tipo DB25 (compacto) foi padronizado para este fim. A figura 2.9 mostra as conexões das fontes R15-30.

Figura 2.8 – Circuito de leitura de corrente (EQ2).

Figura 2.9 – Conexões das fontes R15-30.

A rápida substituição das fontes R30-15P e R30-15N tornou necessária a padronização das conexões de AT.

O conector de AT foi montado da seguinte maneira: (1) um pino mini-banana macho foi soldado ao cabo que leva até o eletrodo de platina e imobilizado em um suporte acrílico com cola à base de epóxi (Araldite, Brascola, Brasil), (2) um pino mini-banana fêmea foi colocado em um suporte de acrílico, sendo que a parte posterior, soldada ao cabo de AT da fonte, foi imobilizada com cola epóxi. A parte voltada para o pino foi preenchida com resina de silicone RTV, a qual foi moldada para acomodar perfeitamente o conjunto do pino macho. Esses cuidados foram necessários para evitar o escape de alta tensão e possível danificação dos componentes dos circuitos. Além disso, o escape de alta tensão provoca ruídos espúrios no sinal do detector.

2.5 Controle de Temperatura

No EQ1, o controle da temperatura foi conseguido com o auxílio do circuito mostrado na figura 2.10, cuja parte de potência foi reproduzida de um circuito publicado por Steeman [88]. As junções P-N são bastante sensíveis a variações de temperatura, sendo a taxa de variação de $-2 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$. Com base neste princípio, quando o potencial da junção P-N do diodo ligado ao pino 13 do TL084 ultrapassar o potencial do pino 12 (determinado pelo potenciômetro de $10 \text{ K}\Omega$), o pino 14 assume um potencial negativo (-15 V), cortando o transistor cuja base está ligada a este ponto. Nesta condição, não flui corrente pelos pinos 1 e 2 do optoacoplador TIL 111 e o fototransistor é cortado. A porta do SCR pode então receber um potencial positivo e este passa a conduzir. O transistor acoplado à porta do SCR gera pulsos positivos a cada vez que o sinal da rede passa por zero, diminuindo o ruído de comutação do SCR. Com a condução do SCR, flui uma corrente através do resistor de 25 W , fazendo com que este se aqueça. Como o diodo sensor é disposto nas proximidades do resistor de potência, o potencial da junção diminui

até que o potencial do pino 12 se torne inferior ao do pino 13. A saída do comparador assume potencial positivo e o funcionamento descrito se inverte, desligando a carga resistiva. Note-se que se o *reed-switch* instalado na porta do equipamento (figura 2.7) estiver aberto, tanto a carga resistiva, quanto as ventoinhas estarão desligadas.

No EQ1 a temperatura é lida com o auxílio do circuito descrito na figura 2.11. Novamente valeu-se das variações de potencial na junção P-N de um diodo 1N914. Conectando-se este dispositivo no elo de realimentação de um amplificador inversor obtém-se uma relação linear entre a temperatura e a tensão de saída desse estágio. O zero da escala pode ser ajustado através de um potencial aplicado na entrada não inversora. Um segundo estágio amplificador é utilizado para ajustar a inclinação da reta correlacionada à temperatura, fazendo com que um volt corresponda a 10°C .

Figura 2.10 – Circuito de acionamento de carga em corrente alternada para controle de temperatura.

Figura 2.11 – Circuito de leitura de temperatura do EQ1

Com o intuito de se desenvolver um sistema de controle de temperatura livre do chaveamento de cargas em AC, o que é suscetível à geração de ruído, optou-se por um conceito de termostatização, baseado em corrente contínua para o EQ2. A figura 2.12 traz o diagrama esquemático deste circuito.

Um potencial de referência (ajustado através do potenciômetro de 1 kΩ) é somado ao potencial gerado pelo sensor de temperatura LM35 (10 mV/°C). A soma dos dois sinais é então entregue a um amplificador logarítmico. O valor do sinal na saída deste amplificador (V_s) pode ser calculado a partir da equação 2.1:

$$V_s = -\frac{V_e}{|V_e|} \beta \log|V_e| \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde V_e é o sinal na entrada do amplificador e β é a constante de proporcionalidade, que depende da temperatura e das características do diodo utilizado.

O sensor de temperatura e o circuito no interior da linha tracejada ficam situados no compartimento do equipamento a ser termostatizado, logo acima de uma ventoinha (12 V). Estas partes foram montadas de forma com que o ar circule por todo o interior do compartimento.

2.6.1 Injeção eletrocinética

A maneira mais simples de realizar a injeção de amostra é através da instrumentação disponível para aplicação de alta tensão. Na injeção eletrocinética, as espécies com carga de mesmo sinal do eletrodo do reservatório de amostragem migram para o interior do capilar com uma velocidade que depende, dentre outros fatores, da mobilidade da espécie e da velocidade do fluxo eletroosmótico. A equação 2.1 pode ser utilizada no cálculo da quantidade de material injetado:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{eof}) \pi r^2 V_i t_i C}{L} \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde, μ_e e C são a mobilidade e concentração da espécie injetada, respectivamente, μ_{eof} a mobilidade do fluxo eletroosmótico, r e L são o raio e o comprimento do capilar, respectivamente, V_i o potencial aplicado durante a injeção e t_i o tempo de injeção.

Devido à dependência da mobilidade da espécie, existe uma discriminação do material injetado eletrocineticamente, uma vez que os íons de maior mobilidade migrarão preferencialmente para o interior do capilar. Outro problema relacionado à injeção eletrocinética é a dependência da quantidade de material em função da condutividade da amostra. Para amostras com alto teor iônico, o campo elétrico incidente sobre a região de amostragem é menor do que para amostras com baixo teor iônico. Isto ocorre uma vez que a diferença de potencial sobre a região de amostragem é dependente da resistência da solução amostrada [89]. A utilização de padrão interno é uma boa alternativa para contornar este efeito [67].

Para amostras que apresentam alta resistência elétrica, este efeito pode ser utilizado para estratégias de pré-concentração (FASI, *Field Amplified Sample Injection*).

2.6.2 Injeção hidrodinâmica por gravidade

A automação da etapa de injeção é responsável por considerável aumento na reprodutibilidade das análises [90,91]. Rose e Jorgenson [90] verificaram que o desvio padrão relativo das áreas dos picos foi reduzido de 11,8 % para a injeção manual a 2,9 % para a injeção automatizada.

A pressão hidrostática pode ser conseguida pela aplicação de pressão ou elevando-se o reservatório com a amostra em relação ao outro (h). Este último método é conhecido como injeção por gravidade. O volume de amostra injetada (v) por gravidade é determinado por:

$$v = \frac{\rho g \pi r^4 t_i h}{8 \eta L} \quad \text{Eq. 2.2}$$

onde, ρ é a densidade da solução, g a aceleração da gravidade, r o raio do capilar, t_i é o tempo de injeção, η é a viscosidade da solução e L o comprimento do capilar.

Os tempos gastos pelo injetor para atingir a altura h e depois retornar à posição inicial são denominados tempo de subida (t_s) e descida (t_d), respectivamente. Estes tempos devem ser somados ao tempo de injeção (t_i) no cálculo da quantidade de amostra injetada:

$$t_T = 0,5t_s + t_i + 0,5t_d \quad \text{Eq. 2.3}$$

O sistema de injeção por gravidade, ou SIG, foi implementado no EQ1 utilizando-se um mecanismo de impressora matricial (Grafix MTA, 80 colunas). A base do mecanismo foi serrada e fixada verticalmente ao gabinete do EQ1, conforme a figura 2.13. Um suporte para o eletrodo de AT, o reservatório e o capilar, foi adaptado em braço de acrílico, o qual foi parafusado no carro de

impressão (figura 2.14). A placa de controle da impressora foi colocada em um gabinete à parte, juntamente com outros circuitos de controle.

Deste modo, quando o carro de impressão é acionado através da porta paralela do microcomputador, todo o conjunto é movido no sentido vertical. A extensão do movimento pode ser controlada pelo número de caracteres enviados para a porta de impressão.

Caracterização do SIG

A repetibilidade do SIG foi verificada pela injeção consecutiva de amostra sintética contendo uma mistura de NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} e Li^+ , na concentração de 50 μM em cada cátion.

Se considerarmos que o sistema de detecção possui resposta linear nas condições experimentadas, então a área dos picos deve manter uma relação linear em função do tempo de injeção e da diferença de nível h .

Na figura 2.15 são mostradas quatro curvas de área do pico (ver detecção, capítulo 4) em função da diferença de nível dos reservatórios no momento da injeção por gravidade. Cada ponto no gráfico é a média de quatro injeções. Pode-se verificar visualmente pelos resultados da figura 2.15 que a dispersão é muito maior para o Mg^{2+} . Este efeito pode ser compreendido levando-se em consideração a adsorção do Mg^{2+} no capilar, sendo este bastante pronunciado para íons com dupla carga.

O aplicativo Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) foi utilizado no cálculo das áreas dos picos obtidos. Há diversos critérios que podem ser adotados para a integração de picos, sendo que os resultados da integração podem diferir substancialmente para métodos diferentes [92]. Independentemente do método de integração utilizado, picos com cauda geralmente apresentam problemas na localização dos seus limites.

Figura 2.13 – Foto do equipamento 1. (a) Mecanismo de impressora matricial adaptado para efetuar injeções por gravidade, (b) gabinete em acrílico, (c) ventoinha, (d) cabo de conexão da fonte de AT AR-30 e (e) reservatórios contendo o tampão de corrida e eletrodos de platina.

Figura 2.14 – Detalhe de construção do conjunto do braço de acrílico e reservatório de injeção de amostras.

Figura 2.15 – Área dos picos em relação à diferença de nível (h) no momento da injeção por gravidade. Condições: Tampão MES/His 20 mmol/L, etér coroa 18-crown-6 2,5 mmol/L, pH 6,0; Potencial de separação 20 kV; Tempo de injeção 30 s. Amostra sintética contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ em cada íon.

O gráfico de área do pico em função do tempo de injeção também se comportou linearmente. Como exemplo, para Mg^{2+} o coeficiente de correlação da reta obtida foi de 0,996 para 6 pontos. A mesma dispersão dos valores de área do pico da figura 2.15 foi verificada.

A repetibilidade do sistema foi verificada por 25 injeções sucessivas de amostra sintética contendo Mg^{2+} , escolhido por ter apresentado maior dispersão nos resultados – a dispersão observada para Mg^{2+} deve-se ao forte efeito de adsorção na parede do capilar. Os desvios padrão relativos encontrados para a área e altura dos picos foram de 5,0 % e 2,6 %, respectivamente, para injeção a 10 cm por 30 s. Os tempos de subida e de descida foram $(0,147 \pm 0,008)$ s/cm e $(0,036 \pm 0,005)$ s/cm, respectivamente. Os tempos de subida e de descida foram obtidos a partir do cronômetro do microcomputador, a partir da modificação do software de aquisição e controle. Deste modo, os tempos podem estar defasados em alguns milésimos de segundo.

Convém lembrar que os desvios obtidos não se referem somente ao sistema de injeção, mas à somatória das variâncias individuais que contribuem para a dispersão das zonas [93].

2.6.3 Injeção hidrodinâmica por aplicação de pressão

O sistema de injeção hidrodinâmica implementado no segundo equipamento baseia-se na redução da pressão do reservatório contrário ao reservatório da amostra, este sob pressão ambiente. Um diagrama esquemático da disposição das diversas partes do EQ2 pode ser visto na figura 2.16.

Para aumentar o grau de automação e minimizar o custo do sistema de injeção por pressão (SIP), evitou-se a utilização de válvulas solenóides para o controle. A redução de pressão é conseguida pela movimentação de um êmbolo de uma seringa (S1) com o auxílio de um braço mecânico. A seringa S1 é conectada ao reservatório através de tubulações e conexões próprias para a sua utilização em sistemas de pressão. Inicialmente, S1 repousa na posição de menor volume. Nesta região foi feito um canal que conecta a tubulação com o ambiente, de modo que nesta posição a pressão sobre o reservatório é igual à pressão ambiente. Quando o motor é acionado, o êmbolo é puxado para trás, aumentando o volume acoplado à tubulação e, conseqüentemente, reduzindo a pressão. Ao término do tempo de amostragem, o motor é acionado no sentido contrário, impulsionando o êmbolo para a posição inicial e restabelecendo a pressão atmosférica no reservatório. A figura 2.17 ilustra o funcionamento do SIP.

Para flexibilizar a diferença de pressão conseguida com o SIP, uma segunda seringa, S2, foi conectada à tubulação. Assim, variando-se o volume interno de S2 consegue-se diferentes reduções de pressão. Para evitar vazamentos no sistema, S1 e suas conexões foram imobilizadas com resina de poliéster. Os ciclos de pré-tratamento, preenchimento e lavagem dos capilares necessitam que o SIP fique acionado por um tempo relativamente longo, quando

comparado aos tempos de injeção normalmente utilizados. Para evitar o superaquecimento do motor, uma válvula manual foi colocada entre S1 e o reservatório. Nestes casos, o SIP é acionado por alguns segundos e a válvula é fechada, mantendo a pressão na tubulação.

Figura 2.16 – Esquema de montagem do EQ2, representando o SIP, amostrador e demais suportes para os eletrodos e capilar. S1, S2 são seringas de 10 mL (ver texto), M1 e M2 são motores de acionamento dos braços de injeção e amostragem, respectivamente, V é uma válvula manual, R1 e R2 são reservatórios de 1,5 mL para amostra e tampão de corrida. O vácuo é aplicado sobre o reservatório R2. Os eletrodos de AT e terra (GND) são posicionados nos reservatórios R2 e R1, respectivamente.

O circuito completo de acionamento do braço de injeção é bastante simples e pode ser visto na figura 2.18. Um motor de trava elétrica de porta de automóvel (Dispositivo FEC QME-1 0C, Fiat, Brasil) foi utilizado como dispositivo eletromecânico de deslocamento do braço. O bit DO9 é responsável pela inibição

ou habilitação do motor, pelo corte da tensão de alimentação via RL1. O bit DO10 efetiva o acionamento do motor através de RL2.

Figura 2.17 – Diagrama ilustrando o funcionamento do SIP. (a) Posição inicial, pressão sobre o reservatório igual a P_{atm} ; (b) Na posição de injeção o êmbolo é puxado para trás; (c) Devido ao aumento de volume gerado, a pressão sobre o reservatório sofre redução.

Figura 2.18 – Circuito de acionamento do braço injetor.

A variação de pressão conseguida com a introdução da seringa S2 está ilustrada na figura 2.19. A diferença de pressão conseguida na tubulação é da ordem de unidades de psi, apropriada para injeção de amostras, uma vez que pressões em torno de 1.0 psi são utilizadas na maioria dos casos encontrados na literatura.

Figura 2.19 – Variação de pressão do SIP

A tabela 2.3 mostra os resultados de repetibilidade do SIP.

Tabela 2.3 – Repetibilidade do SIP

Íon	A / 10 ⁻² V.min	h / 10 ⁻¹ V	t _m / min
Na ⁺	2,51 ± 0,08	4,2 ± 0,1	2,26 ± 0,04
Li ⁺	1,40 ± 0,05	2,91 ± 0,08	2,62 ± 0,05

A - área; h - altura; t_m - tempo de migração; Resultados para cinco injeções sucessivas; Condições: Tampão MES/His 10 mmol/L; Potencial 20 kV; Injeção por 1 s, com S2 na posição 2 mL. Íons injetados na concentração 100 μmol/L.

2.7 Amostrador

No segundo equipamento, o fato da injeção de amostras ser realizada próxima à região de potencial zero (em relação à alta tensão utilizada na separação) permite a utilização, de forma segura, de um sistema de amostragem automático. O amostrador construído consta basicamente de duas partes: (1) um carrossel contendo os reservatórios e (2) um braço mecânico para a introdução do capilar e eletrodo no reservatório.

O carrossel é composto por um disco de acrílico, simetricamente perfurado em oito posições, permitindo a acomodação de reservatórios de 1,5 mL (do tipo Eppendorf ou similar). O disco de acrílico foi acoplado diretamente ao eixo de um motor de passos (STP203ND, Epson), por meio de uma haste de acrílico. Próximo à base do motor, foi colocado um sensor óptico utilizado para determinar a posição inicial do amostrador (posição zero). O circuito de acionamento do motor de passos é bastante simples, uma vez que os pulsos de acionamento são gerados diretamente pelo computador através das saídas digitais (DO 0 a DO 3) da placa de interface. A potência dissipada no acionamento é baixa, de forma que puderam ser utilizados transistores BC 548, de uso geral. O sensor de posição zero foi projetado para dar uma resposta entre 0 e 5 V, compatível com os níveis TTL, sendo a saída do sensor ligada diretamente na entrada digital DI 0 da placa de interface. O carrossel foi montado sobre uma base deslizante, permitindo que as amostras possam ser trocadas facilmente. Nas figuras 2.20 e 2.21 podem ser vistos, respectivamente, os circuitos de acionamento e do sensor de posição zero. A figura 2.22 traz um diagrama esquemático do carrossel do amostrador automático.

Além da construção do carrossel, é necessário um mecanismo que permita a movimentação vertical do capilar e eletrodo, quando da troca dos reservatórios. Com esta finalidade, foi construído um suporte em acrílico para acomodar o capilar e um dos eletrodos de platina. Este suporte foi fixado a um dispositivo eletromecânico de trava elétrica de porta de automóvel, similar ao utilizado no braço de injeção (Dispositivo FEC QME-1 0C, Fiat, Brasil). A extensão do

movimento do braço é de aproximadamente 2 cm. O braço é movimentado com o auxílio de um circuito de acionamento controlado pelo bit DO7 da saída digital da placa de interface. Para minimizar a dissipação de potência, um circuito temporizador foi utilizado para controlar o tempo de acionamento do motor. Na figura 2.23, pode ser visto o circuito de acionamento do braço.

Figura 2.20 – Circuito de acionamento do motor de passos do amostrador.

Figura 2.21 – Sensor de posição zero do amostrador.

Figura 2.22 – Visão explodida do carrossel do amostrador automático.

Figura 2.23 – Circuito de acionamento do braço do amostrador.

O circuito desenvolvido para o acionamento do braço de amostragem permite o controle do movimento do braço utilizando-se apenas um bit da saída digital. O sentido do deslocamento é determinado pelo nível lógico do bit de controle. O motor utilizado no braço do amostrador possui uma chave interna que permite o monitoramento da posição do braço. Essa chave foi apropriadamente conectada a uma das entradas digitais da placa de interface. Assim, o software de controle checa a posição do braço antes de efetuar qualquer operação com o carrossel do amostrador, de modo a evitar que o capilar e o eletrodo sofram algum tipo de impacto mecânico.

2.8 Software

2.8.1 – Equipamento 1

O software de controle e aquisição de dados do primeiro equipamento foi escrito em Turbo Pascal 5.5, sob plataforma DOS 5.0. O programa utiliza conceitos de programação orientada a objetos, colocando-se a placa de interface e o hardware do equipamento como objetos. Cada um destes objetos possui propriedades e métodos que podem ser acessados a qualquer momento do programa principal. O programa principal, que funciona de maneira seqüencial, utiliza as *units* EC e Gráficos. A *unit* EC possui as rotinas de funcionamento e acesso do hardware do equipamento, como por exemplo, a aplicação do potencial pela fonte de AT ou a aquisição do sinal do detector. A *unit* Gráficos contém as informações para a visualização dos resultados no monitor.

Maiores detalhes do funcionamento do programa de controle e aquisição do primeiro equipamento podem ser vistos no apêndice.

2.8.2 – Equipamento 2

O software de controle e aquisição de dados do segundo equipamento foi escrito em Delphi 5.0, sob plataforma Windows 95. O ambiente de programação do Delphi é completamente voltado à programação orientada a objetos. As rotinas escritas são acionadas por um encadeamento de eventos, como por exemplo, o acionamento do mouse. O ambiente de programação fornece uma poderosa interface gráfica, o que torna os programas desenvolvidos agradáveis aos usuários. Essa interface gráfica aparece como *forms*, enquanto que o código fonte fica armazenado nas *units*.

A figura 2.24 mostra uma correlação entre as diferentes partes do programa, sem envolver detalhes técnicos específicos. As setas indicam que as *units* utilizam algum tipo de parâmetro ou variável externa.

Figura 2.24 – Diagrama do programa de controle do segundo equipamento

O *form* Principal é base do programa e integra todos os outros. É a janela que inicialmente aparece quando da execução do programa. O *form* Sobre é um tipo de apresentação do programa e não interfere no controle do equipamento. O *form* Parâmetros realiza a comunicação entre usuário e o programa de controle, em relação aos dados operacionais, como o tipo de injeção, potencial aplicado,

informações de hardware e configuração do equipamento, etc. O *form* Aquisição contém os procedimentos para a aquisição de dados propriamente dita. A *unit* CE2 possui vários procedimentos de controle do equipamento. Ela utiliza *units* mais básicas para construir procedimentos mais complexos. A *unit* Sample contém os procedimentos básicos para o acionamento do mecanismo do amostrador automático. A *unit* PCLDelphi2 controla a placa de interface PCL711. Esta foi ligeiramente modificada a partir da *unit* original (PCL), para incluir um filtro digital de mediana no procedimento ADAvg. Além disso, os procedimentos de acesso às portas de entrada e saída digitais foram reestruturados. O *form* Salvar efetua o registro dos dados gerados em Aquisição.

Maiores detalhes do funcionamento do programa de controle e aquisição do segundo equipamento podem ser vistos no apêndice.

2.9 Considerações Gerais

Neste ponto da discussão, é inevitável a comparação crítica dos dois equipamentos construídos.

Em termos gerais, o EQ2 possui maior versatilidade na injeção e processamento seqüencial de amostras, devido ao amostrador automático. Além disso, o software de controle e aquisição de dados, por trabalhar em ambiente Windows, é mais agradável ao usuário. Por outro lado, estes fatos isoladamente não garantem a boa reprodutibilidade nas análises. Com o sistema de injeção por gravidade, implementado no EQ1, tem-se conseguido boa reprodução dos resultados, mesmo efetuando-se a troca manual dos reservatórios. Como pontos favoráveis, o EQ2 é (1) mais compacto, não possuindo módulos complementares e (2) pode ser facilmente reproduzido, uma vez que são utilizados componentes disponíveis no mercado ou de fácil fabricação. De maneira contrária, o sistema de injeção do EQ1 necessita de impressoras matriciais, o que pode dificultar a sua construção ou manutenção.

Ambos os sistemas de termostatização operam até, aproximadamente, 10 °C acima da temperatura ambiente, embora o sistema do EQ1 tenha se mostrado mais eficiente na refrigeração do capilar, como verificado na reprodução de experimentos que envolvem maior dissipação de calor no capilar (como em MEKC, por exemplo).

De qualquer maneira, o EQ1 passou por uma série muito maior de testes e de condições de trabalho, que, durante as quais, eventuais falhas puderam ser corrigidas. De fato, o EQ1 tem sido amplamente utilizado em análise de rotina e no desenvolvimento de aplicações (capítulo 5), além de servir como ferramenta didática em aulas de análise instrumental, em cursos de graduação, e também disciplinas da pós-graduação. Por outro lado, o EQ2 tem sido importante no estudo do sistema de detecção e no desenvolvimento da instrumentação.

3 - Capilares e Reagentes

3.1 Reagentes Utilizados

Todos os reagentes utilizados no preparo de tampões de corrida, padrões e amostras foram de grau analítico ou superior. Todas as soluções envolvidas neste trabalho foram preparadas com água deionizada de resistência elétrica acima de 17 M Ω e filtrada com filtro de 0,22 μ m (Nanopure UV, Barnstead).

Os reagentes ácido láctico (HLac), ácido 2-N[morfolino]etanosulfônico (MES), histidina (His), éter coroa 18-crown-6, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dimetil- β -ciclodextrina (d- β -CD), trimetil- β -ciclodextrina (t- β -CD), dodecilsulfato de sódio (SDS), metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) foram de procedência MERCK.

Os tampões de corrida foram preparados diariamente, a partir de soluções estoque 0,1 mol/L ou 0,5 mol/L e guardadas em geladeira. A tabela 3.1 lista os

tampões utilizados nas diversas aplicações. De maneira a facilitar a compreensão, as concentrações utilizadas foram omitidas da tabela, mas estão descritas no capítulo 5.

Tabela 3.1 – Tampões de corrida utilizados

Composição básica	Aditivos	pH	Utilização
	-		Cátions
MES/His	18-crown-6	6,0	Cátions + Amônio
	CTAB		Ânions
HLac/His	18-crown-6	4,9	Cátions + Amônio
	MeOH		Cátions
$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$	d- β -CD, t- β -CD, MeOH, ACN	7,0	Ácidos graxos
	SDS, MeOH	6,9	Álcoois alifáticos

As amostras sintéticas foram preparadas pela mistura e diluição de soluções estoque 0,1 mol/L. Soluções estoque de cátions e ânions foram preparadas preferencialmente a partir de sais de cloreto e sais de sódio, respectivamente. Os sais foram adquiridos de diversos fornecedores e foram utilizados sem tratamento prévio. Os padrões de ácidos graxos de cadeia linear foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO).

Amostras de água de chuva foram injetadas sem tratamento prévio, mas adicionando solução de Li^+ 0,1 mol/L para uma concentração final de 20 $\mu\text{mol/L}$.

Material particulado foi amostrado em filtro de PTFE por um período de oito horas, a uma vazão de 10 L/min. O filtro foi mergulhado em 25 mL de água deionizada por 35 minutos sob agitação constante. A solução resultante foi filtrada em filtro de 0,22 μm (Millipore).

Amostras de gordura de coco foram adquiridas no mercado local e saponificadas tratando-se 0,5 g de amostra com solução de NaOH em metanol (0,5 mol/L) a 75-80 °C por cinco minutos.

Os padrões de álcoois foram preparados pela diluição, em tampão de corrida, de alíquotas de 10 μ L de cada álcool até o volume final de 10 mL.

3.2 Capilares

Antes da sua utilização, os capilares de sílica fundida de 50 ou 75 μ m (J&W Scientific, Folsom, USA) foram tratados com (1) hidróxido de sódio 0,1 mol/L por 10 minutos, (2) água deionizada por 10 minutos, (3) tampão de corrida por 10 minutos e (4) aplicação do potencial até a estabilização da linha base.

O comprimento dos capilares foi de 60 cm, exceto quando explicitado nas condições experimentais dos eletroferogramas (capítulo 5). Em todos os casos, o detector foi posicionado a 10 cm do final do capilar.

4 - Detecção

4.1 Introdução

De maneira diferente da detecção condutométrica convencional (CD), na detecção oscilométrica (OD) não há a necessidade dos eletrodos estarem diretamente em contato com a solução de medida. Este fato é derivado das altas frequências utilizadas na OD, da ordem de centenas de kHz a dezenas de MHz, em comparação com valor típico de 1 kHz utilizado em CD. Em altas frequências, a reatância capacitiva do reservatório da amostra – e este pode ser um béquer, uma tubulação industrial ou mesmo um capilar de sílica – assume um valor reduzido, ao passo que a resistência da solução medida permanece praticamente constante – exceto em frequências demasiadamente altas (~10 MHz), onde o efeito de Debye-Falkenhagen [94] começa a ser observado.

A sensibilidade a variações nas propriedades dielétricas da solução mensurada é outra característica que diferencia a OD. Essa característica se torna evidente quando a frequência de operação é da ordem de dezenas de MHz, e em soluções que apresentam baixa condutividade. Estas condições estão muito distantes daquelas apresentadas neste trabalho. Assim, todas as discussões

relacionadas às características de resposta do sistema de detecção devem ser entendidas em termos de variações de condutividade da solução em questão.

Também de maneira contrária à CD, a cela oscilométrica foi construída a partir de dois eletrodos tubulares de 2 mm de comprimento (ver itens 4.4 e 4.5), espaçados por 1 mm, seguindo a orientação do eixo onde o capilar é posicionado, como mostrado na figura 4.1.

Figura 4.1 – Representação artística da cela oscilométrica (fora de escala).

A propagação do sinal (figura 4.2) é feita por diversos caminhos: transmissão (1) direta entre os eletrodos, (2) pela parede do tubo capilar, (3) pela camada externa de poliimida que recobre o capilar e (4) pela solução que preenche o interior do capilar. A figura 4.3 ilustra o circuito equivalente simplificado desta cela oscilométrica.

Figura 4.2 – Propagação do sinal.

Figura 4.3 – Circuito equivalente simplificado da cela oscilométrica, representando as capacitâncias da parede do capilar (C_w) e intereletrodos (C_o) e a resistência da solução (R_s).

O capacitor C_o é originado pela transmissão direta do sinal entre eletrodos, R_s representa a resistência da solução no interior do capilar e C_w representa a associação em série das duas capacitâncias formadas entre os eletrodos e a solução, tendo como dielétrico a parede de sílica do capilar.

Analisando-se o circuito da figura 4.3, nota-se que:

- (1) Com a redução da frequência de operação, as reatâncias capacitivas, X_{C_o} e X_{C_w} , tornam-se elevadas, sendo que o circuito equivalente pode ser simplificado num circuito $R_s C_w$ série. Neste caso, a impedância da cela aumenta, e em casos extremos, a contribuição da resistência pode ser negligenciada.
- (2) Com o aumento da frequência de operação, as reatâncias capacitivas assumem valores reduzidos. Com a redução da reatância X_{C_w} , o circuito equivalente pode ser simplificado num circuito $R_s C_o$ paralelo. Em casos extremos, a redução de X_{C_o} torna insignificantes as variações em torno de R_s .

Do exposto, verifica-se que há uma região ótima de frequência de operação, onde variações na resistência da solução e, portanto, na sua condutividade, são mensuráveis. O item 4.5 traz uma descrição mais detalhada destas características.

O diagrama de blocos da figura 4.4 ilustra o funcionamento global do detector oscilométrico. Um sinal alternado de alta frequência é aplicado a um dos eletrodos tubulares da cela oscilométrica, por meio de um gerador de sinal. Como resultado, a corrente que flui pela entrada do conversor corrente/tensão (i/e) reflete todos os caminhos percorridos pelo sinal. Supondo-se que todos os parâmetros geométricos da cela são constantes, verifica-se que a variação de corrente obtida reflete diretamente às variações de composição da solução no interior do capilar. Deste modo, quanto menor a resistência da solução, ou seja, maior a condutância, maior será a corrente registrada.

Após a transformação do sinal de corrente em tensão, pelo conversor i/e , segue-se a retificação do sinal efetuada por um circuito de precisão, operando em meia onda. O sinal resultante é filtrado em um filtro RC (passa-baixas) e finalmente passa por uma etapa de amplificação e compensação da linha base (V_{os}). O sinal DC resultante (V_s) é aplicado diretamente à entrada da placa de interface PCL 711 (capítulo 2).

Figura 4.4 – Diagrama de blocos do sistema de detecção oscilométrico.

4.2 Geradores de Sinal

Um sinal senoidal, e conseqüentemente livre de harmônicos, pode ser conseguido com o auxílio do circuito da figura 4.6. O circuito integrado (CI) MAX 038 é um gerador de ondas completo, com sinal de saída de $2 V_{pp}$ até 20 MHz. Variações de freqüência e amplitude podem ser feitas mediante circuito externo relativamente simples, mas neste trabalho a freqüência de trabalho deste circuito foi fixada em 600 kHz. Como inconvenientes, o circuito é mais dispendioso que o mostrado na figura 4.5, e possui nível de ruído maior que os geradores

comerciais utilizados (FG-2002C e FG8002, Goldstar, Korea).

Figura 4.6 – Circuito do gerador senoidal integrado.

O gerador da figura 4.6 apresenta-se como uma alternativa razoável aos geradores comerciais, proporcionando uma redução de aproximadamente 80 % nos custos desta parte do sistema de detecção, mas os resultados reportados neste trabalho foram obtidos utilizando-se os geradores comerciais, devido à maior versatilidade na escolha da frequência e amplitude de operação.

4.3 Circuito Eletrônico

Um parâmetro importante a ser considerado, a resposta em frequência, foi responsável por uma série de atualizações no circuito, no que se refere às etapas de conversão i/e e retificadora, uma vez que as demais etapas trabalham em regime DC. Estas atualizações tiveram como base a substituição dos amplificadores operacionais (AO) com resposta lenta, sendo os parâmetros avaliados a banda passante (*bandwith*) e a tensão máxima de saída (de pico a pico) que pode ser chaveada para uma determinada frequência (*maximum output voltage swing*). Este último parâmetro está relacionado ao tempo de subida (*slew rate*) do AO, e não pode ser tabelado por depender da frequência de operação. A

tabela 4.1, na página 71, apresenta as características dos AO utilizados [96, 97].

A versão mais atual do circuito do detector pode ser vista nas figuras 4.7 e 4.8. Nesta versão, o detector foi montado em duas partes. Na primeira parte, a cela oscilométrica, o estágio de conversão i/e, o retificador e o filtro RC foram colocados em uma única placa utilizando-se a tecnologia de montagem em superfície (SMD, surface mount devices). Uma blindagem foi colocada em torno desta para minimizar a captação de ruído. Na segunda parte, e do lado externo do equipamento, foram acomodados os estágios finais de amplificação e compensação da linha base.

Figura 4.7 – Primeira parte do circuito do detector oscilométrico – Módulo 1.

Figura 4.8 - Circuito do detector oscilométrico – Módulo 2.

Verificou-se que o ruído e a deriva da linha base foram significativamente reduzidos pelo recobrimento da primeira parte do circuito com borracha de silicone, provavelmente devido à sua estabilização térmica. Variações na temperatura ambiente causaram maior influência no caso do OPA2604, provavelmente devido à sua baixa capacidade térmica, uma vez que seu encapsulamento é bastante reduzido. Note-se que a deriva térmica deste CI é comparável à do OPA606, onde o efeito da temperatura não foi pronunciado.

A alimentação do circuito foi feita utilizando uma fonte simétrica de ± 12 V, similar à da figura 2.3.

4.4 Cella e Confecção dos Eletrodos

Diversos procedimentos foram utilizados para a confecção dos eletrodos e celas oscilométricas. Em relação aos eletrodos, quatro aproximações, aqui apresentadas em ordem cronológica, foram conduzidas com sucesso:

(1) Cola de Prata. Como primeira aproximação, eletrodos de prata foram aplicados sobre capilares de sílica sem o recobrimento de poliimida, utilizando-se cola de prata (suspensão de prata metálica em solvente orgânico, Cerdec, Brasil). Posteriormente, passou-se a confeccionar os eletrodos sobre a camada de poliimida, uma vez que não foi observada a depreciação do sinal analítico. Apesar de conferir ótimo contato elétrico, estes eletrodos de prata possuem baixa resistência mecânica e são de difícil reprodução devido à sua superfície irregular, tornando a sua construção laboriosa. Como inconveniente adicional, a cela fica imobilizada sobre a coluna, sendo necessária a sua reconstrução a cada troca de capilar.

Figura 4.9 – Eletrodos confeccionados com cola de prata. Na parte inferior observa-se parte de uma régua graduada, sendo que os centros dos traços em preto estão separados por um milímetro.

(2) Borracha condutora. Estes tipos de polímeros condutores são muito utilizados em teclados de computador e de calculadoras portáteis. Dois discos deste material foram adaptados de um teclado de microcomputador e pressionados contra duas placas de circuito impresso (Figura 4.10). Os eletrodos foram atravessados pelo capilar com o auxílio de uma agulha de seringa. Nesta cela foi colocada uma chapa metálica entre os eletrodos para minimizar a transmissão direta do sinal. Apesar de proporcionar um baixo volume (~ 5 nL), a borracha condutora sofre desgaste rapidamente, causando interrupções na transmissão do sinal e aumentando o ruído do sistema.

(3) Agulha de Seringa. Eletrodos tubulares construídos com agulhas descartáveis (aço inox) foram cortados sob rotação com o auxílio de uma lima. Para minimizar o espaçamento entre o eletrodo e o capilar o diâmetro interno da seringa foi adaptado ao diâmetro externo do capilar através de corrosão com mistura de HCl e HNO_3 concentrados (1:1). Como o material da agulha não pode ser soldado ao

fio de contato do circuito, o eletrodo foi imobilizado ao contato elétrico em um suporte construído em placa de circuito impresso contendo a etapa de conversão i/e. Aqui também foi utilizado um plano aterrado entre os eletrodos para minimizar a transmissão direta do sinal.

Figura 4.10 – Vista lateral explodida da cela oscilométrica utilizando eletrodos de borracha condutora. P1 e P2 são placas de circuito impresso de dupla face (desenho fora de escala).

Figura 4.11 - Eletrodos de agulha. Ao fundo escala em milímetros.

(4) Fio de *wire-wrapping*. Os eletrodos atualmente utilizados são construídos com fios de *wire-wrapping* (OK Industries Inc., New York, USA) de 0,25 mm (d. e.), do tipo utilizado em protótipos. Na confecção dos eletrodos, um segmento de alguns centímetros deste fio é enrolado, com o auxílio de ferramenta apropriada, em uma agulha descartável de 0,4 mm que serve de molde, resultando em um tubo de alguns milímetros. Pela equação 4.1 é possível calcular o comprimento do eletrodo (L_{eletrodo}) em milímetros em função do comprimento do fio (L_{fio}), se for utilizada agulha de 0,4 mm (d. e.) como molde.

$$L_{\text{eletrodo}} = 0,125 + 1,258.L_{\text{fio}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

Figura 4.12 – Eletrodos de *wire-wrapping*. (a) Eletrodos de 2 mm enrolados no capilar, antes da extensão do fio de *wire-wrapping* ser cortada. (b) Eletrodo soldado sobre a placa de circuito impresso. O capilar nesta figura é de 360 e 75 μm de diâmetro externo e interno, respectivamente.

A utilização de fios de *wire-wrapping* é bastante atrativa, uma vez que eletrodos com comprimento e diâmetro variado podem ser feitos rapidamente com ótima reprodutibilidade. Além disso, este material pode ser soldado diretamente na placa de circuito impresso, conferindo um perfeito contato elétrico e resistência mecânica.

A figura 4.13 mostra as principais celas montadas, em ordem cronológica. A tabela 4.1 apresenta as principais características destas versões.

Tabela 4.1 – Características das celas e conversores i/e utilizados

Versão	Eletrodos	Plano de terra	Conversor i/e	BP / MHz	f / kHz	Nº Estágios
1 ^a	Prata	Não	LF 356	4,5	93 (fixa)	-
2 ^a	Borracha	Sim	LF 356	4,5	Até 150	1
3 ^a	Prata	Sim	OPA 606	12	Até 1100	-
4 ^a	Agulha	Sim	OPA 606	12	Até 1100	1
5 ^a	Fio	Não	OPA 2604	20	600	2

Como citado acima, parte do circuito da última versão do detector foi construída com tecnologia SMD. Na figura 4.12, pode-se perceber que uma abertura foi feita na placa de circuito impresso na região entre os eletrodos. Esta medida foi tomada com o intuito de minimizar a transmissão direta do sinal entre os eletrodos. A redução pôde ser observada através medidas de ganho, utilizando-se o analisador de impedância HP4194A (figura 4.14). As medidas foram efetuadas injetando-se o sinal do analisador no eletrodo onde é feita a entrada do sinal do gerador, enquanto que a entrada do analisador foi conectada à saída do conversor i/e. As três curvas mostram o ganho do conversor i/e quando a placa de circuito impresso está (a) intacta e sem os eletrodos, (b) com a abertura e sem os eletrodos e (c) com a abertura e com os eletrodos. Observando-se o ponto máximo de ganho, percebe-se que há maior transmissão do sinal na (condição a), devido à transmissão pela placa. A transmissão cai quando é feita a abertura (condição b), e volta a crescer quando os eletrodos são soldados à placa (condição c), uma vez que aumenta a área de transmissão do sinal.

Figura 4.13 – Evolução das versões do detector oscilométrico.

Figura 4.14 – Transmissão do sinal pela placa de circuito impresso. (a) Placa sem abertura e sem eletrodos, (b) placa com abertura e sem eletrodos e (c) placa com abertura e com eletrodos.

4.5 Avaliação e Caracterização do Detector

De modo a avaliar o desempenho do sistema de detecção proposto, alguns testes foram conduzidos, alterando-se os parâmetros de operação e as condições físico-químicas. Os parâmetros que sofreram variação foram a condutividade do eletrólito, a frequência de operação e a amplitude do sinal aplicado, as dimensões da cela oscilométrica e a temperatura de trabalho. Estes parâmetros serão, para efeito didático, discutidos separadamente, mas na verdade estão estreitamente correlacionados. No item 4.6 será feita uma discussão mais detalhada do comportamento destes parâmetros na otimização da condição de trabalho do detector.

Os resultados apresentados neste item se referem à última versão do detector (versão SMD com eletrodos de fio de *wire-wrapping*), exceto quando explicitado no texto ou nas figuras.

4.5.1 – Resposta em função da condutividade

A corrente medida pelo circuito eletrônico, ou seja, a corrente que flui através da cela oscilométrica, reflete a impedância total do sistema. Esta, por sua vez, é combinação das reatâncias X_{Co} e X_{Cw} e a resistência da solução R_s , e é melhor expressa em termos do inverso da impedância complexa: a admitância complexa (Y).

$$Y = G + jB = \frac{R_s}{R_s^2 + X_w^2} + j \frac{R_s^2 + X_w(X_o + X_w)}{X_o(R_s^2 + X_w^2)} \quad \text{Eq. 4.2}$$

A parte real da admitância complexa [98] é chamada de condutância (G), e não deve ser confundida com a condutância da solução no interior do capilar. À parte imaginária, dá-se o nome de susceptância (B). O módulo da admitância, que é proporcional à corrente medida, é dado por:

$$|Y| = \frac{\sqrt{R_s^2 X_o^2 + [R_s^2 + X_w(X_o + X_w)]^2}}{X_o(R_s^2 + X_w^2)} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Mais uma vez, se fixarmos a frequência de operação e a geometria da cela, e negligenciarmos as variações de capacitância (ou mais corretamente de constante dielétrica) influenciadas pela temperatura, as variações na admitância Y serão devidas às variações na condutividade da solução.

Como pode ser visto na equação 4.3, não há linearidade no módulo da admitância como função da condutância ($1/R_s$) da solução. Este fato concorda com a curva de resposta experimental do detector, obtida em função da condutividade de soluções de KCl no interior do capilar (figura 4.15). A tensão foi monitorada na saída do seguidor de tensão (PT1, na figura 4.8), de modo a não haver influência da tensão de ajuste de linha base.

Figura 4.15 – Resposta do detector em função da condutividade de soluções de KCl no interior de um capilar de 75 μm . Detector operando a 600 kHz e 2 Vpp.

Como consequência, a sensibilidade do sistema de detecção vai depender do nível de condutividade do tampão de corrida utilizado (valor basal de condutividade). Como a separação eletroforética também é afetada pela composição e concentração do tampão de corrida, há uma interdependência nos desempenhos dos sistemas de detecção e de separação. Felizmente, estes parâmetros caminham no mesmo sentido, pois em casos onde a concentração dos analitos da amostra é alta, e portanto, a sensibilidade do sistema de detecção não é crítica, é necessária a utilização de tampão de corrida com concentração elevada, para minimizar os efeitos de eletrodispersão. Por outro lado, para amostras onde a concentração dos analitos é baixa, necessitando de um sistema de detecção sensível, pode-se utilizar tampão de corrida de baixa concentração sem o problema de sobreposição de bandas. Para baixos valores de condutividade, como pode ser visto na figura 4.15, a inclinação da curva de resposta é mais acentuada, garantindo maior sensibilidade.

A figura 4.16 mostra o efeito da condutividade do tampão de corrida na resposta do sistema de detecção, em termos da relação sinal/ruído (RSR), na

separação de K^+ , Na^+ e Li^+ , utilizando-se tampão de corrida composto por HLac/His.

Figura 4.16 - RSR em função da condutividade do tampão de corrida composto por HLac/His. Condições: Potencial 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 30 s; Capilar de sílica fundida de 75 μ m (d. i.), 50 cm, com 40 cm até o detector; Frequência 590 kHz. (■) NH_4^+ , (●) Na^+ , (▲) Li^+ , todos na concentração de 100 μ mol/L.

Como fator adicional, o ruído do sistema é incrementado pelo aumento da corrente que flui no capilar quando do aumento da concentração do tampão.

Para pequenas variações de condutividade em torno do valor basal, é possível aproximar-se a curva de resposta do detector a uma reta, cuja inclinação é dada pela derivada da curva de resposta naquele ponto específico. Esta reta pode ser utilizada para fazer a conversão do sinal de saída do detector em condutividade. Um exemplo deste procedimento foi aplicado ao caso anterior, na separação de NH_4^+ , Na^+ e Li^+ com tampão HLac/His. Um exemplo de conversão aparece na figura 4.17, onde a altura dos picos destes íons (eixo das coordenadas) aparecem refletidas em termos de variações de condutividade (eixo das abscissas), em torno da condutividade residual do tampão de corrida (1,108 mS/cm).

Figura 4.17 – Conversão do sinal do detector em variações de condutividade.

4.5.2 – Frequência de operação

Como discutido acima, a impedância da cela oscilométrica é dependente da frequência de operação. Além disso, as características de entrada dos AO utilizados também determinam a frequência máxima de operação. Isto se deve ao fato do AO possuir uma capacitância de entrada (tipicamente da ordem de pF). Quando a frequência atinge valores elevados, a impedância é diminuída, aterrando o sinal da entrada (ver figura 4.14, por exemplo).

Pode-se comparar na figura 4.18, os valores absolutos de linha base (V_{dc} , medidos no ponto TP1 do circuito), juntamente com os valores de área dos picos de metilsulfonato, obtidos em diversas frequências e utilizando-se MES/His 20 mM e CTAB 0,2 mM como tampão de corrida. Aqui novamente observa-se que a curva atinge um máximo na resposta e pode-se perceber uma forte correlação entre os dois valores.

Figura 4.18 – Resposta do detector em função da frequência de operação. (■) Valores absolutos do sinal para o tampão composto por HLac/His 20 mmol/L e CTAB 0,2 mmol/L, potencial aplicado –20 kV; (△) Área de MSA 100 μ mol/L, injeção eletrocinética a 5 kV por 5 s, potencial aplicado –20 kV. Capilar: 75 μ m.

Embora possa parecer atraente atribuir a condição ótima de trabalho, em termos da frequência de operação, à condição de máximo na resposta, como encontrado nas curvas da figura 4.18, esta é uma conclusão de certa maneira precipitada. Há que se levar em consideração a RSR em função da frequência, e não parece haver um modelo simples para o seu comportamento (ver item de otimização dos parâmetros).

4.5.3 – Amplitude do sinal aplicado

A resposta do sistema de detecção se mostrou dependente da amplitude do sinal aplicado, como pode ser visto na figura 4.19.

Os fatores que levam as áreas dos picos a passarem por um ponto de

máximo não são tão claros quanto a influência da frequência de operação, mas estão relacionados com a resposta característica dos AO quando estimulados por sinais de entrada de grande amplitude, principalmente no que se refere à etapa de conversão i/e, uma vez que esta possui ganho bastante elevado. Assim, para sinais de grande amplitude na entrada, o conversor i/e acaba distorcendo o sinal, por não ter tempo suficiente para alcançar a amplitude correta. Deve-se destacar que não se trata da saturação do sinal de saída, uma vez que a própria curva de resposta (ver figura 4.15) tende para um limite de aproximadamente $3,8 V_{dc}$, o que corresponde à $0,38 V_p$ na saída do conversor i/e, se considerarmos que o filtro RC na saída do retificador não possui tensão de *ripple* significativa. O efeito da amplitude do sinal aplicado também é discutido no item 4.6 de otimização dos parâmetros.

Figura 4.19 – Variação das áreas dos picos em função da amplitude do sinal aplicado (V_{pp}). (■) Ba^{2+} , (○) K^+ , (▲) Na^+ e (▽) Li^+ . Condições eletroforéticas: tampão HLac/His 20 mmol/L; Injeção por pressão a 3,2 psi por 3 s; Potencial de separação 25 kV; Capilar de 75 μm ; Frequência 600 kHz. Cátions injetados na concentração de 100 $\mu mol/L$.

4.5.4 – Dimensões da cela oscilométrica

Vários experimentos foram conduzidos variando-se o comprimento e o espaçamento dos eletrodos, tão bem como a frequência de operação. O objetivo destes estudos foi verificar a influência da geometria da cela na resposta do detector.

Para estes estudos, foi utilizada uma base de acrílico na qual os eletrodos sob investigação foram imobilizados com fita adesiva (figura 4.20). Os eletrodos foram confeccionados com 1, 2 e 5 mm de comprimento, de modo a permitir sua soldagem direta aos contatos da placa de circuito impresso em SMD. Os experimentos foram realizados mantendo-se espaçamentos de 0,5, 1, 2 e 4 mm entre os eletrodos.

Obviamente, este arranjo não reproduz exatamente a disposição dos eletrodos posicionados diretamente sobre a placa de circuito impresso, principalmente em relação à captação de ruído. Mas, em caráter de comparação dos resultados, tomou-se o cuidado de conduzir todos os teste sob as mesmas condições.

Figura 4.20 – Cella oscilométrica confeccionada em acrílico para experimentos envolvendo as dimensões dos eletrodos.

Para estes estudos, uma solução padrão contendo sulfato, metilsulfonato, acetato e lactato, na concentração 100 $\mu\text{mol/L}$ de cada íon, foi injetada

eletrocineticamente a 5 kV por 5 s. O potencial de separação foi fixado em -20 kV. O tampão de corrida foi composto por MES/His 20 mmol/L e CTAB 0,2 mmol/L.

Primeiramente, deve-se destacar que os seguintes resultados merecem ser tomados de maneira qualitativa, pois não foi realizado um número significativo de cada experimento (devido ao grande número de variáveis) para que haja embasamento estatístico. Embora algumas conclusões concretas possam ser feitas, outras devem servir como tendência de comportamento.

Os comentários a respeito destes experimentos serão feitos em relação aos picos obtidos para o MSA, mas o comportamento mostrado é seguido por todos os demais íons analisados.

A primeira observação relevante é o fato da frequência onde se observa o máximo de resposta, em termos de área do pico, estar deslocado para frequências mais baixas. Este fato pode ser justificado pelas diferenças existentes entre a cela utilizada e aquela formada quando se posicionam os eletrodos diretamente sobre a placa de circuito impresso. A figura 4.21 ilustra o deslocamento. A faixa de frequência estudada foi determinada com base neste tipo de resposta, considerando-se que o sinal analítico é muito pouco intenso fora da faixa. Embora a figura 4.21 apresente os resultados de área do pico de MSA, a RSR é o melhor parâmetro a ser considerado.

Na figura 4.22 pode ser comparada a RSR dos picos de MSA para diferentes espaçamentos. De maneira geral, percebe-se que a RSR para espaçamento 1 mm é ligeiramente maior. Na figura 4.22b também é visível a diminuição da RSR com o aumento da frequência. Para determinadas frequências altas, os eletrodos de 1 mm exibem RSR superior aos eletrodos de 2 mm. Este comportamento sugere que a RSR pode ser otimizada mediante o ajuste da frequência de operação, sem a necessidade de variar as dimensões da cela, o que não é viável do ponto de vista prático. Na figura 4.22d observa-se que a RSR para espaçamentos de 4 mm é inferior aos outros casos. Foram realizados experimentos com espaçamento 8 mm (não mostrados) que comprovam que o sinal é criticamente reduzido para espaçamentos superiores a 4 mm.

A figura 4.23 apresenta a comparação dos resultados de RSR em termos do comprimento dos eletrodos. Parece não haver diferença significativa na utilização de eletrodos de 1 ou 2 mm, ao passo que eletrodos de 5 mm oferecem RSR ligeiramente inferior.

Figura 4.21 – Área do pico de MSA em função da frequência de operação para diferentes espaçamentos. Comprimentos do eletrodo: 1 mm. Espaçamento entre os eletrodos: (□) 0,5 mm, (●) 1 mm, (△) 2 mm e (▼) 4 mm.

Com relação à largura dos picos, esta parece não sofrer grandes alterações em função das dimensões estudadas. A figura 4.24 mostra os resultados, em termos das larguras dos picos obtidos. Estes resultados levam a crer que, mesmo para dimensões maiores da cela de detecção, o detector não influi significativamente para a dispersão dos picos. A variância em relação ao sistema de detecção é de difícil avaliação, uma vez que a contribuição de todo o sistema é verificada nos eletroferogramas obtidos.

Figura 4.22 – RSR como função da frequência de operação e do espaçamento entre os eletrodos. Espaçamentos: (a) 0,5 mm, (b) 1 mm, (c) 2 mm, (d) 4 mm. Tamanho dos eletrodos: (■) 1 mm, (○) 2 mm e (▲) 5 mm.

Figura 4.23 – RSR como função da frequência de operação e do comprimento dos eletrodos. Tamanho dos eletrodos: (a) 1 mm, (b) 2 mm e (c) 5 mm. Espaçamento entre os eletrodos: (□) 0,5 mm, (●) 1 mm, (△) 2 mm e (▼) 4 mm.

Figura 4.24 – Largura à meia altura ($w_{1/2}$) do pico de MSA em função da frequência de operação e do espaçamento entre os eletrodos. (a) 0,5 mm, (b) 1 mm, (c) 2 mm e (d) 4 mm. Tamanho dos eletrodos: (□) 1 mm, (●) 2 mm e (▲) 5 mm.

4.5.5 – Variações de temperatura

Quando se passou a trabalhar com a versão SMD do detector, notou-se que a linha base adquiriu um ruído de longo termo, que após a avaliação de alguns parâmetros pode-se concluir que este era causado por flutuações de temperatura, reforçadas pela convecção de ar do sistema de termostatização. Convém ressaltar que este tipo de ruído não era perceptível nas versões anteriores.

Comparando-se os valores de deriva média nas tensões de *offset* para os AO OPA 606KP e OPA 2604AU, de 10 e 8 $\mu\text{V}/^\circ\text{C}$, respectivamente, conclui-se que não há razão plausível para atribuir a introdução do ruído devido a este parâmetro.

Por outro lado, e apesar de não constar esta informação nos manuais dos AO, pode-se concluir que a capacidade térmica do OPA 2604AU é muito menor do que a do OPA 606KP, devido às diferenças nos encapsulamentos, SOIC 8 e DIP 8, respectivamente.

A figura 4.25 mostra dois eletroferogramas, sendo que na figura 4.25b trabalhou-se com o sistema de termostatização desligado, o que revelou uma grande melhoria no nível de ruído do sinal.

De modo a reduzir o ruído devido a variações de temperatura, todo o módulo 1 do detector foi revestido com borracha de silicone, com resultados satisfatórios, como pode ser visto no capítulo 5 (figura 5.8, por exemplo).

Figura 4.25 – Ruído introduzido por convecção de ar. Sistema de termostatização (a) ligado e (b) desligado. Condições: Tampão de corrida MES/His 20 mmol/L; Injeção por gravidade a 10 cm por 40 s; Potencial 20 kV. Frequência 600 kHz e 2 V_{pp}. Amostra sintética: (1) K⁺, (2) Ba²⁺, (3) Mn²⁺, (4) Na⁺, (5) Li⁺, cada cátion na concentração de 100 μmol/L.

4.6 Otimização dos parâmetros

Como pôde ser percebido nos itens anteriores, há uma série de parâmetros que influenciam na resposta do sistema de detecção.

De maneira a racionalizar a otimização dos parâmetros de operação, torna-se importante reconhecer isoladamente as contribuições da cela oscilométrica e do circuito eletrônico.

Mas como primeira aproximação, deve-se levar em consideração o sistema de separação eletroforético, cujo parâmetro mais relevante é representado pela condutividade do tampão de corrida. Por exemplo, deve-se primeiramente verificar se o sistema separação é adequado ao tipo de amostra a ser separada. As variáveis mais acessíveis para se alcançar a separação dos analitos na amostra são a concentração do tampão, o potencial de separação e a adição de modificadores orgânicos e complexantes.

Os parâmetros de operação do detector não devem influir no sistema de separação. De fato, não foi observada nenhuma influência do sistema de detecção no processo de separação. Portanto, um ponto de partida razoável é a utilização da frequência de operação onde se observa o máximo valor de V_{dc} (ver figura 4.18), utilizando-se valores baixos de V_{pp} . A partir do sistema de separação definido, um refinamento dos parâmetros de operação do detector pode ser conduzido.

De modo a verificar a resposta do circuito eletrônico em diferentes condições de operação, a cela oscilométrica foi substituída por um resistor de $10\text{ M}\Omega$.

Percebe-se na figura 4.26 que a resposta do circuito se torna muito mais linear quando se trabalha em frequências mais baixas. Este está relacionado com a máxima saída que o AO consegue alternar (nos manuais este parâmetro aparece como *maximum output swing voltage*). Do mesmo modo, o máximo de resposta obtido é deslocado para valores mais baixos de frequência quando a amplitude do sinal é aumentada, como pode ser visto na figura 4.27.

Também com o resistor de $10\text{ M}\Omega$, o ruído, avaliado pelo desvio padrão da linha base, não se mostrou bem comportado, apesar de ser perceptível seu aumento em frequências mais altas, como mostrado na figura 4.28.

Figura 4.26 – Valor absoluto da linha base como função da corrente na entrada. Cella oscilométrica substituída por resistor de $10\text{ M}\Omega$. Frequência de operação de (O) 400 kHz e (■) 590 kHz.

Um AO ideal possui banda passante infinita, ou seja, possui o mesmo comportamento em qualquer frequência de trabalho. Na prática, os AOs possuem limitações, como a dificuldade de responder rapidamente a variações de tensão na entrada (*maximum output swing voltage*, máxima variação de tensão de saída). Estas limitações se aplicam aos primeiros estágios do circuito do detector, ou seja, o conversor i/e e o retificador, e levam à resposta não-linear mostrada nas figuras 4.26 e 4.30.

Figura 4.27 – Valor absoluto da linha base como função da frequência para alguns valores de amplitude (V_{pp}) do sinal aplicado. Cella oscilométrica substituída por resistor de 10 M Ω . (■) 2 V_{pp} , (▲) 4 V_{pp} e (○) 6 V_{pp} .

Figura 4.28 – Desvio padrão da linha base como função da frequência de operação para alguns valores de amplitude do sinal aplicado (V_{pp}). Cella oscilométrica substituída por resistor de 10 M Ω . (□) 2 V_{pp} , (▲) 4 V_{pp} , (+) 6 V_{pp} .

O sinal medido (V_s) é proporcional à ΔV_{dc} que, por sua vez, é função da corrente que flui pelo conversor i/e. Essa corrente é dada pelo valor V_{pp} do gerador de sinais e pela admitância da cela:

$$V_s = A\Delta V_{dc} = A\left[g(i, f) - g(i_o, f)\right] \quad \text{Eq. 4.4}$$

onde f é a freqüência de operação, $g(i, f)$ é a função que descreve a curva de resposta e A é o ganho do último estágio do circuito. Os índices 0 e 1 se referem a duas condições do sinal de entrada, como por exemplo, os valores de tensão na base e no topo do pico.

Se considerarmos a freqüência constante, V_s pode ser aproximado a:

$$V = A[i_1 - i_0]g'(i_0) \quad \text{Eq. 4.5}$$

sendo que, $g'(i_0)$ é a derivada da curva de resposta no ponto i_0 .

A figura 4.29 ilustra as conseqüências deste tipo de aproximação para três condições hipotéticas de amplitude do sinal de entrada (V_{pp}) e mesma admitância da cela. O mesmo estímulo na entrada, como por exemplo, variações na condutividade da solução, produzirão diferentes variações de corrente, mas não necessariamente as mesmas variações em V_{dc} . Como pode ser visto na figura 4.29, a maior variação de corrente, Δi_3 produz a menor variação de tensão na saída ΔV_3 .

Figura 4.29 – Variações no sinal de saída V_{dc} para três situações hipotéticas do estímulo de entrada.

Em termos de variações na admitância da cela, pode-se escrever:

$$V_s = \frac{A\Delta Y}{Y_0} V_{pp0} h'(V_{pp0}) \quad \text{Eq. 4.6}$$

onde a função h descreve V_{dc} como função de V_{pp} , e V_{pp0} e Y_0 são a amplitude do sinal e a admitância da cela na condição de linha base (i_0).

A RSR pode ser avaliada por:

$$RSR = \frac{A\Delta Y}{Y_0} \frac{V_{pp0} h'(V_{pp0})}{\sigma_{V_s}} \quad \text{Eq. 4.7}$$

onde σ_{V_s} é o desvio padrão da linha base.

Desde que o estímulo de entrada seja constante (mesma amostra, condições de injeção e tampão de corrida), a RSR pode ser otimizada

maximizando a seguinte função:

$$\gamma(V_{ppO}) = \frac{V_{ppO} h'(V_{ppO})}{\sigma_{V_s}} \quad \text{Eq. 4.8}$$

A função h foi avaliada em algumas freqüências de operação a diferentes valores de V_{pp} . Os resultados podem ser vistos na figura 4.30. Note-se que para baixos valores de V_{pp} , a maior inclinação é conseguida em 590 kHz. A mesma inclinação é observada para 400 e 700 kHz até, aproximadamente, $5 V_{pp}$, mas esta se estende até $10 V_{pp}$ para 400 KHz, valor no qual o AO conseqüentemente sofre limitação devido à tensão de alimentação.

Figura 4.30 – Valor absoluto da linha base (V_{dc}) em função da amplitude do sinal aplicado (V_{pp}) para algumas freqüências de operação. Capilar de 75 μm preenchido com tampão composto de HLac/His 20 mmol/L.

Em resumo, os seguintes passos devem ser seguidos para a otimização dos parâmetros de operação:

- (1) O tampão de corrida é escolhido com base nos critérios de separação;
- (2) A frequência inicial é escolhida para o máximo valor de V_{dc} para um baixo valor de V_{pp} . Devido às limitações do circuito, a frequência ótima deverá ser menor ou igual a este valor estabelecido;
- (3) Uma vez selecionada a frequência, a curva de V_{dc} em função de V_{pp} deve ser construída. Com estes dados é possível realizar uma estimativa numérica do produto $V_{pp} \cdot h'(V_{pp})$. Para o caso do ruído ser homoscedástico, a maximização deste produto leva à melhor condição de V_{pp} , caso contrário é necessário avaliar σ_{Vs} ao longo da curva $h(V_{pp})$.
- (4) O procedimento deve ser repetido para outras frequências antes que a decisão final seja tomada.

Apesar de parecer um procedimento laborioso, é possível efetuar esta avaliação de maneira completamente automatizada, uma vez que os geradores de sinal possuem entrada para o controle de frequência e amplitude. Embora não tenha sido implementado neste equipamento, é possível, através de conversores D/A, controlar estes parâmetros e, assim, com uma programação adequada, otimizar o sistema de detecção automaticamente.

4.7 Simulação do Circuito Equivalente

A simulação de modelos elétricos da cela condutométrica é muito importante, do ponto de vista do entendimento teórico do seu comportamento. O circuito elétrico equivalente para a cela condutométrica foi ligeiramente adaptado para incluir nos cálculos a capacitância da solução (C_s), como na figura 4.31. Esta capacitância torna-se importante nos meios onde há grande variação na constante dielétrica do eletrólito e, portanto, em experimentos envolvendo MEKC e eletroforese em meios não aquosos.

Figura 4.31 – Circuito equivalente simplificado da cela oscilométrica, alterado para incluir a capacitância da solução (C_s).

As simulações envolveram apenas as características físicas da cela e da condutividade da solução no interior do capilar. Na prática, já foi demonstrado que em altas frequências o circuito como um todo tende a perder a sensibilidade, uma vez que deve ser considerada a capacitância de entrada dos amplificadores operacionais empregados.

As planilhas em anexo, construídas em MathCad 8.0, fornecem todas as informações e fórmulas utilizadas nos cálculos.

4.7.1 Modelo de cálculo

As planilhas contêm as informações e equações para calcular o módulo da admitância e as suas partes real e imaginária. Para avaliar o comportamento da cela em uma estreita faixa de variação da condutividade da solução, foi efetuada a derivada da admitância da cela em relação à condutividade ($dY/d\kappa$). As regiões onde $dY/d\kappa$ são constantes indicam linearidade na resposta e o seu valor absoluto indica a taxa de variação, ou sensibilidade. Através dos gráficos de sensibilidade simulados é possível avaliar a resposta esperada para o detector em função de pequenas variações nos componentes do circuito equivalente e nas propriedades físicas da cela. Para maior clareza, os gráficos de sensibilidade aparecem sem as unidades nos eixos – condutividade (eixo das abscissas) em mS/cm e a derivada (eixo das ordenadas) em cm.

Convém ressaltar que, na prática, o sinal medido refere-se a pequenas variações de condutividade em torno de um valor basal (condutividade do tampão). Portanto, operar em uma região da curva de sensibilidade onde há linearidade ($dY/d\kappa$ constante) e alta taxa de variação (valor absoluto de $dY/d\kappa$ alto) implica em grandes variações no sinal analítico medido.

4.7.2 Capacitâncias da solução e residual

Estes parâmetros foram agrupados por não influírem significativamente na sensibilidade da resposta. A capacitância residual C_o contribui para o deslocamento da linha base, pela variação na admitância total (figura 4.32), mas percebe-se muito pouca variação nas curvas de sensibilidade, como mostrado na figura 4.33.

Figura 4.32 – Admitância total da cela para diferentes valores da capacitância residual C_o .

Figura 4.33 - Variação na sensibilidade da cela para diferentes valores de C_o .

A capacitância da solução (C_s) também parece possuir pouca influência na resposta da cela, ao menos na faixa de frequência estudada. A figura 4.34 traz as curvas para três valores de capacitância da solução. Os valores de C_s foram

estimados com base em diferentes espaçamentos entre os eletrodos (variando-se a distância entre suas placas) ou na manutenção da distância e alteração da constante dielétrica do meio. Vale observar que estas variações estão muito além de qualquer situação de interesse prático, ou seja, variações de 10 mm no espaçamento ou substituição de água por um hidrocarboneto.

Figura 4.34 - Variação na sensibilidade da cela para diferentes valores de C_s .

4.7.3 Tamanho dos eletrodos

A principal influência da variação do tamanho dos eletrodos recai sobre o valor da capacitância da parede do capilar (C_w), desde que se mantenha a distância entre eles constante. A variação de C_w traz conseqüências interessantes à sensibilidade, como pode ser visto na figura 4.35. Percebe-se, para baixos valores de condutividade, que o eletrodo de 2 mm resulta em maior resposta. Por outro lado, com o aumento da condutividade da solução, há uma inversão nas curvas de sensibilidade e o eletrodo de 4 mm parece ser a melhor alternativa de uso. O eletrodo de 1 mm parece ser apropriado apenas em casos onde a

condutividade da solução é muito baixa.

Figura 4.35 – Variação na sensibilidade para diferentes tamanhos de eletrodo, mantendo-se o espaçamento entre eles constante (1 mm).

4.7.4 Espaçamento entre os eletrodos

Diversos parâmetros variam com a distância entre os eletrodos. Com o aumento do espaçamento, C_o e C_s diminuem, mas como foi visto, estes parâmetros pouco afetam a sensibilidade. Por outro lado, R_s aumenta com o aumento do espaçamento. A figura 4.36 traz as curvas para três situações diferentes, mostrando drásticas variações. Para baixos valores de condutividade, espaçamento de 0,5 mm oferece maior sensibilidade. O perfil é alterado à medida que a condutividade aumenta, e em 1,5 mS/cm o espaçamento de 2 mm apresenta maior resposta.

Figura 4.36 – Variação na sensibilidade da célula para diferentes espaçamentos entre os eletrodos, mantendo-se o comprimento constante (2 mm).

4.7.5 Diâmetro interno do capilar

Quando se altera o diâmetro interno do capilar, há alterações em C_w , C_s e R_s , que como consequência causa grande variação na sensibilidade. A figura 4.37 ilustra estas variações. Note-se que, para as condições operacionais da simulação, o capilar com diâmetro interno de 20 μm apresenta sensibilidade muito baixa.

Figura 4.37 – Variação na sensibilidade da célula para capilares com diferentes diâmetros internos.

4.7.6 Frequência de operação

Por fim, a variação da frequência de operação promove drásticas alterações nos valores de admitância total da cela, mas diferentemente de C_o , também causa alterações na sensibilidade. A figura 4.38 mostra as curvas de sensibilidade para três valores de frequência. Verifica-se que para baixos valores de condutividade, é preferível operar em baixas frequências. Para condutividades elevadas, os dados da simulação revelam que a 1100 kHz pode-se obter boa sensibilidade, mas aqui deve-se levar em conta os estágios de entrada dos AOs utilizados (ver item de resposta em frequência do detector).

Os resultados obtidos para a simulação da sensibilidade de cela em função da frequência de operação são muito próximos daqueles obtidos para a variação do tamanho dos eletrodos. Como a substituição da cela não é uma tarefa muito simples, convém variar-se a frequência de operação para obter-se boa sensibilidade em uma ampla faixa de condutividades.

Figura 4.38 – Variação na sensibilidade da cela para diferentes frequências de operação.

4.8 Considerações Gerais

Após ultrapassar vários obstáculos e descartar alguns projetos mal sucedidos (propositadamente omitidos neste trabalho), chegou-se a uma versão do detector que apresentasse, ao mesmo tempo, boa sensibilidade e facilidade de operação.

Em 1997, quando foram obtidos bons resultados com uma das versões do detector, optou-se por enviá-los para o “3rd Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis” [99], culminando na sua apresentação em dezembro do mesmo ano. O trabalho completo foi submetido ao periódico *Analytical Chemistry* em fevereiro de 1998. Para nossa surpresa, uma semana após o envio, o grupo do Dr. Bonn, da Áustria, publicaria uma versão muito parecida da cela do detector neste referido periódico [81]. Felizmente, o artigo por nós submetido foi publicado em outubro de 1998 [82].

Este fato gera um ponto polêmico a respeito da introdução deste tipo de detecção em CZE, e, mais filosoficamente, sobre que tipo de trabalho deve ser considerado ao julgar-se a autoria de uma idéia ou conceito. Sem dúvida, um trabalho publicado em periódico de renome, como é o caso da *Analytical Chemistry*, possui repercussão muito maior do que a sua apresentação em um congresso “Latino-Americano”, mesmo que este seja de altíssimo nível e contando com a presença de membros da comunidade científica mundial. Analisando-se criticamente o trabalho do grupo austríaco, conclui-se que este não contém informações suficientes para a sua reprodução e mesmo erros conceituais em determinados pontos. Subseqüentemente [83], o grupo austríaco se utilizaria de características de construção da cela por nós descrita, como a utilização do plano de terra entre os eletrodos. Convém acrescentar que, neste período, a utilização do plano aterrado já havia tornado-se obsoleta e foi abandonada pelo nosso grupo, de maneira a simplificar ao máximo a construção da cela.

Autoria à parte, no próximo capítulo pretende-se demonstrar a versatilidade do detector oscilométrico em diversas aplicações.

5 - Aplicações

5.1 Introdução

Com a construção dos equipamentos de CE com detecção oscilométrica, tornou-se possível o desenvolvimento de diversas aplicações.

Embora este trabalho tenha como foco o desenvolvimento do sistema de detecção e a necessária construção dos equipamentos, algum tempo foi empreendido no estudo de separações específicas, como íons inorgânicos e orgânicos e, pela primeira vez, espécies neutras separadas por MEKC com detecção do tipo condutométrica (item 5.7).

Além disso, alguns estudantes deste Instituto vislumbraram que seria interessante a aplicação deste sistema de separação em seus projetos de pesquisa. Assim, compartilho justamente o mérito de alguns dos resultados.

A caracterização iônica em amostras de material particulado e água de chuva (item 5.4) foi conduzida com a ajuda de Flávio R. Rocha e Adalgiza Fornaro, aluno de doutorado e colaboradora de pós-doutorado, respectivamente, do Prof. Dr. Ivano G. R. Gutz.

A análise de ácidos graxos de cadeia linear (item 5.5) tem sido alvo de intensivo estudo do aluno de doutorado Marcone A. L. Oliveira, do grupo da Profa. Dra. Marina F. M. Tavares. Curiosamente, este tipo de analito foi aplicado a este sistema de separação devido à paralisação dos equipamentos de CE comerciais munidos de detecção UV-vis e com resultados tão promissores que encorajaram a continuação dos estudos. Neste ponto cabe comentar que nunca os equipamentos construídos neste trabalho ficaram parados, aguardando a manutenção especializada, fato que se pode considerar bastante relevante.

Por fim, as análises de cátions cálcio e magnésio em amostras contendo alta concentração de sódio (item 5.3) contaram com a participação dos alunos de iniciação científica Fernando P. Christino e Tacio P. Sansonovski.

5.2 Metais Alcalinos, Alcalinos Terrosos e Amônio

Metais alcalinos e alcalinos terrosos têm sido separados com sucesso por CE com detecção condutométrica [40, 100, 101], embora também seja comum o uso de detecção por absorção indireta na região do UV-vis [102]. No caso da detecção condutométrica, é comum a detecção direta utilizando-se tampões de corrida contendo contra íons de baixa mobilidade, uma vez que a mobilidade dos íons metálicos destes grupos é relativamente elevada. Como consequência, a condutividade destes tampões é baixa, o que garante uma ótima RSR e colocando a detecção condutométrica acima da detecção UV-vis em termos de sensibilidade.

O amônio é encaixado neste grupo por ser um cátion estável em uma ampla faixa de pH e possuir características semelhantes a dos metais do grupo IA. As mobilidades dos íons amônio e potássio são muito próximas, sendo necessária a adição de agentes complexantes ao tampão de corrida para promover a separação. Normalmente é utilizado o éter coroa 18-crown-6, que complexa seletivamente o íon potássio, diminuindo sua mobilidade. Alternativamente, pode-se trabalhar com tampões de corrida de alto valor de pH. Neste caso, desloca-se o equilíbrio para a formação de amônia, cuja mobilidade é zero, diminuindo a

mobilidade efetiva do íon amônio. Neste trabalho preferiu-se a utilização do éter coroa, quando averiguada a necessidade da separação de potássio e amônio. Convém notar que, da mesma forma que o íon potássio, a mobilidade do íon bário também é bastante influenciada pela presença deste agente complexante.

A tabela 5.1 traz os valores de mobilidade destes cátions [103].

Tabela 5.1 – Condutância iônica molar a diluição infinita (Λ_o) e mobilidade iônica a diluição infinita (μ^o) dos principais cátions alcalinos, alcalinos terrosos e amônio (a 25 °C).

Cátion	Λ_o	μ^o
	$10^{-4} \text{ m}^2 \text{ S mol}^{-1}$	$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Li^+	38,66	40,07
Na^+	50,08	51,90
K^+	73,48	76,16
Cs^+	77,20	80,01
Mg^{2+}	53,00	54,93
Ca^{2+}	59,47	61,64
Sr^{2+}	59,40	61,56
Ba^{2+}	63,60	65,92
NH_4^+	73,50	76,18

Em termos práticos, os valores de mobilidade tabelados não devem ser considerados absolutos, uma vez que estes dependem da temperatura e da força iônica do meio. Além disso, a complexação destes metais, principalmente os alcalinos terrosos, modifica drasticamente sua mobilidade. É o que se observa na ordem de migração obtida na maioria dos eletroferogramas, onde normalmente o tempo de migração para o íon sódio é inferior ao do íon magnésio.

Boa parte dos trabalhos envolvendo detecção condutométrica em CE utiliza tampão composto por MES/His. Isto é devido não só às suas características tamponantes, mas também pela sua baixa condutividade. Na verdade, uma

variedade de tampões de uso biológico (por exemplo, para meios de cultura), ou *Good's buffer* [104], possuem estas características.

A figura 5.1 ilustra uma separação de alguns metais destes grupos com tampão MES/His.

Figura 5.1 – Eletroferograma de amostra sintética contendo alguns cátions dos grupos alcalino e alcalino terroso. Condições: Tampão de corrida MES/His 10 mmol/L, pH 6,0; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 30 s; Capilar: sílica fundida, 75 μ m, 70 cm e 60 cm até o detector; Frequência: 600 kHz. Picos: (1) K^+ , (2) Ba^{2+} , (3) Ca^{2+} , (4) Na^+ , (5) Mg^{2+} e (6) Li^+ , todos na concentração de 10 μ mol/L.

Os LOD variam para cada íon, mas giram em torno de 10^{-6} mol/L, para injeção hidrodinâmica por gravidade [82]. Este LOD pode ser melhorado se considerarmos amostras com baixa condutividade e injeção eletrocinética, devido ao efeito de pré-concentração das bandas. Problemas de desvios na injeção eletrocinética podem ser evitados utilizando-se padrão interno [67].

De maneira geral, na análise de amostras diluídas, a concentração do tampão de corrida pode ser reduzida com o objetivo de melhorar o LOD. Infelizmente a redução da concentração aumenta a eletrodispersão das zonas e pode comprometer a separação.

O tampão composto por MES/His possui pouca interação com os metais alcalinos e alcalinos terrosos. Isto pode ser verificado no eletroferograma da figura 5.1 onde se percebe que os picos referentes aos metais bivalentes aparecem muito próximos. Isto pode causar problemas em casos onde uma destas espécies estiver, relativamente, em alta concentração (ver item 5.2). Nestes casos, uma boa alternativa é utilizar um tampão que promova forte interação com os analitos. Essa aproximação pode ser vista na figura 5.2 e 5.3, onde é mostrada a separação destes metais utilizando-se tampão composto por HLac/His.

Figura 5.2 – Eletroferograma de amostra sintética contendo amônio e alguns cátions dos grupos alcalino e alcalino terroso. Condições: Tampão de corrida HLac/His 30 mmol/L, CH₃OH 10 % (v/v), 18-crown-6 2,5 mmol/L; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 30 s; Capilar: 75 μ m, 60 cm, 50 cm até o detector; Frequência 600 kHz; Picos: (1) NH₄⁺, (2) K⁺, (3) Na⁺, (4) Ca²⁺, (5) Mg²⁺, (6) Li⁺ e (7) Ba²⁺. Todos os cátions na concentração 50 μ mol/L.

Figura 5.3 – Eletroferograma dos principais íons metálicos dos grupos IA e IIA. Condições: Tampão de corrida HLac/His 20 mmol/L, pH 4,9; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 10 s; Capilar: 75 μ m, 50 cm, 40 cm até o detector; Freqüência 600 kHz; Picos: (1) Cs^+ , (2) K^+ , (3) Ba^{2+} , (4) Sr^{2+} , (5) Na^+ , (6) Ca^{2+} , (7) Mg^{2+} e (8) Li^+ . Todos os cátions na concentração de 50 μ mol/L.

A utilização de tampão HLac/His aumenta consideravelmente a resolução entre os íons sódio, magnésio e cálcio. Pode-se notar na figura 5.2 que a utilização do éter coroa 18-crown-6 permite a resolução dos íons amônio e potássio, além de diminuir consideravelmente a mobilidade do íon bário.

A tabela 5.2 traz os LOD encontrados para estes íons, com base no sistema tampão da figura 5.2.

A determinação de íons inorgânicos e orgânicos é grande interesse em diversas matrizes, como demonstrado nos próximos itens.

Tabela 5.2 – LOD para os sistemas tampão baseados em HLac/His e MES/His.

Íon	LOD / $\mu\text{mol/L}$	
	HLac/His*	MES/His**
K^+	0,8	1,1
Ba^{2+}	1,1	1,2
Sr^{2+}	1,2	-
Na^+	1,6	1,6
Ca^{2+}	1,3	1,4
Mg^{2+}	0,9	1,2
Li^+	3,2	1,5

* Tampão HLac/His 20 mmol/L, pH 4,9, injeção por gravidade a 10 cm por 10 s, potencial de separação 20 kV. ** Tampão MES/His 10 mmol/L, pH 6,0, injeção por gravidade a 10 cm por 30 s, potencial de separação 20 kV.

5.3 Análise de Cátions em Solução para Hemodiálise

Várias amostras apresentam alta concentração de íons sódio, como soluções utilizadas em hemodiálise. A tabela 5.3 traz as concentrações típicas de uma solução para hemodiálise comercial (Farmarin, SP, Brasil). O controle deste tipo de produto requer a análise de diversas substâncias presentes em baixas concentrações. Dentre elas, os íons cálcio e magnésio apresentam o problema adicional de possuírem mobilidade próxima à do sódio, que, devido à sua quantidade na amostra, aparece no eletroferograma como um pico único. Na figura 5.4 é mostrado um eletroferograma de uma amostra sintética preparada contendo sódio na concentração de 0,5 mmol/L, cinquenta vezes maior que as concentrações de cálcio e magnésio e utilizando MES/His 20 mmol/L como tampão de corrida.

Essa relação de concentrações ainda está distante da relação encontrada em soluções de hemodiálise, o que inviabiliza a aplicação deste sistema de separação neste caso. Pode ser demonstrado que a separação completa de sódio e cálcio só ocorre quando essa relação é de 5:1, quando se utiliza MES/His como tampão de corrida. Na tabela 5.3 pode-se calcular que a concentração de sódio é oitenta vezes maior do que a de cálcio.

Tabela 5.3 – Concentração iônica de solução para hemodiálise

Íon	Concentração / mmol/L
K^+	1,5
Na^+	140
Ca^{2+}	1,75
Mg^{2+}	0,5

Figura 5.4 – Eletroferograma ilustrando a separação incompleta de amostra contendo alta concentração de sódio utilizando-se tampão MES/His 20 mmol/L. Condições: Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 30 s; Capilar: 75 μ m, 60 cm, 50 cm até o detector; Freqüência 600 kHz. Picos: (1) K^+ 10 μ mol/L, (2) Co-migração de Na^+ 500 μ mol/L, Ca^{2+} 10 μ mol/L e Mg^{2+} 10 μ mol/L e (3) Li^+ 100 μ mol/L.

Por outro lado, a utilização de tampão composto por HLac/His e metanol proporciona ótimos resultados. A figura 5.5 ilustra a separação completa de sódio, cálcio e magnésio, em uma amostra sintética onde o íon sódio foi adicionado em uma concentração mil vezes maior que a dos outros dois cátions. Como pode ser visto na figura, cálcio e magnésio são perfeitamente quantificáveis. Metanol teve de ser adicionado ao tampão para aumentar a resolução entre estas espécies.

Figura 5.5 – Separação de cálcio e magnésio na presença de grande quantidade de sódio utilizando tampão HLac/His 30 mmol/L e MeOH 10 % (v/v). Condições: Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 30 s; Capilar: 75 μm , 60 cm, 50 cm até o detector; Frequência 600 kHz. Picos: (1) Na^+ 10 mmol/L, (2) Ca^{2+} 10 $\mu\text{mol/L}$ e (3) Mg^{2+} 20 $\mu\text{mol/L}$.

Portanto, a utilização de sistema tampão composto por HLac/His é de grande valia na separação de cátions em amostras onde uma das espécies está presente em grande quantidade.

5.4 Análise de Cátions e Ânions em Água de Chuva

Diversas substâncias químicas estão presentes, em baixa concentração, nas fases líquida e gasosa da atmosfera e no material particulado, juntamente com os principais gases que a compõe. Embora alguns eventos possam ter origem natural, a interferência humana tem introduzido milhares de novas substâncias, que têm causado efeitos, às vezes desastrosos, ao equilíbrio do planeta. Como exemplo pode-se citar a diminuição do pH da água de chuva, devido à emissão antrópica de óxidos de enxofre e nitrogênio, além de ácidos carboxílicos. Devido a uma série de reações atmosféricas, muitas substâncias poluentes dão origem a espécies iônicas. O monitoramento destas espécies em água de chuva pode servir de indício do nível de qualidade do ar e da influência das atividades humanas, bem como auxiliar no entendimento dos processos de transferência de massas de ar e transporte de material.

O método padrão para determinação de íons em água de chuva é a cromatografia de íons. Devido às suas características, CE tem recebido muita atenção neste campo. A maioria destes trabalhos envolve CE com detecção por absorção indireta no UV-vis [105, 106], mas também pode ser encontrada detecção por fluorescência induzida por laser [107], absorção direta no UV-vis [108], e detecção eletroquímica [47, 107]. Boa seletividade e sensibilidade foram encontradas para nitrito e sulfito utilizando-se detecção amperométrica [107]. Detecção condutométrica foi aplicada na análise de íons inorgânicos na faixa de $\mu\text{g/L}$ [47]. Da mesma forma que a detecção condutométrica convencional, a detecção oscilométrica é bastante apropriada a este tipo de análise. As figuras 5.6 e 5.7 mostram eletroferogramas de cátions em água de chuva e material particulado, respectivamente.

Da mesma forma que os cátions, as espécies aniônicas também têm sido analisadas com o mesmo tampão MES/His, mas adicionando o inversor de fluxo CTAB. O eletroferograma de uma amostra típica pode ser vista na figura 5.8.

Figura 5.6 – Eletroferograma de cátions em amostra de água de chuva. Condições: Tampão de corrida MES/His 20 mmol/L, 18-crown-6 2,5 mmol/L; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 12 cm por 40 s; Capilar 75 μm , 70 cm, 60 cm até o detector; Frequência 600 kHz. Picos: (1) NH_4^+ , (2) K^+ , (3) Ca^{2+} , (4) Na^+ , (5) Mg^{2+} e (6) Li^+ 20 $\mu\text{mol/L}$. Li^+ foi adicionado à amostra como padrão interno.

Figura 5.7 – Eletroferograma de cátions em amostra de material particulado atmosférico. Condições: Tampão de corrida MES/His 20 mmol/L, 18-crown-6 2,5 mmol/L; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 12 cm por 40 s; Capilar 75 μm , 60 cm, 50 cm até o detector; Frequência 600 kHz. Picos: (1) NH_4^+ , (2) K^+ , (3) Ca^{2+} , (4) Na^+ , (5) Li^+ 20 $\mu\text{mol/L}$. Li^+ foi adicionado à amostra como padrão interno.

Figura 5.8 – Eletroferograma de ânions em amostra de água de chuva. Condições: Tampão de corrida MES/His 20 mmol/L, CTAB 0,2 mmol/L; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 12 cm por 40 s; Capilar 75 μ m, 60 cm, 50 cm até o detector; Frequência 600 kHz. Picos: (1) Cl^- , (2) não identificado, (3) NO_3^- , (4) SO_4^{2-} , (5) For^- , (6) Ac^- .

5.5 Detecção Indireta de Espécies de Baixa Mobilidade

Quando as espécies analisadas por CE com detecção condutométrica possuem baixa mobilidade, muitas vezes o melhor procedimento a ser seguido é o da detecção indireta [74]. Esta aproximação tem sido aplicada na separação de sais de amônio quaternário [82] e ácidos graxos de cadeia linear.

Ácidos graxos são definidos como ácidos carboxílicos alifáticos, saturados ou insaturados, cuja cadeia carbônica possui de 6 a 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos livres de ocorrência natural em gorduras, possuem número par de átomos de carbono e apresentam cadeia sem ramificações. A análise destes compostos é importante na caracterização de óleos comestíveis e produtos derivados de leite, além do monitoramento da pureza e/ou adulteração de azeites de oliva.

Normalmente, a análise de ácidos graxos é feita por cromatografia gasosa (GC) utilizando-se agentes derivatizantes que aumentam a volatilidade dos ácidos de cadeia mais longa, ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por absorção no UV. Neste último caso, derivatizantes são utilizados para conferir alta absorvidade.

Ácidos carboxílicos de cadeia longa têm sido separados por CZE com medida indireta de absorção na região do UV [109]. Por detecção condutométrica [30, 31] ácidos carboxílicos de cadeia relativamente curtas têm sido analisados (até 7 carbonos). A separação de outros tipos de surfactantes também tem sido investigada por CE com detecção condutométrica [40, 63, 64, 74].

Neste trabalho se tem conseguido a separação de ácidos graxos de 8 a 20 átomos de carbono na cadeia linear, como pode visto para uma mistura padrão no eletroferograma da figura 5.9, utilizando-se tampão composto por fosfato, acetonitrila, metanol, t- β -CD e d- β -CD. A figura 5.10 mostra uma separação de uma amostra de gordura de coco, onde foi verificada a presença dos ácidos de cadeia linear e alguns ácidos de cadeia insaturada. Note-se que na detecção oscilométrica existe a possibilidade de se operar com qualquer concentração de modificador orgânico, sem a preocupação do aumento da absorção de radiação pelo tampão como na detecção por UV-vis. Neste sistema de separação, a combinação de t- β -CD e d- β -CD desempenha papel fundamental na solubilidade e separação dos ácidos graxos.

Figura 5.9 – Eletroferograma de mistura padrão de ácidos graxos de cadeia linear. Condições: Tampão de corrida fosfato 5 mmol/L, d-β-CD 4 mmol/L, t-β-CD 2 mmol/L, acetonitrila 50 %, metanol 20 %; Potencial de separação 20 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 10 s; Frequência 600 kHz. Cada ácido na concentração de 0,5 mmol/L.

Figura 5.10 – Eletroferograma de amostra de gordura de coco. Condições: ver figura 5.9. Picos: (1) C18:0, (2) mistura de C18:1 e C16:0, (3) C18:2, (4) C14:0, (5) C12:0, (6) C10:0 e (7) C08:0.

A tabela 5.4 traz os LOD obtidos na análise de ácidos graxos.

Tabela 5.4 – LOD obtidos para o sistema de separação de ácidos graxos

Ácido Graxo	LOD / $\mu\text{mol/L}$
C8	318
C9	127
C10	112
C11	84
C12	69
C14	54
C16	42
C18	37
C20	35

5.6 Análise de Formaldeído

O formaldeído está presente em muitas reações na atmosfera, tanto na fase aquosa como na gasosa. Como espécie muito reativa, sofre facilmente fotólise, e na presença de O_2 pode gerar radicais livres que dão continuidade às reações fotoquímicas. O formaldeído é considerado uma das espécies responsáveis pelo aumento da acidez atmosférica. Além disso, o formaldeído tem sido recentemente classificado como potencial agente carcinogênico.

O monitoramento do formaldeído é normalmente realizado por métodos ópticos, a partir da reação com dinitrofenilidrazina (DNPH). A coleta do material é comumente a etapa crítica do processo e, deste modo, determinante do tempo total de análise e do limite de determinação.

Um novo tipo de amostrador para formaldeído foi desenvolvido neste laboratório. Ele é baseado em um conjunto de quatorze capilares porosos de

polipropileno (Oxyphan, Akzo-Nobel) colocados no interior de um tubo de PTFE que serviu como suporte. Por dentro do tubo suporte é passado o ar a ser amostrado enquanto que o interior dos capilares é preenchido com água deionizada (18 MΩ). Uma vez que a constante de Henry para o formaldeído é bastante alta, é possível a sua pré-concentração em água. Após o recolhimento, o formaldeído é convertido a hidroximetanosulfonato (HMS) a partir da reação com excesso de bissulfito:

O bissulfito excedente foi convertido à sulfato pela oxidação com peróxido de hidrogênio. O HMS formado é espécie iônica bastante estável na faixa de pH utilizada, e, portanto propícia à análise por CE [110].

A figura 5.11 mostra dois eletroferogramas obtidos para uma amostra coletada. Na figura 5.11b foi adicionado à amostra 50 μmol/L de HMS para identificação do pico.

O limite de detecção foi estimado em 10 μmol/L, levando-se em consideração uma relação sinal-ruído igual a 3. Com base na vazão, no tempo de amostragem utilizados e no LOD conseguido para estas condições eletroforéticas, pode-se calcular que a concentração limite de detecção é de 0,1 nmol/L de formaldeído na atmosfera. Testes simulados com atmosfera padrão de formaldeído, gerada a partir da decomposição controlada de paraformaldeído, revelaram recuperação cima de 90 %.

Figura 5.11 – Determinação de formaldeído na fase gasosa da atmosfera após tratamento com 1,5 mmol/L de HSO_3^- e 1,5 mmol/L de H_2O_2 . (a) Amostra e (b) amostra adicionada de 50 $\mu\text{mol/L}$ de HMS. Condições: Tampão de corrida MES/His 8 mmol/L, CTAB 80 $\mu\text{mol/L}$; Potencial 25 kV; Injeção por gravidade a 10 cm por 40 s; Frequência 600 kHz.

5.7 Análise de Álcoois e Espécies Neutras por MEKC

A separação de substâncias neutras pode ser feita mediante a adição de surfactantes, acima da concentração micelar crítica (CMC), ao tampão de corrida (ver item 1.3). Normalmente metanol é utilizado como marcador do EOF (t_o), por não interagir com as micelas formadas. Dentre outras substâncias, sudam III é

utilizado para determinar o tempo de migração micelar (t_{mc}), por ficar completamente retido no interior das micelas.

Obviamente, espécies neutras não contribuem para o transporte de corrente, tanto no processo eletroforético, como no processo de detecção condutométrica. Mas pela variação na condutividade residual do tampão de corrida é possível monitorar espécies sem carga, se estas sofrerem separação por MEKC. Isto foi verificado por este grupo de pesquisa na separação de álcoois alifáticos [87]. Álcoois foram escolhidos para testar esta hipótese por (1) não possuírem carga e não sofrerem ionização em ampla faixa de pH, inclusive nas condições de trabalho escolhidas e (2) por serem espécies de baixa absorvidade, requerendo métodos indiretos de detecção por absorção no UV-vis.

A figura 5.12 apresenta um cromatograma eletrocinético da separação de alguns álcoois alifáticos. Observa-se nesta figura picos negativos, que foram identificados variando-se a concentração de cada álcool nos padrões injetados. A perturbação do sinal, entre 5,0 e 5,5 minutos, foi atribuída ao EOF. Obviamente, o formato negativo dos picos está associado à diminuição de condutividade que a zona adquire na presença do álcool. Por outro lado, o entendimento deste fenômeno não é tão direto. Três hipóteses podem explicar este comportamento: (1) há a diminuição na constante dielétrica do meio devido à presença dos álcoois, o que faz com que a admitância da cela também diminua, (2) os álcoois alteram a viscosidade e as características de solvatação dos íons do tampão de corrida e (3) o volume e mobilidade das micelas é alterado pela interação com os álcoois. Na verdade, o fenômeno observado pode ser a somatória destes fatores, mas, no momento, a contribuição de cada um deles é de difícil avaliação.

As simulações realizadas com alterações de C_s (ver item 4.7.2) sugerem que a primeira hipótese não é razoável, pois no presente caso as variações na constante dielétrica são sutis.

Há um aumento significativo na resposta pela adição de 10 % de metanol, como se pode notar na figura 5.13. Em primeira análise, a resposta deveria diminuir na presença de metanol, considerando-se que neste caso a fase aquosa

aproxima-se, comparativamente, dos analitos. Mas este fato reforça a idéia de que são as alterações na fase aquosa as responsáveis pela resposta observada.

Figura 5.12 – Cromatograma eletrocínético de alguns álcoois alifáticos separados utilizando-se tampão fosfato 50 mmol/L e SDS 50 mmol/L, pH 6,9. Condições: Potencial 15 kV; Capilar de sílica fundida de 50 μ m, 60 cm, com 50 cm até o detector; Freqüência 600 kHz; Picos: (1) 2-propanol, (2) 1-propanol, (3) 2-metil-2-propanol, (4) 2-butanol, (5) 2-metil-1-propanol, (6) 1-butanol, (7) 2-metil-2-butanol, (8) 3-metil-1-butanol e (9) 1-pentanol.

Figura 5.13 – Cromatograma eletrocinético de alguns álcoois alifáticos separados utilizando-se tampão fosfato 50 mmol/L, SDS 50 mmol/L e MeOH 10 %, pH 6,9. Outras condições: ver figura 5.12. Picos: (1) 2-propanol, (2) 1-propanol, (3) 2-metil-2-propanol, (4) 2-metil-1-propanol, (5) 1-butanol, (6) 1-pentanol e (7) 1-hexanol.

Com a adição de metanol, a redução da corrente que flui pelo capilar faz com haja uma ligeira melhoria no nível de ruído da linha base, mas que não justifica o aumento obtido no sinal. Com fator adicional, a relação entre a densidade e viscosidade do tampão sem metanol adicionado é menor do que aquela obtida para o tampão com metanol, cujos valores medidos são 1,02 e 0,82 g/(cP cm), respectivamente. Com isso, o volume de amostra injetada é ligeiramente inferior no caso do tampão com metanol, o que reforça o fato de que há um aumento na resposta.

Além disso, a diminuição do fator de resposta à medida que o tempo de retenção aumenta reforça a hipótese de que as variações de condutividade do

tampão são ditadas pela presença dos álcoois na fase aquosa do sistema de separação. Devido a esta característica, não foi possível a determinação do t_{mc} utilizando-se detecção oscilométrica, pois analitos plenamente retidos na micela apresentam fator de resposta igual a zero. Este fato sugere que a terceira hipótese não permite explicar o comportamento do sistema de detecção, pois, mesmo com a retenção de substâncias apolares, não há variação detectável na mobilidade das micelas. Assim, os resultados obtidos até o momento sugerem que a segunda hipótese seja a mais apropriada para explicar o fenômeno que permite a detecção de moléculas neutras.

Apesar dos LODs encontrados na análise de álcoois alifáticos serem maiores do que aqueles obtidos para detecção amperométrica, eles são comparáveis aos obtidos por detecção indireta por absorção no UV-vis ou fluorescência indireta [87], o que encoraja investigação deste tipo de detecção aplicada a MEKC.

6 - Conclusões

Do que foi exposto nos capítulos anteriores, fica evidente a possibilidade de aplicação da detecção condutométrica sem contato às técnicas de eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocinética. Apenas como informação complementar, mas que não coube no corpo da discussão dos capítulos anteriores, este tipo de detecção é passível de ser aplicado também à cromatografia de íons [111] e técnicas de injeção em fluxo.

Desde a sua concepção, tomou-se o cuidado de projetar o sistema de detecção e os equipamentos de CE de maneira a tornar a sua utilização simplificada. Parte da facilidade no seu uso decorre do fato de não haver qualquer tipo de modificação permanente no capilar, como abertura de janela para detecção UV-vis ou perfuração e adesão de eletrodos, o que garante a rapidez na montagem do sistema. Como vantagem adicional, o fato dos eletrodos estarem completamente desacoplados do campo elétrico de separação possibilita o posicionamento do detector em regiões próximas da extremidade de aplicação da alta tensão e a introdução de amostras na extremidade aterrada do capilar, o que foi demonstrado pela primeira vez e permite, por exemplo, o acoplamento de sistemas de análise por injeção em fluxo.

Ao contrário de outras técnicas analíticas, como por exemplo, a espectrometria de massas, é relativamente simples a implementação de equipamentos de CE, cujas características deixem pouco a desejar em comparação com os equipamentos comerciais. Neste trabalho foi efetuada, com razoável grau de automação, a construção de dois equipamentos de CE, relativamente mais simplificados do que aqueles comerciais, mas por outro lado de custo também reduzido.

Ficou demonstrada neste trabalho a utilização da detecção condutométrica sem contato de espécies iônicas e espécies passíveis de ionização através de reações químicas de derivatização. Estas são, no entanto, aplicações convencionais de detecção condutométrica. Por outro lado, a detecção de álcoois em MEKC representa uma contribuição original e é particularmente atraente como sistema genérico de detecção de espécies neutras e com baixa absorvidade molar.

Como perspectiva, a instrumentação construída e os estudos aqui iniciados, devem servir de base para o desenvolvimento de novos projetos nesta área, como por exemplo, o estudo sistemático do mecanismo de resposta em MEKC com este tipo de detecção, o desenvolvimento de detectores baseados em circuitos PLL (*phase locked loop*), o acoplamento de CE com técnicas de injeção em fluxo ou micro-sistemas de pré-concentração e detecção, além de inúmeras aplicações que podem se servir deste sistema de separação e detecção. Cabe acrescentar que estas não são apenas perspectivas futuras, pois várias destas idéias já estão em desenvolvimento em novos projetos de pesquisa.

A diversidade de aplicações e o bom LOD conseguido (comparável à detecção condutométrica convencional e por absorção indireta no UV-vis), justificam plenamente a sua utilização e encorajam investigações futuras.

Acredita-se, deste modo, que esta iniciativa venha a contribuir para as diversas áreas em que se baseia a instrumentação analítica moderna.

IV. Bibliografia

1. Li, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis – Principles, practice and applications*; J. Chromatography Library, vol. 52, Elsevier Science B. V., **1993**.
2. Hjérten, S. *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9*, 122-219.
3. Hjérten, S. *J. Chromatogr.* **1983**, *270*, 1-6.
4. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M. *J. Chromatogr.* **1979**, *169*, 1-10.
5. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1298-1302.
6. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Science* **1983**, *222*, 266-272.
7. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111-113.
8. Beale, S. C. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 279R-300R.
9. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. – *Electrochemical Methods*, John Wiley & Sons Inc., **1980**.
10. Kaniansky, D.; Masar, M.; Bielcikova, J. *J. Chromatogr.* **1997**, *792*, 483-494.
11. Yeung, K. K.; Lucy, C. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3435-3441.
12. Srinivasan, K.; Pohl, C.; Avdalovic, N. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2798-2805.
13. Kasicka, V.; Prusik, Z.; Sazelova, P.; Brynda, E.; Stejskal, J. *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 2484, 2492.
14. Tavares, M. F. M. *Quim. Nova* **1997**, *20*, 493-511.
15. Bocek, P.; Deml, M.; Gebauer, P.; Dolnik, V. *Analytical Isotachophoresis*, Electrophoresis Library, VCH, **1988**.
16. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 834-841.
17. Albin, M.; Grossman, P. D.; Moring, S. E. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 489A-497A.
18. Haber, C. – *Handbook of capillary electrophoresis*, capítulo 13, CRC Press, 2^a ed., editor J. P. Landers, **1997**.
19. Steen, C. van der; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M.; Poulis, J. A. *Anal. Chim. Acta* **1972**, *59*, 298-301.
20. Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M. *J. Chromatogr.* **1972**, *73*, 193-210.

21. Mulder, A. J.; Zuska, J. *J. Chromatogr.* **1974**, *91*, 819-822.
22. Deml, M.; Bocek, P.; Janak, J. *J. Chromatogr.* **1975**, *109*, 49-55.
23. Stankoviansky, S.; Cicmanec, P.; Kaniansky, D. *J. Chromatogr.* **1975**, *106*, 131-138.
24. Verheggen, Th. P. E. M.; Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M. *J. Chromatogr.* **1977**, *132*, 205-215.
25. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M. *J. Chromatogr.* **1979**, *169*, 11-20.
26. Deml, M.; Foret, F.; Bocek, P. *J. Chromatogr.* **1985**, *320*, 159-165.
27. Verheggen, Th. P. E. M.; Beckers, J. L.; Everaerts, F. M. *J. Chromatogr.* **1988**, *452*, 615-622.
28. Huang, X.; Pang, T. J.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2747-2749.
29. Huang, X.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *J. Chromatogr.* **1988**, *425*, 385-390.
30. Huang, X.; Luckey, J. A.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 766-770.
31. Huang, X.; Gordon, M. J.; Zare, R. N. *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 285-288.
32. Huang, X.; Zare, R. N.; Sloss, S.; Ewing, A. G. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 189-192.
33. Huang, X.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2193-2196.
34. Beckers, J. L.; Verheggen, Th. P. E. M.; Everaerts, F. M. *J. Chromatogr.* **1988**, *452*, 591-600.
35. Ackermans, M. T.; Everaerts, F. M.; Beckers, J. L. *J. Chromatogr.* **1991**, *549*, 345-355.
36. Dasgupta, P. K.; Bao, L. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1003-1011.
37. Avdalovic, N.; Pohl, C. A.; Rocklin, R. D.; Stillian, J. R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1470-1475.
38. Harrold, M.; Stillian, J.; Bao, L.; Rocklin, R.; Avdalovic, N. *J. Chromatogr.* **1995**, *717*, 371-383.
39. Dasgupta, P. K.; Kar, S. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3853-3860.
40. Haber, C.; Jones, W. R.; Soglia, J.; Surve, M. A.; McGlynn, M.; Caplan, A.; Reineck, J. R.; Krstanovic, C. *J. Capillary Electrophor.* **1996**, *3*, 1-11.

41. Jones, W. R.; Soglia, J.; McGlynn, M.; Haber, C.; Reineck, J.; Krstanovic, C. *Am. Lab.* **1996**, *march*, 25-33.
42. Wanders, B. J.; Van de Goor, T. A. A. M.; Everaerts, F. M. *J. Chromatogr.* **1993**, *652*, 291-294.
43. Govindaraju, K.; Ahmed, A.; Lloyd, D. K. *J. Chromatogr.* **1997**, *768*, 3-8.
44. Fu, S.; Lucy, C. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 173-181.
45. Gebauer, P.; Caslavská, J.; Thormann, W.; Bocek, P. *J. Chromatogr.* **1997**, *772*, 63-71.
46. Schlegel, D.; Mattusch, J.; Wennrich, R. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1996**, *354*, 535-539.
47. Valsecchi, S.; Tartari, G.; Polesello, S. *J. Chromatogr.* **1997**, *760*, 326-332.
48. Kaniansky, D.; Zelenská, V.; Baluchová, D. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1890-1897.
49. Kaniansky, D.; Zelenský, I.; Hybenová, A.; Onuska, F. I. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4258-4264.
50. Rosso, T. E.; Bossle, P. C. *J. Chromatogr.* **1998**, *824*, 125-134.
51. Nassar, A. F.; Lucas, S. V.; Jones, W. R.; Hoffland, L. D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1085-1091.
52. Hissner, F.; Mattusch, J.; Heinig, K. *J. Chromatogr.* **1999**, *848*, 503-513.
53. Klampfl, C. W. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 987-990.
54. Klampfl, C.; Katzmayer, M. U. *J. Chromatogr.* **1998**, *822*, 117-123.
55. Klampfl, C.; Katzmayer, M. U.; Buchberger, W. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2459-2464.
56. Klampfl, C. W.; Katzmayer, M. U.; Buchberger, W. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, *22*, 297-299.
57. Klampfl, C. W. *J. Capillary Electrophor.* **1998**, *5*, 125-128.
58. Klampfl, C. W.; Katzmayer, M. U.; Buchberger, W.; Basener, N. *J. Chromatogr.* **1998**, *804*, 357-362.
59. Meissner, Th.; Eisenbeiss, F.; Jastorff, B. *J. Chromatogr.* **1998**, *829*, 351-357.
60. Govindaraju, K.; Cowley, E. A.; Eidelman, D. H.; Lloyd, D. K. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2793-2797.

61. Williams, R. C.; Boucher, R. J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, 22, 115-122.
62. Stocking, C. J.; Slater, J. M.; Unwin, R.; Walter, S.; Folkard, E. *Kidney International* **1999**, 56, 338-343.
63. Gallagher, P. A.; Oertel, C. M.; Danielson, N. D. *J. Chromatogr.* **1998**, 817, 31-39.
64. Gallagher, P. A.; Danielson, N. D. *J. Chromatogr.* **1997**, 781, 533-540.
65. Hibner, F.; Mattusch, J.; Heinig, K. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 365, 647-653.
66. Kaniansky, D.; Zelenský, I.; Hybenová, A.; Onuska, F. I. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4258-4264.
67. Haber, C.; VanSaun, R. J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2261-2267.
68. Kar, S.; Dasgupta, P. K.; Liu, H.; Hwang, H. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2537-2543.
69. Müller, D.; Jelínek, I.; Opekar, F.; Stulík, K. *Electroanalysis* **1996**, 8, 722-725.
70. Zhao, H.; Dadoo, R.; Reay, R. J.; Kovacs, G. T. A.; Zare, R. N. *J. Chromatogr.* **1998**, 813, 205-208.
71. Tuma, P.; Opekar, F.; Jenelík, I.; Stulík, K. *Electroanalysis* **1999**, 11, 1022-1026.
72. Vaireanu, D. I.; Fielden, P. R.; Brown, B. J. T. *Measurem. Sci. Tech.* **2000**, 11, 244-251.
73. Katzmayer, M. U.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W. *J. Chromatogr.* **1999**, 850, 355-362.
74. Lucy, C. A.; Wu, Q. *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, 36, 33-36.
75. Burkhalter, T. S. – *Comprehensive Analytical Chemistry, vol. II^A – Electrical Methods*, capítulo 5, Elsevier Science Publishing Company Inc., **1964**.
76. Klug, O.; Lopatin, B. A. – *Comprehensive Analytical Chemistry, vol. XXI – New Developments in Conductometric and Oscillometric Analysis*, Elsevier Publishing Company Inc., **1988**.
77. Pal, F.; Pungor, E.; Kovats, E. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2254-2258.
78. Alder, J. F.; Fielden, P. R.; Clark, A. J. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 985-988.
79. Gas, B.; Demjanenko, M.; Vacík, J. *J. Chromatogr.* **1980**, 192, 253-257.
80. Vacík, J.; Zuska, J.; Muselasová, I. *J. Chromatogr.* **1985**, 320, 233-240.
81. Zemmann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 563-567.

82. Fracassi da Silva, J. A.; Lago, C. L. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4339-4343.
83. Mayrhofer, K.; Zemmann, A. J.; Schnell, E.; Bonn, G. K. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3828-3833.
84. Kaniansky, D.; Zelenská, V.; Masár, M.; Iványi, F.; Gazdíkova, S. *J. Chromatogr.* **1999**, *844*, 349-359.
85. Masár, M.; Bodor, R.; Kaniansky, D. *J. Chromatogr.* **1999**, *834*, 179-188.
86. Mikus, P.; Kaniansky, D.; Sebesta, R.; Salisová, M. *Enantiomer* **1999**, *4*, 279-287.
87. Fracassi da Silva, J. A.; Lago, C. L. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1405-1408.
88. Steeman, J. *Elektor Eletrônica*, **1986**, *4*, 19-21.
89. Huang, X.; Gordon, M.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 375.
90. Rose, D. J. Jr.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 642-648.
91. Honda, S.; Iwase, S.; Fujiwara, S. *J. Chromatogr.* **1987**, *404*, 313-320.
92. Dyson, N. - *Chromatographic Integration Methods* – Royal Society of Chemistry, **1990**.
93. Baker, D. R. - *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., **1995**.
94. Braunstein, J.; Robbins, G. D. *J. Chem. Educ.* **1971**, *48*, 52-59.
95. Fracassi da Silva, J. A.; Barros, M. F.; Lago, C. L. *Instrum. Sci. Tech.* **1998**, *26*, 409-420.
96. *Linear products – IC Data Book*, Burr-Brown Corporation, **1996**.
97. *National Operational Amplifiers Databook*, National Semiconductors Corporation, **1995**.
98. Edminister, J. A. – *Circuitos Elétricos* – McGraw-Hill do Brasil, **1971**.
99. Fracassi da Silva, J. A.; Lago, C. L. - *Development of an electrodeless conductometric detector for capillary electrophoresis*, 3rd Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis, **1997**, Buenos Aires, Argentina.
100. Kappes, T.; Hauser, P. C. *J. Chromatogr.* **1999**, *834*, 89-101.
101. Polesello, S.; Valsecchi, S. M. *J. Chromatogr.* **1999**, *834*, 103-116.
102. Fritz, J. S. *J. Chromatogr.* **2000**, *884*, 261-275.
103. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 70th ed., CRC Press Inc., 1989

104. Ferguson, W. J.; Good, N. E. *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 300.
105. Deng, Y. *Water Res.* **1998**, *32*, 2249-2256.
106. Fung, Y-S., Lau, K-M. *Talanta* **1998**, *45*, 641-656.
107. Bächmann, K., Tenberken, B., Ebert, P., Hartmann, M., Kibler, M., Mainka, A., Prokop, T., Röder, A. *J. Chromatog.* **1996**, *745*, 209-215.
108. Bächmann, K., Mainka, A., Ebert, P., Kibler, M., Prokop, T., Tenberken, B. *Chromatographia* **1997**, *45*, 158-162.
109. Collet J. Gareil P. *J. Capillary Electrophor.* **1996**, *3*, 77-82.
110. Pereira, E. A; Cardoso, A. A; Tavares, M. F. M. *J. AOAC International*, **1999**, *82*, 1562-1570.
111. Fracassi da Silva, J. A.; Rocha, R. T.; Lago, C. L. - “*Detecção condutométrica sem contato aplicada à cromatografia de íons*”, 19^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **1996**, Poços de Caldas, MG.

V. Curriculum Vitae

1. Trabalhos Publicados

(1) “Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector”

José A. Fracassi da Silva, Claudimir L. do Lago

Electrophoresis **2000**, 21, 1405-1408.

(2) “An oscillometric detector for capillary electrophoresis”

José A. Fracassi da Silva, Claudimir L. do Lago

Anal. Chem. **1998**, 70, 4339-4343.

(3) “Development of a digital conductivity meter with frequency response for remote monitoring”

José A. Fracassi da Silva, Marcelo F. Barros, Claudimir L. do Lago

Instrum. Sci. Tech. **1998**, 26, 409-420.

2. Participações em Congressos

(1) “Capillary electrophoresis determination of formaldehyde in air employing a derivatization procedure, porous polypropylene capillaries, and oscillometric detection”

Flávio R. Rocha, José A. Fracassi da Silva, Ivano G. R. Gutz, Claudimir L. do Lago

6th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, **2000**, Punta del Este, Uruguay.

(2) “Determination of fatty acids by capillary electrophoresis with oscillometric detection”

Marcone A. L. Oliveira, José A. Fracassi da Silva, Marina F. M. Tavares, Claudimir L. do Lago.

6th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, **2000**, Punta del Este, Uruguay.

(3) “Separação de cátions metálicos dos grupos IA e IIA em presença de grande quantidade de sódio por eletroforese capilar com detecção oscilométrica”

José A. Fracassi da Silva, Fernando P. Christino, Claudimir L. do Lago

10^o Encontro Nacional de Química Analítica, **1999**, Santa Maria, RS.

(4) “Avaliação da composição iônica de chuvas da megalópole de São Paulo por eletroforese capilar com detecção oscilométrica”

Flávio R. Rocha, José A. Fracassi da Silva, Ivano G. R. Gutz, Claudimir L. do Lago
10º Encontro Nacional de Química Analítica, 1999, Santa Maria, RS.

(5) “Construção e avaliação de um sistema de injeção de amostras por gravidade para eletroforese capilar”

José A. Fracassi da Silva, Claudimir L. do Lago

22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1999, Poços de Caldas, MG.

(6) “Determination of ions derived from rainwater samples by capillary electrophoresis using oscillometric detection”

José A. Fracassi da Silva, Flávio R. Rocha, Ivano G. R. Gutz, Claudimir L. do Lago

4th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis, 1998, São Paulo, SP.

(7) “Development of an electrodeless conductometric detector for capillary electrophoresis”

José A. Fracassi da Silva, Claudimir L. do Lago

3rd Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis, 1997, Buenos Aires, Argentina.

(8) “Reconstituição de picos por interpolação polinomial após aplicação de filtro digital de mediana móvel”

José A. Fracassi da Silva, Claudimir L. do Lago

9º Encontro Nacional de Química Analítica, 1997, São Carlos, SP.

(9) “Detecção condutométrica sem contato aplicada à cromatografia de íons”

José A. Fracassi da Silva, Rogério T. Rocha, Claudimir L. do Lago

19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1996, Poços de Caldas, MG.

(10) “Determinação espectrofotométrica de cobre em aguardente utilizando dimetilglioxima e periodato”

José A. Fracassi da Silva, Leandro E. Batista, Robson P. de Almeida, Rogério T. Rocha

18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1995, Caxambu, MG.

(11) “Polarógrafo tast de baixo custo para uso didático com operação manual ou por computador”

José A. Fracassi da Silva, Ivano G. R. Gutz, Claudimir L. do Lago

18ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1995, Caxambu, MG.

VI. Apêndices

VI.I Software

Equipamento 1 - Turbo Pascal 5.0

```
Program EletroforeseCapilar_V9;
{- Ultima modificacao em 13/12/99      -}

Uses
  DOS, CRT, EC, Graficos;
Var
  Equip : CE;
  W1, W2, W3, W4, W5, W6, W7, W8 : Janela;
  Arq : Text;
  Nome : String;
  s,AuxNome : String[10];
  Cont : Integer;
  TempoMin, ATDouble, AtInj,TMaximo,ITelaMax,DetTelaMax,
  i, v, temp, h, FundoEscala, VDouble : Double ;
  v0, t : Word;
  tempo0 : LongInt;
  ModoInjecao : Char;
  Tecla,Tecla2 : Char;
  Polaridade, G, GCorrente : Byte;

Function GetTempo : LongInt;
var hora, minuto, segundo, seg100 : Word;
Begin
  GetTime(hora,minuto,segundo,seg100);
  GetTempo := LongInt(hora) * 360000 +           { 3600 * 100 }
              LongInt(minuto) * 6000 +          { 60 * 100 }
              LongInt(segundo) * 100 +
              LongInt(seg100) - tempo0;
End;

Procedure ZeraCronometro;
Begin
  tempo0 := GetTempo;
End;

BEGIN
  G := 3;
  GCorrente := 3;
  TMaximo := 20.0;
  ITelaMax := 20.0;
  DetTelaMax := 4095.0;
  Case G of
    0 : FundoEscala := 5.0;
    1 : FundoEscala := 2.5;
    2 : FundoEscala := 1.25;
    3 : FundoEscala := 0.625;
    4 : FundoEscala := 0.3125;
  end;
  Repeat
    ClrScr;
    TextColor(LightRed);
    WriteLn('*** Programa de Aquisicao de Dados Para Eletroforese Capilar ***');
    WriteLn;
    WriteLn('Escolha a Opcao : ');
    WriteLn;
    TextColor(10);Write('I');TextColor(LightRed);WriteLn('niciar Aquisicao');
    TextColor(10);Write('P');TextColor(LightRed);WriteLn('arametros');
    TextColor(10);Write('S');TextColor(LightRed);WriteLn('air');
    NormVideo;
    Tecla := UpCase(ReadKey);
    Case Tecla of
      'P' : Begin
        Repeat
          ClrScr;
          TextColor(LightRed);
          WriteLn('*** Parametros ***');
          WriteLn;WriteLn;
          TextColor(10);Write('G');TextColor(LightRed);WriteLn('anho',' {'',G,''}');
          TextColor(10);Write('T');TextColor(LightRed);WriteLn('empo de tela maximo','
{',TMaximo:2:0,'}');
          TextColor(10);Write('C');TextColor(LightRed);WriteLn('orrente maxima (tela)');
```



```

TextColor(10);Write('R');TextColor(LightRed);WriteLn('esposta maxima do detector');
TextColor(LightRed);Write('G');TextColor(10);Write('a');TextColor(LightRed);
WriteLn('nho de Corrente',' {' ,GCorrente,'}');
TextColor(10);Write('V');TextColor(LightRed);WriteLn('oltar');
Tecla2 := UpCase(ReadKey);
Case Tecla2 of
  'G' : Begin
    WriteLn('Entre com o valor do ganho (0 a 4)');
    ReadLn(G);
  End;
  'T' : Begin
    WriteLn('Entre com o valor do tempo de tela maximo');
    ReadLn(TMaximo);
  End;
  'C' : Begin
    WriteLn('Entre com o valor da corrente maxima (em microamperes)');
    ReadLn(ITelaMax);
  End;
  'R' : Begin
    WriteLn('Entre com o valor maximo de resposta do detector (4095 maximo)');
    ReadLn(DetTelaMax);
  End;
  'A' : Begin
    WriteLn('Entre com o valor do ganho de corrente (0 a 4)');
    ReadLn(GCorrente);
  End;
  'V' : ;
end;
Until Tecla2 = 'V';
NormVideo;
End;

'I' : Begin
tempo0 := 0;
{ -----Inicia Interface PCL----- }
Equip.Iniciar;
ClrScr;
{ -----Entrada de Dados-----}

Write('Nome do arquivo: ');
ReadLn(Nome);
AuxNome := Nome;
AuxNome := Concat(AuxNome, '.dat');
Nome := Concat('c:\BP\dados\', Nome, '.dat');
Assign(arq, Nome);
Rewrite(Arq);
WriteLn;
WriteLn('Alta Tensao aplicada ? (Maximo de 29.0 kV) : ');
ReadLn(ATDouble); WriteLn;
If AtDouble <> 0 Then
Begin
  WriteLn('Polaridade :');
  WriteLn('(0) - Negativa');
  WriteLn('(1) - Positiva');
  ReadLn(Polaridade);
  WriteLn;
End;
WriteLn('Escolha a opcao de injecao :');
WriteLn;
WriteLn('G - Gravidade');
WriteLn('E - Eletrocinetica');
WriteLn('N - Sem injecao');
Repeat
  ModoInjecao := Upcase(ReadKey);
  Case ModoInjecao of
    'G' : Begin
      WriteLn;
      Write('Tempo de Injecao ? (em segundos) : ');
      ReadLn(t);
      Write('Altura ? (em mm) : ');
      ReadLn(h);
      WriteLn('Tecle <ENTER> para iniciar a injecao');
      ReadLn;
      Equip.InGrav(h,t);
      Write(#7);
    end;
    'E' : Begin
      WriteLn;
      Write('Tempo de Injecao ? (em segundos) : ');
      ReadLn(t);
      Write('Alta tensao de injecao ? (em kV) : ');
      ReadLn(AtInj);
      WriteLn('Tecle <ENTER> para iniciar a injecao');
      ReadLn;
      Equip.InEletro2(AtInj, Polaridade, t);
      Write(#7);
    end;
    'N' : WriteLn;
  else Write(#7);
  end;
Until (ModoInjecao = 'G') or (ModoInjecao = 'E') or (ModoInjecao = 'N');

```

```

WriteLn('Tecle <ENTER> para iniciar aquisicao');
ReadLn;

{ -----Inicia Modo Grafico----- }
ModoGrafico;

Cor(10);
W1.Init(1, 1, 479, 256, 0.0, 0.0, TMaximo, 4095.0, 4);
W1.TextoXY(410,5,'Detector');
W2.Init(1, 276, 479, 478, 0, 0.0, TMaximo, 50.0, 4);
W2.TextoXY(410,5,'Corrente');
With W3 do
Begin
  Init(501, 1, 638, 478, 0.0, 0.0, 10.0, 10.0, 4);
  TextoXY(50, 5, 'Parametros');
  TextoXY(5, 50, 'i : '); TextoXY(100, 50, 'uA');
  TextoXY(5, 100, 'v : '); TextoXY(100, 100, 'kV');
  TextoXY(5, 150, 'T : '); TextoXY(100, 150, 'oC');
  TextoXY(5, 200, 't : '); TextoXY(100, 200, 'min');
  TextoXY(5, 250, 'Det:');
  TextoXY(5, 450, AuxNome);
  Case ModoInjecao of
    'N' : TextoXY(5,300,'Sem Injecao');
    'E' : Begin
      TextoXY(5,300,'Eletro');
      Str(t:2,s);
      TextoXY(5,315,s);TextoXY(50,315,'s');
      Str(ATInj:2:1,s);
      TextoXY(5,330,s);TextoXY(50,330,'kV');
    End;
    'G' : Begin
      TextoXY(5,300,'Gravidade');
      Str(t:2,s);
      TextoXY(5,315,s);TextoXY(50,315,'s');
      Str(h:4:1,s);
      TextoXY(5,330,s);TextoXY(50,330,'mm');
    End;
  End;
End;

Equip.SetAT2(ATDouble,Polaridade);
ZeraCronometro;

{----- Inicia Aquisicao de dados -----}

With Equip do
Repeat
  LeDetector(v0,G);
  TempoMin := 1.0*(GetTempo/(100*60));
  LeCorrente2(GCorrente,i);
  LeTemp(temp);
  LeAT2(v);
  VDouble := (2*v0*FundoEscala/4095)-FundoEscala;
  WriteLn(arq,TempoMin:6:4,' ',VDouble);

  With W1 do
  Begin
    Init(1, 1, 479, 256, 0.0, 0.0, TMaximo, DetTelaMax, 4);
    Ponto(TempoMin,v0,15);
    Done;
  End;

  With W2 do
  Begin
    Init(1, 276, 479, 478, 0.0, 0.0, TMaximo, ITelaMax, 4);
    If i < ITelaMax Then Ponto(TempoMin,i,15)
    Else Ponto(Tempomin,ITelaMax,15);
    Done;
  End;

  With W4 do
  Begin
    Init(536, 45, 590, 60, 0.0, 0.0, 1.0, 1.0, 4);
    LimpaJanela;
    Str(i:4:3,s);
    TextoXY(5,5,s);
  End;

  Cor(11);

  With W5 do
  Begin
    Init(536, 95, 590, 110, 0.0, 0.0, 1.0, 1.0, 4);
    LimpaJanela;
    Str(v:3:0,s);
    TextoXY(5,5,s);
  End;

  With W6 do
  Begin
    Init(536, 145, 590, 160, 0.0, 0.0, 1.0, 1.0, 4);
    LimpaJanela;

```

```

        Str(temp:4:1,s);
        TextoXY(5,5,s);
    End;

    With W7 do
    Begin
        Init(536, 195, 590, 210, 0.0, 0.0, 1.0, 1.0, 4);
        LimpaJanela;
        Str(TempoMin:4:2,s);
        TextoXY(5,5,s);
    End;

    With W8 do
    Begin
        Init(550, 245, 604, 260, 0.0, 0.0, 1.0, 1.0, 4);
        LimpaJanela;
        Str(V0,s);
        TextoXY(10,5,s);
    End;
    Until (TempoMin >= TMaximo) or KeyPressed;
    Close(arq);
    FinalizaModoGrafico;
    Equip.Finalizar;
end;
'S' : ;
end;
Until Tecla = 'S';
END.

```

Unit de controle do equipamento 1 – EC.pas

```

Unit EC;

Interface

Uses Dos, Crt, PCL;

Type CE = Object
    Cartao : PCL711;
    Constructor Iniciar;
    Destructor Finalizar;
    Procedure SetAT (Tensao : Double); { AT Glassman }
    Procedure SetAT2 (Tensao : Double ; Polaridade : Byte); { AT Bertan }
    Procedure LeCorrente(var i : Double); { AT Glassman }
    Procedure LeCorrente2(Ganho : Byte; var i : Double); { AT Bertan }
    Procedure LeAT(var v : Double); { AT Glassman }
    Procedure LeAT2 (var AT : Double); { AT Bertan }
    Procedure LeTemp(var t : Double);
    Procedure LeDetector(var det : Word; Ganho : Byte);
    Procedure RetornaCarro;
    Procedure ElevaCarro(h : Double);
    Procedure InGrav(h : Double; Tempo : Real);
    Procedure InEletro(AT : Double; Tempo : Real); { AT Glassman }
    Procedure InEletro2(AT : Double; Pol : Byte; Tempo : Real); { AT Bertan }
    {Private}
end;

Procedure Espera(TEspera : Real); { TEspera em segundos }

implementation

Constructor CE.Iniciar;
Begin
    Cartao.Init(0);
    Cartao.DigOut(0,'L');
End;

Destructor CE.Finalizar;
Begin
    Cartao.Done;
End;

Procedure CE.SetAT (Tensao : Double);
Begin
    If Tensao > 29.0 Then Tensao := 29.0;
    Cartao.DA(Round(Tensao*1000/7.164835165));
End;

Procedure CE.LeCorrente(var i : Double);
{ Com curva de calibracao em 18/04/98 }
{ Vx = 0.00015W-0.31049 }
{ levantada em G4 - i em microamperes }
Begin

```

```

    Cartao.SetCanal(3);
    Cartao.SetGanho(4);
    i := 0.012*Cartao.ADAvg(100) - 24.8392;
End;

Procedure CE.LeAT(var v : Double); { v em kV }
Begin
    Cartao.SetCanal(7);
    Cartao.SetGanho(0);
    v := 15.0*(Cartao.ADAvg(100)-2047.5)/684.0;
End;

Procedure CE.LeTemp(var t : Double); { t em oC }
{ Com curva de calibracao em 20/04/98 }
{ T = 0.0212*W - 39.382622 }

Begin
    Cartao.SetCanal(4);
    Cartao.SetGanho(0);
    t := 0.0212*Cartao.ADAvg(100) - 38;
End;

Procedure CE.LeDetector(var Det : Word; ganho : Byte);
Begin
    Cartao.SetCanal(0);
    Cartao.SetGanho(Ganho);
    Delay(1);
    Det := Cartao.ADAvg(5000);
End;

Procedure CE.RetornaCarro;
var
    regs : Registers;
Begin
    { WriteLn(Lst); }
    regs.ah:=5;
    regs.al:=0;
    regs.dl := 13;
    intr (33, regs);
End;

Procedure Mandar (c : char);
var
    regs : Registers;
begin
    regs.ah := 5;
    regs.dl := byte(c);
    intr (33,regs);
end;

Procedure CE.ElevaCarro(h : Double);
{-----}
{ - h : Altura em mm. - }
{ - Grafix MTA 80 colunas. Altura : 200 mm (maxima), 13 mm (minima) - }
{-----}

Var
    Lsb, Msb : Byte;
    i, n : Word;

Begin
    RetornaCarro;
    If h > 180.0 then h := 180.0;
    If h < (30.3/2.353) then h := 13.0;
    n := Round(h*2.355-30.3);
    Lsb := n Mod 256;
    Msb := n Div 256;
    mandar (#27);
    mandar ('K');
    mandar (Char(Lsb));
    mandar (Char(Msb));
    for i:=1 to n do mandar('0');
End;

Procedure CE.InGrav(h : Double; Tempo : Real);
{- h em mm, Tempo em s. -}

Begin
    ElevaCarro(h);
    Espera(Tempo);
    RetornaCarro;
End;

Procedure CE.InEletro(AT : Double; Tempo : Real);
{- AT em kV, Tempo em s. -}

Begin
    SetAT(AT);
    Espera(Tempo);
    SetAT(0);
End;

```

```

Procedure CE.SetAT2(Tensao : Double; Polaridade : Byte);
{- Procedure SetAT reescrito para operar com a fonte de AT Bertan. -}
{- AT : Potencial aplicado; Pol : Polaridade da fonte : 0 - Neg, 1 - Pos; -}
{- Acesso - Byte : MSB, Bit : D16 (D/O 15). -}

Begin
  With Cartao do
    Begin
      If Polaridade = 1 Then DigOut(255,'M')
      Else DigOut(0,'M');
      If Tensao > 29.0 Then Tensao := 29.0;
      DA(Round(2.67953 + 0.14512*Tensao*1000));
    end
  End;

Procedure CE.LeAT2(var AT : Double);
{- Procedure LeAT reescrito para operar com a fonte Bertan. -}

Begin
  Cartao.SetCanal(2);
  Cartao.SetGanho(0);
  AT := 30.0*(Cartao.ADAvg(100)-2047.5)/2047.5; { AT em kV }
End;

Procedure CE.LeCorrente2(Ganho : byte; var i : Double);
{- Procedure LeCorrente reescrito para operar com a fonte Bertan. -}

Begin
  Cartao.SetCanal(3);
  Cartao.SetGanho(Ganho);
  Case Ganho of
    0 : i := 0.19536*(Cartao.ADAvg(100) - 2047.5);
    1 : i := 0.09768*(Cartao.ADAvg(100) - 2047.5);
    2 : i := 0.04884*(Cartao.ADAvg(100) - 2047.5);
    3 : i := 0.02442*(Cartao.ADAvg(100) - 2047.5);
    4 : i := 0.01221*(Cartao.ADAvg(100) - 2047.5);
  end;
End;

Procedure CE.InEleetro2(AT : Double; Pol : Byte; Tempo : Real);
{- Procedure InEleetro reescrito para operar com a fonte de AT Bertan. -}
{- AT : Potencial aplicado; Pol : Polaridade da fonte : 0-Neg, 1-Pos; -}
{- Tempo em segundos. -}

Begin
  SetAT2(AT,Pol);
  Espera(Tempo);
  SetAT(0);
End;

Procedure Espera(TEspera : Real); { TEspera em segundos }
var
  t1, t2 : LongInt;
  Hours, Minutes, Seconds, HundredSeconds : Word;
  Dt : Real;

Begin
  TEspera := TEspera * 100;
  GetTime(Hours, Minutes, Seconds, HundredSeconds);
  t1 := LongInt(Hours) * 360000 + { 3600 * 100 }
      LongInt(Minutes) * 6000 + { 60 * 100 }
      LongInt(Seconds) * 100 +
      LongInt(HundredSeconds);
  Repeat
    GetTime(Hours, Minutes, Seconds, HundredSeconds);
    t2 := LongInt(Hours) * 360000 + { 3600 * 100 }
        LongInt(Minutes) * 6000 + { 60 * 100 }
        LongInt(Seconds) * 100 +
        LongInt(HundredSeconds);
    Dt := 1.0 * (t2 - t1);
  Until Dt >= TEspera;
End;

var
  regs : Registers;

Begin
  regs.dx := 0;
  regs.ah := 1;
  intr (23, regs);
End.

```

Unit de controle da interface gráfica – Gráficos.pas

```

Unit Graficos;

Interface

```

```

Uses Graph;

Type Janela = Object
  X1, X2, Y1, Y2 : Word;
  FatorX, FatorY,
  RX1, RX2, RY1, RY2 : Double;
  Constructor Init(TelaX1, TelaY1, TelaX2, TelaY2 : Word;
                  RealX1, RealY1, RealX2, RealY2 : Double;
                  cor : Byte);

  Destructor Done;
  Procedure SetRangeX(RealX1, RealX2 : Double);
  Procedure SetRangeY(RealY1, RealY2 : Double);
  Procedure Ponto(RealX, RealY : Double; Cor : Byte);
  Procedure Linha(RealX1, RealY1, RealX2, RealY2 : Double; Cor : Byte);
  Procedure LinhaPara(RealX, RealY : Double; Cor : Byte);
  Procedure MovePara(RealX, RealY : Double);
  Procedure SetCor(Cor : Byte);
  Procedure TextoXY(TelaX, TelaY : Word; s : String);
  Procedure TextoRealXY(RealX, RealY : Double; s : String);
  Procedure LimpaJanela;
  {Private}
End;
Procedure ModoGrafico;
Procedure FinalizaModoGrafico;
Procedure Cor(Cor : Word);

Implementation

Procedure ModoGrafico;
Var
  GD, GM : Integer;
Begin
  GD := Detect;
  InitGraph(GD, GM, 'c:\tp\');
  if GraphResult <> grOk then Halt(1);
End;

Procedure FinalizaModoGrafico;
Begin
  CloseGraph;
End;

Procedure Cor(Cor : Word);
Begin
  SetColor(Cor);
End;

Constructor Janela.Init(TelaX1, TelaY1, TelaX2, TelaY2 : Word;
                        RealX1, RealY1, RealX2, RealY2 : Double;
                        cor : Byte);

  -----
  -                               Constructor Init                               -
  -----
  -   Define um ViewPort com as coordenadas de tela de entrada, ajusta as   -
  -   coordenadas a um range X e Y definido por parametros de entrada e   -
  -   desenha uma moldura em torno da janela com cor definida pelo parametro -
  -   de entrada. Clip : ClipOn.                                           -
  -----
  -   Parametros - TelaX1, TelaX2 : X inicial e final, coordenadas de tela   -
  -                 TelaY1, TelaY2 : Y inicial e final,           ' ' ' '     -
  -                 RealX1, RealX2 : Range X                             -
  -                 RealY1, RealY2 : Range Y                             -
  -                 Cor : Cor da moldura da janela                       -
  -----

Var
  CorAntiga : Byte;

Begin
  CorAntiga := GetColor;

  X1 := TelaX1; X2 := TelaX2; Y1 := TelaY1; Y2 := TelaY2;
  RX1 := RealX1; RX2 := RealX2; RY1 := RealY1; RY2 := RealY2;
  FatorX := (X2-X1)/(RX2-RX1);
  FatorY := (0-(Y2-Y1)/(RY2-RY1));

  SetViewPort(0,0,GetMaxX,GetMaxY,ClipOn);
  SetColor(Cor);
  Rectangle(Pred(TelaX1), Pred(TelaY1), Succ(TelaX2), Succ(TelaY2));
  SetViewPort(TelaX1, TelaY1, TelaX2, TelaY2, ClipOn);
  SetColor(CorAntiga);

End;

Destructor Janela.Done;

  -----
  -                               Destructor Done                               -
  -----
  -   Direciona o ViewPort para a tela total. Clip : ClipOn.               -
  -----

```

```

Begin
    SetViewPort(0, 0, GetMaxX, GetMaxY, ClipOn);
End;

Procedure Janela.SetRangeX(RealX1, RealX2 : Double);
{-----}
-                               Procedure SetRangeX                               -
-                                                                                   -
-   Ajusta o Range X para as coordenadas de tela da janela.                       -
-                                                                                   -
-   Parametros - RealX1 e RealX2 : Double                                         -
{-----}

Begin
    RX1 := RealX1; RX2 := RealX2;
    FatorX := (X2-X1)/(RX2-RX1);
end;

Procedure Janela.SetRangeY(RealY1, RealY2 : Double);
{-----}
-                               Procedure SetRangeY                               -
-                                                                                   -
-   Ajusta o Range Y para as coordenadas de tela da janela.                       -
-                                                                                   -
-   Parametros - RealY1 e RealY2 : Double                                         -
{-----}

Begin
    RY1 := RealY1; RY2 := RealY2;
    FatorY := (0-(Y2-Y1))/(RY2-RY1);
End;

Procedure Janela.Ponto(RealX, RealY : Double; Cor : Byte);
Var
    Px, Py : Word;

Begin
    SetViewPort(X1, Y1, X2, Y2, ClipOn);
    Px := Round(FatorX*(RealX-RX1) + 0);
    Py := Round(FatorY*(RealY-RY1) + (Y2-Y1));
    PutPixel(Px,Py,Cor);
    MoveTo(Px,Py);
End;

Procedure Janela.Linha(RealX1, RealY1, RealX2, RealY2 : Double; Cor : Byte);
Var
    Px1,Py1,
    Px2,Py2 : Word;
Begin
    Px1 := Round(FatorX*(RealX1-RX1) + 0);
    Py1 := Round(FatorY*(RealY1-RY1) + (Y2-Y1));
    Px2 := Round(FatorX*(RealX2-RX1) + 0);
    Py2 := Round(FatorY*(RealY2-RY1) + (Y2-Y1));
    SetColor(Cor);
    Line(Px1,Py1,Px2,Py2);
    MoveTo(Px2,Py2);
End;

Procedure Janela.LinhaPara(RealX, RealY : Double; Cor : Byte);
Var
    Px, Py : Word;

Begin
    Px := Round(FatorX*(RealX-RX1) + 0);
    Py := Round(FatorY*(RealY-RY1) + (Y2-Y1));
    SetColor(Cor);
    LineTo(Px,Py);
End;

Procedure Janela.MovePara(RealX, RealY : Double);
Var
    Px, Py : Word;

Begin
    Px := Round(FatorX*(RealX-RX1) + 0);
    Py := Round(FatorY*(RealY-RY1) + (Y2-Y1));
    MoveTo(Px,Py);
End;

Procedure Janela.SetCor(Cor : Byte);
Begin
    SetColor(Cor);
End;

Procedure Janela.TextoXY(TelaX, TelaY : Word; s : String);

Begin
    OutTextXY(TelaX,TelaY,s);
End;

```

```

Procedure Janela.TextoRealXY(RealX, RealY : Double ; s : String);
Var
  Px, Py : Word;

Begin
  Px := Round(FatorX*(RealX-RX1) + 0);
  Py := Round(FatorY*(RealY-RY1) + (Y2-Y1));
  OutTextXY(Px,Py,s);
End;

Procedure Janela.LimpaJanela;
Begin
  SetViewPort(X1,Y1,X2,Y2,ClipOn);
  ClearViewPort;
End;

End.

```

Unit de controle da placa de interface PCL.pas

```

Unit PCL;

interface

Type
  PCL711 = Object
    base : Word;
    canal,
    ganho : Byte;
    constructor Init(endereco : Word);
    destructor Done;
    procedure DA(valor : Word);
    procedure SetGanho(g : Byte);
    procedure SetCanal(c : Byte);
    Function  GetGanho : Byte;
    Function  GetCanal : Byte;
    Function  AD : Word;
    Function  ADAvg(n : Word) : Word;
    Procedure DigOut(valor : Byte; xSB : Char);
    {Private}

    end;

implementation

Constructor PCL711.Init(endereco : Word);
Begin
  If endereco <> 0 then base := endereco else base := $220;
  SetGanho(0);
  SetCanal(0);
End;

Destructor PCL711.Done;
Begin
  DA(0);
  DigOut(0,'L');
  DigOut(0,'M');
End;

Procedure PCL711.DA(valor : Word);
Begin
  PortW[base + 4] := valor;
End;

Procedure PCL711.SetGanho(g : Byte);
Begin
  ganho := g;
  Port[base + 9] := ganho;
End;

Function PCL711.GetGanho : Byte;
Begin
  GetGanho := ganho;
End;

Procedure PCL711.SetCanal(c : Byte);
Begin

```



```

    canal := c;
    Port[base + 10] := canal;
End;

Function PCL711.GetCanal : Byte;
Begin
    GetCanal := canal;
End;

Function PCL711.AD : Word;
var lixo : Word;
Begin
    Port[base + 12] := 0;
    lixo := lixo + 0;
    While ((Port[base + 5] and $10) = $10) do;
        AD := PortW[base + 4] and $0FFF;
    End;

Function PCL711.ADAvg(n : Word) : Word;
var i : Word;
    soma : LongInt;
Begin
    soma := 0;
    For i := 1 to n do soma := soma + AD;
    ADAvg := soma div n;
End;

Procedure PCL711.DigOut(Valor : Byte; xSB : Char);
{-----}
{- Coloca um valor na saida digital. xSB se refere aos bytes LSB e MSB. -}
{- se xSB = L, o LSB sera atualizado, se xSB=M o MSB sera atualizado. -}
{-----}
Begin
    If (xSB = 'L')or(xSB = 'l') then Port[Base + 13] := Valor;    { LSB }
    If (xSB = 'M')or(xSB = 'm') then Port[Base + 14] := Valor;    { MSB }
End;

End.

```

Equipamento 2 – Delphi 5.0.

Projeto Interface.dpr

```

program Interfacel;

uses
    Forms,
    Main in 'Main.pas' {Principal},
    PCLDelphi2 in 'PCLDelphi2.pas',
    Parametros in 'Parametros.pas' {FormPar},
    Aquisicao in 'Aquisicao.pas' {FormAq},
    Sobre in 'Sobre.pas' {FormSobre},
    Metodo in 'Metodo.pas' {FormMet},
    CE2 in 'CE2.pas';

{$R *.RES}

begin
    Application.Initialize;
    Application.Title := 'Programa de aquisição de dados Gambi Inc.';
    Application.CreateForm(TPrincipal, Principal);
    Application.CreateForm(TFormPar, FormPar);
    Application.CreateForm(TFormAq, FormAq);
    Application.CreateForm(TFormSobre, FormSobre);
    Application.CreateForm(TFormMet, FormMet);
    Application.Run;
end.

```

Unit Principal – Main.pas

```

unit Main;

interface

```

```

uses
  Windows, Messages, SysUtils, Classes, Graphics, Controls,
  Forms, Dialogs, StdCtrls, ExtCtrls, Menus;

type
  TPrincipal = class(TForm)
    SaveDialog1: TSaveDialog;
    MainMenu1: TMainMenu;
    Arquivol: TMenuItem;
    Salvar1: TMenuItem;
    Sair1: TMenuItem;
    Aquisiol: TMenuItem;
    StartAq: TMenuItem;
    Parametros: TMenuItem;
    OpenDialog1: TOpenDialog;
    M1: TMenuItem;
    OpenMet: TMenuItem;
    SaveMet: TMenuItem;
    EditMet: TMenuItem;
    Help1: TMenuItem;
    About1: TMenuItem;
    Contents1: TMenuItem;
    Edit1: TEdit;
    procedure Salvar1Click(Sender: TObject);
    procedure StartAqClick(Sender: TObject);
    procedure ParametrosClick(Sender: TObject);
    procedure Sair1Click(Sender: TObject);
    procedure Sobre1Click(Sender: TObject);
    procedure About1Click(Sender: TObject);
    procedure EditMetClick(Sender: TObject);
    procedure FormClose(Sender: TObject; var Action: TCloseAction);

  private
    { Private declarations }
  public
    { Public declarations }
  end;

var
  Principal: TPrincipal;
  Arq : TextFile;
  Counter : Integer;
  x : Char;
  Aux : String;

implementation

uses Aquisicao, Parametros, Sobre, Metodo;
{$R *.DFM}

procedure TPrincipal.Salvar1Click(Sender: TObject);
begin
  With SaveDialog1 do
    Begin
      Filter := 'Dat Files | *.dat';
      InitialDir := 'C:\arq\alberto\dados\00\';
      Execute;
      AssignFile(Arq, FileName);
    end;
  Rewrite(Arq);
  If SaveDialog1.FileName <> '' then
    Begin
      If FormAq.FAMButton.Checked Then
        For Counter := 1 to (Indice-1) do
          WriteLn(Arq, DadosTempo[Counter], ' ', DadosDet[Counter])
        Else For Counter := 1 to (Indice-1) do
          WriteLn(Arq, DadosTempo[Counter]:5:4, ' ', DadosDet[Counter]);
        CloseFile(Arq);
      End;
    end;
end;

procedure TPrincipal.StartAqClick(Sender: TObject);
begin
  FormAq.Show;
end;

procedure TPrincipal.ParametrosClick(Sender: TObject);
begin
  FormPar.Show;
end;

procedure TPrincipal.Sair1Click(Sender: TObject);
begin
  Principal.Close;
end;

procedure TPrincipal.Sobre1Click(Sender: TObject);
begin
  FormSobre.Show;
end;

```

```

procedure TPrincipal.About1Click(Sender: TObject);
begin
    FormSobre.Show;
end;

procedure TPrincipal.EditMetClick(Sender: TObject);
begin
    FormMet.Show;
end;

procedure TPrincipal.FormClose(Sender: TObject; var Action: TCloseAction);
begin
    Equip.Done;
end;

end.

```

Unit de Controle da aquisição de dados – Aquisição.pas

```

unit Aquisicao;

interface

uses
    Windows, Messages, SysUtils, Classes, Graphics, Controls, Forms, Dialogs,
    StdCtrls, ExtCtrls, PCLDelphi2, CE2, TeEngine, Series, TeeProcs, Chart;

type
    DadosType = Array[1..10000] of Double;
    TFormAq = class(TForm)
        Inicia: TButton;
        Para: TButton;
        Volta: TButton;
        GroupBox1: TGroupBox;
        Label6: TLabel;
        MonitorTemp: TEdit;
        Label7: TLabel;
        Label8: TLabel;
        MonitorCur: TEdit;
        Label9: TLabel;
        Label10: TLabel;
        Monitort: TEdit;
        Label11: TLabel;
        Label12: TLabel;
        MonitorPot: TEdit;
        Label3: TLabel;
        Label4: TLabel;
        MonitorD: TEdit;
        Label5: TLabel;
        Label11: TLabel;
        FEMon1: TShape;
        FEMon2: TShape;
        Panel1: TPanel;

        FAMButton: TRadioButton;
        NAMButton: TRadioButton;
        Shape3: TShape;
        Label12: TLabel;
        DetWin: TChart;
        Series1: TLineSeries;
        CurWin: TChart;
        Series2: TFastLineSeries;
        FlushButton: TButton;
        procedure IniciaClick(Sender: TObject);
        procedure ParaClick(Sender: TObject);
        procedure VoltaClick(Sender: TObject);
        procedure FormCreate(Sender: TObject);
        procedure FlushButtonClick(Sender: TObject);
    private
        { Private declarations }
    public
        { Public declarations }
    end;

Procedure ZeraCronometro;
Function GetTempo : LongInt;

var
    FormAq: TFormAq;
    ParaAquisicao : Boolean;
    DadosDet, DadosTempo : DadosType;
    Dado : Word;
    Aux, MonitorAux : String;
    i, Indice : Integer;
    Serie : Byte;
    TempoZero, Tempo : LongInt;
    TempoMin, VMax, Temp, Curr : Double;
    TMaxTela : Real;

```

```

Equip : EC2;

implementation

{$R *.DFM}
uses Parametros;

Procedure ZeraCronometro;
Begin
    TempoZero := GetTempo;
End;

Function GetTempo : LongInt;
Var
    t : TSystemTime;
Begin
    GetLocalTime(t);
    GetTempo := LongInt(t.whour)*3600000 +
                LongInt(t.wminute)*60000 +
                LongInt(t.wsecond)*1000 +
                LongInt(t.wMilliseconds) - TempoZero;
End;

procedure TFormAq.FormCreate(Sender: TObject);
begin
    FEMon1.Visible := False;
    FEMon2.Visible := False;
    NAMButton.Checked := True;
    Shape3.Brush.Color := clLime;
    Labell12.Visible := False;
    Equip.Init(0);
end;

procedure TFormAq.IniciaClick(Sender: TObject);
begin
    //Inicializações
    Equip.AplicaPot(0);
    Series1.Clear;
    Series2.Clear;

    Case DetG of
        0 : VMax := 5.0;
        1 : VMax := 2.5;
        2 : VMax := 1.25;
        3 : VMax := 0.625;
        4 : VMax := 0.3125;
    end;
    Series1.AllowSinglePoint := True;
    TMaxTela := TMax;
    DetWin.LeftAxis.Maximum := VMax;
    DetWin.LeftAxis.Minimum := -VMax;
    DetWin.BottomAxis.Minimum := 0;
    DetWin.BottomAxis.Maximum := TMaxTela;
    CurWin.LeftAxis.Maximum := 5.0;
    CurWin.LeftAxis.Minimum := 0;
    CurWin.BottomAxis.Minimum := 0;
    CurWin.BottomAxis.Maximum := TMaxTela;
    ParaAquisicao := False;
    i := 1;
    Indice := 1;
    FEMon1.Visible := False;
    FEMon2.Visible := False;
    Shape3.Brush.Color := clRed;
    Labell12.Visible := True;
    // Fim das inicializações

    // Injeção
    If FormPar.RadioNone.Checked = False Then Equip.Injection;

    // Aquisição
    Equip.AplicaPot(PotSep);
    TempoZero := 0;
    ZeraCronometro;

    Repeat
        // Leituras
        Equip.LeDetector(DadosDet[Indice]);
        TempoMin := 1.0*(GetTempo/60000);
        DadosTempo[Indice] := TempoMin;
        Equip.LeTemp(Tempo);
        Equip.LeCorrente(Curr);
        If Curr < 0 Then Curr := -1.0*Curr;
        If not(FAMButton.Checked) then
            Begin
                // Monitores
                If DadosDet[Indice] >= Vmax Then FEMon1.Visible := true
                Else FEMon1.Visible := False;
                If DadosDet[Indice] <= -Vmax Then FEMon2.Visible := true
                Else FEMon2.Visible := False;
                MonitorTemp.Text := FloatToStrF(Tempo,ffFixed,4,2);
                MonitorCur.Text := FloatToStrF(Curr,ffFixed,4,2);
                Monitort.Text := FloatToStrF(TempoMin,ffFixed,4,2);
            End
        End
    Until False;
end;

```

```

MonitorD.Text := FloatToStrF(DadosDet[Indice],ffFixed,4,2);
MonitorPot.Text := FloatToStrF(PotSep,ffFixed,4,2);

// Gráficos

If TempoMin > TMaxTela Then
Begin
    TMaxTela := TMaxTela + TMax;
    DetWin.BottomAxis.Maximum := TMaxTela;
    CurWin.Bottomaxis.Maximum := TMaxTela;
end;
If CurWin.LeftAxis.Maximum <= Curr then CurWin.LeftAxis.Maximum := 1.2*Curr;
Series1.AddXY(TempoMin, DadosDet[Indice],',',clBlue);
Series2.AddXY(TempoMin, Curr,',',clBlue);
End;

Inc(i);
Inc(Indice);

Application.ProcessMessages;
Until (ParaAquisicao = True)or(Indice >=10000);
Shape3.Brush.Color := clLime;
Labell2.Visible := False;
end;

procedure TFormAq.ParaClick(Sender: TObject);
begin
    ParaAquisicao := True;
    Equip.AplicaPot(0);
end;

procedure TFormAq.VoltaClick(Sender: TObject);
begin
    //Equip.Done;
    FormAq.Hide;
end;

procedure TFormAq.FlushButtonClick(Sender: TObject);
begin
    Equip.Flush;
end;

end.

```

Unit de controle de acesso aos parâmetros – Parâmetros.pas

```

unit Parametros;

interface

uses
    Windows, Messages, SysUtils, Classes, Graphics, Controls, Forms, Dialogs,
    StdCtrls, ExtCtrls, Menus;

type
    TFormPar = class(TForm)
        GroupBox1: TGroupBox;
        Label8: TLabel;
        Label9: TLabel;
        Label10: TLabel;
        Label11: TLabel;
        Label12: TLabel;
        Label13: TLabel;
        Label14: TLabel;
        DetCan: TEdit;
        PotCan: TEdit;
        CurCan: TEdit;
        TempCan: TEdit;
        DetGain: TEdit;
        PotGain: TEdit;
        CurGain: TEdit;
        TempGain: TEdit;
        DetNum: TEdit;
        PotNum: TEdit;
        CurNum: TEdit;
        TempNum: TEdit;
        GroupBox2: TGroupBox;
        GroupBox3: TGroupBox;
        RadioEletro: TRadioButton;
        RadioHidro: TRadioButton;
        tInjEletro: TEdit;
        tInjHidr: TEdit;
        PotInj: TEdit;
        Label1: TLabel;
        Label2: TLabel;
        Label3: TLabel;
        Pinj: TEdit;
        Label4: TLabel;
        Label5: TLabel;
    end;

```

```

Label6: TLabel;
TMaximo: TEdit;
PotSeparacao: TEdit;
Label7: TLabel;
Label15: TLabel;
OK: TButton;
Button2: TButton;
RadioNone: TRadioButton;
ButtonSalvar: TButton;
ButtonAbrir: TButton;
RadioMethod: TRadioButton;
VialNum: TEdit;
Label16: TLabel;
procedure FormCreate(Sender: TObject);
procedure OKClick(Sender: TObject);
procedure ButtonSalvarClick(Sender: TObject);
procedure Button2Click(Sender: TObject);
procedure FormShow(Sender: TObject);
private
{ Private declarations }
public
{ Public declarations }
end;

var
FormPar: TFormPar;
ArqPar : TextFile;
Param : Array[1..19] of string;
DetC, DetG, PotC, PotG,
CurC, CurG, TempC, TempG : Byte;
DetN, PotN, CurN, TempN : Integer;
tIE,tIH,PIE,PIH,PotSep,TMax : Real;
Cont : Integer;
SaveControl : Boolean;
VialNumber : Byte;

implementation

{$R *.DFM}

procedure TFormPar.FormCreate(Sender: TObject);
begin
AssignFile(ArqPar, 'c:\arq\Alberto\Programas\Delphi2\ParamCE.txt');
Reset(ArqPar);
Cont := 1;
While Not EOF(ArqPar) do
Begin
ReadLn(ArqPar, Param[Cont]);
Inc(Cont);
End;
CloseFile(ArqPar);

DetC := StrToInt(Param[1]); DetCan.Text := Param[1];
DetG := StrToInt(Param[2]); DetGain.Text := Param[2];
DetN := StrToInt(Param[3]); DetNum.Text := Param[3];
PotC := StrToInt(Param[4]); PotCan.Text := Param[4];
PotG := StrToInt(Param[5]); PotGain.Text := Param[5];
PotN := StrToInt(Param[6]); PotNum.Text := Param[6];
CurC := StrToInt(Param[7]); CurCan.Text := Param[7];
CurG := StrToInt(Param[8]); CurGain.Text := Param[8];
CurN := StrToInt(Param[9]); CurNum.Text := Param[9];
TempC := StrToInt(Param[10]); TempCan.Text := Param[10];
TempG := StrToInt(Param[11]); TempGain.Text := Param[11];
TempN := StrToInt(Param[12]); TempNum.Text := Param[12];
tIE := 1.0*StrToFloat(Param[13]); tInjEletro.Text := Param[13];
PIE := 1.0*StrToFloat(Param[14]); PotInj.Text := Param[14];
tIH := 1.0*StrToFloat(Param[15]); tInjHidr.Text := Param[15];
PIH := 1.0*StrToFloat(Param[16]); PInj.Text := Param[16];
PotSep := 1.0*StrToFloat(Param[17]); PotSeparacao.Text := Param[17];
TMax := 1.0*StrToFloat(Param[18]); TMaximo.Text := Param[18];
VialNumber := StrToInt(Param[19]); VialNum.Text := Param[19];
RadioNone.Checked := True;
end;

procedure TFormPar.OKClick(Sender: TObject);
begin
Param[1] := DetCan.Text;
Param[2] := DetGain.Text;
Param[3] := DetNum.Text;
Param[4] := PotCan.Text;
Param[5] := PotGain.Text;
Param[6] := PotNum.Text;
Param[7] := CurCan.Text;
Param[8] := CurGain.Text;
Param[9] := CurNum.Text;
Param[10] := TempCan.Text;
Param[11] := TempGain.Text;
Param[12] := TempNum.Text;
Param[13] := tInjEletro.Text;
Param[14] := PotInj.Text;
Param[15] := tInjHidr.Text;
Param[16] := PInj.Text;

```

```

Param[17] :=PotSeparacao.Text;
Param[18] :=TMaximo.Text;
Param[19] := VialNum.Text;
DetC := StrToInt(Param[1]);
DetG := StrToInt(Param[2]);
DetN := StrToInt(Param[3]);
PotC := StrToInt(Param[4]);
PotG := StrToInt(Param[5]);
PotN := StrToInt(Param[6]);
CurC := StrToInt(Param[7]);
CurG := StrToInt(Param[8]);
CurN := StrToInt(Param[9]);
TempC := StrToInt(Param[10]);
TempG := StrToInt(Param[11]);
TempN := StrToInt(Param[12]);
tIE := 1.0*StrToFloat(Param[13]);
PIE := 1.0*StrToFloat(Param[14]);
tIH := 1.0*StrToFloat(Param[15]);
PIH := 1.0*StrToFloat(Param[16]);
PotSep := 1.0*StrToFloat(Param[17]);
TMax := 1.0*StrToFloat(Param[18]);
VialNumber := StrToInt(Param[19]);
If SaveControl then
begin
  AssignFile(ArqPar,'c:\arg\Alberto\Programas\Delphi2\ParamCE.txt');
  Rewrite(ArqPar);
  For Cont := 1 to 19 do WriteLn(ArqPar,Param[Cont]);
  CloseFile(ArqPar);
end;
FormPar.Hide;
end;

procedure TFormPar.ButtonSalvarClick(Sender: TObject);
begin
  SaveControl := True;
end;

procedure TFormPar.Button2Click(Sender: TObject);
begin
  FormPar.Hide;
end;

procedure TFormPar.FormShow(Sender: TObject);
begin
  SaveControl := False;
end;

end.

```

Unit de controle do equipamento 2 – CE2.pas

```

unit CE2;

interface

uses
  Windows, Messages, SysUtils, Classes, Graphics, Controls, Forms, Dialogs,
  StdCtrls, ExtCtrls, PCLDelphi2, Sample;

Type
  EC2 = Object
    Constructor Init(Endereco : Word);
    Destructor Done;
    Procedure Injection;
    Procedure LeTemp(var Temp : Double);
    Procedure LeCorrente(var Corr : Double);
    Procedure LeDetector(var Det : Double);
    Procedure AplicaPot(Pot : Double);
    Procedure PrInj(Tempo : Word);
    Procedure Flush;
  End;

implementation

Uses Parametros;

Var
  Card : PCL711;
  Samp : Sampler;
  Status : Byte;

Constructor EC2.Init(Endereco : Word);
Begin
  Card.Init(0);
  Samp := Sampler.Init(Status);
  VialNumber := 1;
End;

Destructor EC2.Done;
Begin

```

```

    Card.Done;
    Samp.Done;
End;

procedure EC2.Injection;
Begin
    // Setting the vial
    Samp.ChangeVial(VialNumber);
    Sleep(200);

    // Electrokinetic injection
    If FormPar.RadioEletro.Checked = True Then
    Begin
        AplicaPot(PIE);
        Sleep(Round(TIE*1000));
        AplicaPot(0);
        Card.Done;
    End;

    // Hydrodynamic injection
    If FormPar.RadioHidro.Checked = True Then
    Begin
        PrInj(Round(TIH*1000));
    End;
    Samp.ZeroPosition;
End;

Procedure EC2.LeTemp(var Temp : Double);
Begin
    Card.SetCanal(TempC);
    Card.SetGanho(TempG);
    Temp := 62.5*(Card.ADAvg(TempN)-2047.5)/2047.5;
End;

Procedure EC2.LeCorrente(var Corr : Double);
var
    V,FE : double;
Begin
    // R := 10000;

    Card.SetCanal(CurC);
    Card.SetGanho(CurG);

    Case CurG of
        0 : FE := 5.0;
        1 : FE := 2.5;
        2 : FE := 1.25;
        3 : FE := 0.625;
        4 : FE := 0.3125;
    end;

    V := (FE*(Card.ADAvg(CurN)-2047.5)/2047.5);
    Corr := -100*V;
    // Corr := -0.539 + 1.017*Corr;      // correção por calibração
End;

Procedure EC2.LeDetector(var Det : Double);
Var
    Max : Double;
Begin
    Card.SetGanho(DetG);
    Card.SetCanal(DetC);
    Case DetG of
        0 : Max := 5.0;
        1 : Max := 2.5;
        2 : Max := 1.25;
        3 : Max := 0.625;
        4 : Max := 0.3125;
    end;
    Det := (2.0/4095.0*Max*Card.ADAvg(DetN))- Max;  // 312.5/2047.5
End;

Procedure EC2.AplicaPot(Pot : Double);
Begin
    Card.DA(Round(Pot*81.9));
End;

Procedure EC2.PrInj(Tempo :Word);

Procedure Enable; Begin Card.SetBitM(1); Sleep(10) end;
Procedure Disable; Begin Card.ResetBitM(1); Sleep(10) end;
Procedure Vaccum; Begin Card.SetBitM(2); Sleep(10) end;
Procedure Relief; Begin Card.ResetBitM(2); Sleep(10) end;

Begin
    Disable;
    Relief;
    Sleep(10);
    Enable; Enable;
    Vaccum; Vaccum;
    Sleep(Tempo - 20);
    Relief; Relief;

```



```

    Sleep(1000);
    Disable; Disable;
End;

Procedure EC2.Flush;
Begin
    PrInj(2000);
End;

end.

```

Unit de Controle do Amostrador – Sample.pas

```

unit Sample;

interface

uses PCLDelphi2, Windows;

type
    Sampler = class
    constructor Init(var SamplerStatus : Byte);
    destructor Done;
    function ArmUp : Boolean;
    function MoveArmUp : Boolean;
    function MoveArmDown : Boolean;
    function ZeroSensor : Boolean;
    procedure Step(n : Integer);
    function ZeroPosition : Byte;
    function SetVial(n : Byte) : Byte;
    function ChangeVial (n : Byte) : Byte;
    private
        PulseIndex, Vial : Byte;
        Position : Integer;
        Pulse : Array[1..4] of Byte;
        Busy : Boolean;
    end;
    var
        Cartao : ^PCL711;
    const
        WaitArm = 1000;

implementation

    constructor Sampler.Init(var SamplerStatus : Byte);
    begin
        Busy := False;
        MoveArmUp;
        PulseIndex := 1;
        Pulse[1] := 3;
        Pulse[2] := 6;
        Pulse[3] := 12;
        Pulse[4] := 9;
        ZeroPosition;
    end;

    destructor Sampler.Done;
    begin
        ZeroPosition;
    end;

    function Sampler.ArmUp : Boolean; // true - up
    begin

        ArmUp := ((Cartao.DigInL)and($2)) = 2; // bit 1
    end;

    function Sampler.MoveArmUp : Boolean; // true if OK
    begin
        While Busy do Sleep(100);
        Busy := True;
        Cartao.SetBitM(0);
        Sleep(WaitArm);
        MoveArmUp := ArmUp;
        Busy := False;
    end;

    function Sampler.MoveArmDown : Boolean; // true if OK
    begin
        While Busy do Sleep(100);
        Busy := True;
        Cartao.ResetBitM(0);
        Sleep(WaitArm);
        MoveArmDown := ArmUp;
        Busy := False;
    end;

    function Sampler.ZeroSensor : Boolean;
    begin
        if ((Cartao.DigInL)and($1)) = 1 then ZeroSensor := True

```

```

        else ZeroSensor := False;
    end;

procedure Sampler.Step(n : Integer); // n > 0 , clockwise
var
    Counter : Integer;
begin
    For counter := 1 to Abs(n) do
        begin
            if n > 0 then Inc(PulseIndex)
            else Dec(PulseIndex);
            if PulseIndex > 4 then PulseIndex := 1;
            if PulseIndex < 1 then PulseIndex := 4;
            Cartao.DigOutL(Pulse[PulseIndex]);
            Sleep(40); // interval between pulses
        end;
        Position := Position + n;
        Cartao.DigOutL(0);
    end;

function Sampler.ZeroPosition : Byte;
var
    i : Integer;
    Error : Byte;
begin
    While Busy do Sleep(100);
    Error := 0;
    if not MoveArmUp then error := 1
    else
        begin
            Sleep(200);
            i := 0;
            repeat
                Inc(i);
                Step(1);
            until ZeroSensor or (i = 60);
            if i = 60 then error := 2;
        end;
    if Error = 0 then
        begin
            Vial := 1;
            Position := 0;
            if not MoveArmDown then Error := 1;
        end;
    ZeroPosition := Error;
end;

function Sampler.SetVial(n : Byte) : Byte;
var
    Error : Byte;
begin
    While Busy do Sleep(100);
    Error := 0;
    if n < Vial then
        begin
            Error := ZeroPosition;
            if error = 0 then SetVial(n);
        end;
    if Error = 0 then
        if not MoveArmUp then Error := 1
        else
            begin
                Sleep(200);
                Step((n-Vial)*6);
                Vial := n;
            end;
        SetVial := Error;
    end;

function Sampler.ChangeVial(n : Byte) : Byte;
var
    Error : Byte;
begin
    While Busy do Sleep(100);
    Error := SetVial(n);
    Sleep(200);
    if Error = 0 then MoveArmDown;
    ChangeVial := Error;
end;

begin
    New(Cartao, Init(0));
end.

```

Unit de controle da placa de interface – PCLDelphi2.pas

Unit PCLDelphi2;

```

interface
Uses IO;

Type
PCL711 = Object
  constructor Init(endereco : Word);
  destructor Done;
  procedure DA(valor : Word);
  procedure SetGanho(g : Byte);
  procedure SetCanal(c : Byte);
  Function  GetGanho : Byte;
  Function  GetCanal : Byte;
  Function  AD : Word;
  Function  ADAvg(n : Word) : Word;
  Procedure DigOutL(valor : Byte);
  Procedure DigOutM(valor : Byte);
  Function  DigInL : Byte;
  Function  DigInM : Byte;
  Procedure SetBitL(Bit : Byte);
  Procedure SetBitM(Bit : Byte);
  Procedure ResetBitL(Bit : Byte);
  Procedure ResetBitM(Bit : Byte);
Private
  base : Word;
  canal,
  ganho, LByte, MByte : Byte;
end;

implementation

Constructor PCL711.Init(endereco : Word);
Begin
  If endereco <> 0 then base := endereco else base := $220;
  SetGanho(0);
  SetCanal(0);
  DigOutL(0);
  DigOutM(0);
  //MByte := 0;
  //LByte := 0;
End;

Destructor PCL711.Done;
Begin
  DA(0);
  DigOutL(0);
  DigOutM(0);
End;

Procedure PCL711.DA(valor : Word);
Begin
  PortWOut(base + 4, valor);
End;

Procedure PCL711.SetGanho(g : Byte);
Begin
  ganho := g;
  PortOut(base + 9, ganho);
End;

Function PCL711.GetGanho : Byte;
Begin
  GetGanho := ganho;
End;

Procedure PCL711.SetCanal(c : Byte);
Begin
  canal := c;
  PortOut(base + 10, canal);
End;

Function PCL711.GetCanal : Byte;
Begin
  GetCanal := canal;
End;

Function PCL711.AD : Word;
var lixo : Word;
Begin
  PortOut(base + 12, 0);
  lixo := lixo + 0;
  While ((PortIn(base + 5) and $10) = $10) do lixo := lixo + 0;
  lixo := lixo + 0;
  AD := PortWIn(base + 4) and $0FFF;
End;

Function PCL711.ADAvg(n : Word) : Word;
var
  i, a, b, c, m, sw : Word;
  soma : LongInt;
Begin
  soma := 0;

```

```

For i := 1 to n do
begin
  a := AD;
  b := AD;
  c := AD;
  If (a > b) Then
  Begin
    sw := a;
    a := b;
    b := sw;
  end;
  If (b > c) Then
  If (c > a) Then m := c
  else m := a
  else m := b;

  soma := soma + m;
end;
ADAvg := soma div n;
End;

Procedure PCL711.DigOutL(Valor : Byte);
{- Coloca um valor na saida digital no byte menos significativo. -}

Begin
  PortOut(Base + 13, valor);    { LSB }
  LByte := Valor;
End;

Procedure PCL711.DigOutM(Valor : Byte);
{- Coloca um valor na saida digital no byte mais significativo. -}

Begin
  PortOut(Base + 14, valor);    { MSB }
  MByte := Valor;
End;

Function PCL711.DigInL : Byte;
{- Lê um valor na entrada digital no byte menos significativo. -}

Begin
  DigInL := PortIn(Base + 6);  { LSB }
End;

Function PCL711.DigInM : Byte;
{- Lê um valor na entrada digital no byte mais significativo. -}

Begin
  DigInM := PortIn(Base + 6);  { MSB }
End;

Procedure PCL711.SetBitL (Bit : Byte);
Begin
  DigOutL((1 shl bit) OR LByte);
End;

Procedure PCL711.SetBitM (Bit : Byte);
Begin
  DigOutM((1 shl bit) OR MByte);
End;

Procedure PCL711.ResetBitL (Bit : Byte);
Begin
  DigOutL((Not(1 shl bit)) AND LByte);
End;

Procedure PCL711.ResetBitM (Bit : Byte);
Begin
  DigOutM((Not(1 shl bit)) AND MByte);
End;

End.

```

Unit de acesso ao hardware – IO.pas

```

unit IO;

interface

Procedure PortWOut (IOAddr, Data : Word);
Procedure PortOut (IOAddr : Word ; Data : Byte);
Function PortWin (IOAddr : Word) : Word;
Function PortIn (IOAddr : Word) : Byte;

implementation

Procedure PortWOut (IOAddr, Data : Word);
Begin

```

```

    asm
      mov dx,IOAddr
      mov ax,Data
      out dx,ax
    end;
End;

Procedure PortOut (IOAddr : Word ; Data : Byte);
Begin
  asm
    mov dx,IOAddr
    mov al,Data
    out dx,al
  end;
End;

Function PortWIn (IOAddr : Word) : Word;
Begin
  asm
    mov dx,IOAddr
    in ax,dx
    mov result,ax
  end;
  PortWIn := result;
End;

Function PortIn (IOAddr : Word) : Byte;
Begin
  asm
    mov dx,IOAddr
    in al,dx
    mov result,al
  end;
  PortIn := result;
End;

end.

```

VI.II Planilhas de Simulação

$\epsilon_0 := 8.85419 \cdot 10^{-12}$	Permissividade do vácuo / J-1 C ² m-1
$\epsilon := 3.7$	Permissividade relativa da sílica, até 1 MHz, a 20 °C
$\epsilon_a := 78.54$	Permissividade relativa da água
$r_i := 37.5 \cdot 10^{-6}$	Raio interno do capilar / m
$r_e := 180 \cdot 10^{-6}$	Raio externo do capilar
$L := 2.0 \cdot 10^{-3}$	Comprimento do eletrodo
$d := 1.0 \cdot 10^{-3}$	Distancia entre as placas (Gap)

Cálculo do valor do capacitor cilíndrico, formado na parede do capilar:

$$C_w := 2 \cdot \pi \cdot \epsilon \cdot \epsilon_0 \cdot \frac{L}{\ln\left(\frac{r_e}{r_i}\right)} \quad C_w = 2.624 \times 10^{-13} \quad \frac{C_w}{2} = 1.312 \times 10^{-13} \quad \text{capacitância total referente aos dois eletrodos}$$

Cálculo do capacitor formado na solução

$$A_p := \pi \cdot r_i^2 \quad \text{Área da placa} \quad A_p = 4.418 \times 10^{-9}$$

$$C_s := \epsilon_0 \cdot \epsilon_a \cdot \frac{A_p}{d} \quad C_s = 3.072 \times 10^{-15}$$

Cálculo do valor da resistência da solução entre os eletrodos:

$$\lambda := d \cdot 100 \quad \text{Gap entre os eletrodos em cm}$$

$$r := r_i \cdot 100 \quad \text{Raio do capilar em cm}$$

$$A := \pi \cdot r^2$$

$$A = 4.418 \times 10^{-5}$$

$$k := 11.2 \cdot 10^{-3} \text{ (S/cm)} \quad \text{Para uma solução de KCl 100 mM, a condutividade medida é de:}$$

$$\rho := \frac{1}{k} \quad R := \rho \cdot \frac{\lambda}{A} \quad R = 2.021 \times 10^5 \quad \frac{\lambda}{A} = 2.264 \times 10^3$$

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

Basic Formulas: $Z_s(z_1, z_2) := z_1 + z_2$ $Z_C(C, f) := \frac{-i}{2 \cdot \pi \cdot f \cdot C}$ $Z_p(z_1, z_2) := \frac{z_1 \cdot z_2}{z_1 + z_2}$

Equivalent Circuit

C0 - leakage capacitance
 Rf - leakage resistance (trough surface and bulk silica capillary)
 Rs - solution resistance
 Cs - solution capacitance
 Cw - silica wall capacitance (electrode region)

Total Impedance:

$$Zc(C0,Cw,Cs,Rs,f) := \begin{cases} s \leftarrow Zp(Rs,ZC(Cs,f)) \\ s \leftarrow ZC(Cw,f) + s \\ s \leftarrow Zp(ZC(C0,f),s) \\ s \end{cases}$$

Total Admittance Modulus:

$$mc(C0,Cw,Cs,k,cell,f) := \begin{cases} s \leftarrow Zp\left(\frac{cell}{k},ZC(Cs,f)\right) \\ s \leftarrow ZC(Cw,f) + s \\ s \leftarrow Zp(ZC(C0,f),s) \\ \left| \frac{1}{s} \right| \end{cases}$$

Sensitivity of the admittance as a function of the conductivity of the solution:

$$dmc(C0,Cw,Cs,k,cell,f) := \frac{d}{dk}mc(C0,Cw,Cs,k,cell,f)$$

where:

cell - constant of the cell

k - conductivity of the solution

f - frequency of operation

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

residual capacitance

Formulas

➤ Reference: C:\Pessoal\Alberto\Tese\simucell.mcd(R)

Fixed values considered in the calculation

base value for C_0 :	$C_{0b} := 1.0 \cdot 10^{-12}$
base value for C_w :	$C_{wb} := 0.13 \cdot 10^{-12}$
base value for C_s :	$C_{sb} := 0.003 \cdot 10^{-12}$
basic operational frequency:	$f_b := 550 \cdot 10^3$
number of solution conductivity points to be evaluated:	$n := 100 \quad j := 0 \dots n$
number of different values of the part under consideration minus one:	$nc := 2 \quad x := 0 \dots nc$
minimum value of conductivity:	$k_{min} := 1 \cdot 10^{-6}$
maximum value of conductivity:	$k_{max} := 2 \cdot 10^{-3}$
cell constant:	$cell := 2.264 \cdot 10^3$

Components

$$C_0 := C_{0b} \quad C_w := C_{wb} \quad C_s := C_{sb} \quad f := f_b$$

Part under consideration:

$C_{0_0} := \frac{C_{0b}}{2}$	$C_{0_0} = 5 \times 10^{-13}$
$C_{0_1} := C_{0b}$	$C_{0_1} = 1 \times 10^{-12}$
$C_{0_2} := 2 \cdot C_{0b}$	$C_{0_2} = 2 \times 10^{-12}$

Conductivity and resistance ranges:

$$k_j := k_{\min} + \frac{(j+1)}{n} \cdot k_{\max}$$

$$R := \frac{\text{cell}}{k}$$

Impedance, admittance, and modulus:

$$Z_{j,x} := Z_c(CO_x, Cw, Cs, R_j, f)$$

$$Y^{(x)} := \frac{1}{Z^{(x)}}$$

$$m^{(x)} := \overrightarrow{|Y^{(x)}|}$$

Sensitivity:

$$\text{sens}_{j,x} := \text{dmc}(CO_x, Cw, Cs, k_j, \text{cell}, f)$$

Sensitivity

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

solution capacitance

Formulas

➤ **Reference:** C:\Pessoal\Alberto\Tese\simucell.mcd(R)

Fixed values considered in the calculation

base value for C_0 :	$C_{0b} := 1.0 \cdot 10^{-12}$
base value for C_w :	$C_{wb} := 0.13 \cdot 10^{-12}$
base value for C_s :	$C_{sb} := 0.003 \cdot 10^{-12}$
basic operational frequency:	$f_b := 550 \cdot 10^3$
number of solution conductivity points to be evaluated:	$n := 100 \quad j := 0 \dots n$
number of different values of the part under consideration:	$nc := 2 \quad x := 0 \dots nc$
minimum value of conductivity:	$k_{min} := 1 \cdot 10^{-6}$
maximum value of conductivity:	$k_{max} := 2 \cdot 10^{-3}$
cell constant:	$cell := 2.264 \cdot 10^3$

Components

$$C_0 := C_{0b} \quad C_w := C_{wb} \quad C_s := C_{sb} \quad f := f_b$$

Part under consideration:

$$C_{s_0} := \frac{C_{sb}}{10} \quad C_{s_0} = 3 \times 10^{-16}$$

$$C_{s_1} := \frac{C_{sb}}{2} \quad C_{s_1} = 1.5 \times 10^{-15}$$

$$C_{s_2} := 1 \cdot C_{sb} \quad C_{s_2} = 3 \times 10^{-15}$$

Conductivity and resistance ranges:

$$k_j := k_{\min} + \frac{(j+1)}{n} \cdot k_{\max}$$

$$R := \frac{\text{cell}}{k}$$

Impedance, admittance, and modulus:

$$Z_{j,x} := Z_c(C0, Cw, Cs_x, R_j, f)$$

$$Y^{(x)} := \frac{1}{Z^{(x)}}$$

$$m^{(x)} := \left| \overrightarrow{Y^{(x)}} \right|$$

Sensitivity:

$$\text{sens}_{j,x} := \text{dmc}(C0, Cw, Cs_x, k_j, \text{cell}, f)$$

Sensitivity

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

wall capacitance - electrode size

Formulas

➤ Reference: C:\Pessoal\Alberto\Tese\simucell.mcd(R)

Fixed values considered in the calculation

base value for C_0 :	$C_{0b} := 1.0 \cdot 10^{-12}$
base value for C_w :	$C_{wb} := 0.13 \cdot 10^{-12}$
base value for C_s :	$C_{sb} := 0.003 \cdot 10^{-12}$
basic operational frequency:	$f_b := 550 \cdot 10^3$
number of solution conductivity points to be evaluated:	$n := 100 \quad j := 0 \dots n$
number of different values of the part under consideration:	$nc := 2 \quad x := 0 \dots nc$
minimum value of conductivity:	$k_{min} := 1 \cdot 10^{-6}$
maximum value of conductivity:	$k_{max} := 2 \cdot 10^{-3}$
cell constant:	$cell := 2.264 \cdot 10^3$

Components

$$C_0 := C_{0b} \quad C_w := C_{wb} \quad C_s := C_{sb} \quad f := f_b$$

Part under consideration:

$C_{w_0} := \frac{C_{wb}}{2}$	$C_{w_0} = 6.5 \times 10^{-14}$
$C_{w_1} := C_{wb}$	$C_{w_1} = 1.3 \times 10^{-13}$
$C_{w_2} := 2 \cdot C_{wb}$	$C_{w_2} = 2.6 \times 10^{-13}$

Conductivity and resistance ranges:

$$k_j := k_{\min} + \frac{(j+1)}{n} \cdot k_{\max}$$

$$R := \frac{\text{cell}}{k}$$

Impedance, admittance, and modulus:

$$Z_{j,x} := Z_c(C0, Cw_x, Cs, R_j, f)$$

$$Y^{(x)} := \frac{1}{Z^{(x)}}$$

$$m^{(x)} := \left| \overrightarrow{Y^{(x)}} \right|$$

Sensitivity:

$$\text{sens}_{j,x} := \text{dmc}(C0, Cw_x, Cs, k_j, \text{cell}, f)$$

Sensitivity

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

operational frequency

Formulas

Reference: C:\Pessoal\Alberto\Tese\simucell.mcd(R)

Fixed values considered in the calculation

base value for C_0 :	$C_0b := 1.0 \cdot 10^{-12}$
base value for C_w :	$Cwb := 0.13 \cdot 10^{-12}$
base value for C_s :	$Csb := 0.003 \cdot 10^{-12}$
basic operational frequency:	$fb := 550 \cdot 10^3$
number of solution conductivity points to be evaluated:	$n := 100 \quad j := 0 .. n$
number of different values of the part under consideration:	$nc := 2 \quad x := 0 .. nc$
minimum value of conductivity:	$kmin := 1 \cdot 10^{-6}$
maximum value of conductivity:	$kmax := 2 \cdot 10^{-3}$
cell constant:	$cell := 2.264 \cdot 10^3$

Components

$$C_0 := C_0b \quad C_w := Cwb \quad C_s := Csb \quad f := fb$$

Part under consideration:

$$f_0 := \frac{fb}{2} \quad f_0 = 2.75 \times 10^5$$

$$f_1 := fb \quad f_1 = 5.5 \times 10^5$$

$$f_2 := 2 \cdot fb \quad f_2 = 1.1 \times 10^6$$

Conductivity and resistance ranges:

$$k_j := k_{\min} + \frac{(j+1)}{n} \cdot k_{\max} \qquad R := \frac{\text{cell}}{k}$$

Impedance, admittance, and modulus:

$$Z_{j,x} := Z_c(C0, Cw, Cs, R_j, f_x) \qquad Y^{(x)} := \frac{1}{Z^{(x)}} \qquad m^{(x)} := \overrightarrow{|Y^{(x)}|}$$

Sensitivity:

$$\text{sens}_{j,x} := \text{dmc}(C0, Cw, Cs, k_j, \text{cell}, f_x)$$

Sensitivity

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

gap size

Formulas

➤ **Reference:** C:\Pessoal\Alberto\Tese\simucell.mcd(R)

Fixed values considered in the calculation

base value for CO:	$COb := 1.0 \cdot 10^{-12}$
base value for Cw:	$Cwb := 0.13 \cdot 10^{-12}$
base value for Cs:	$Csb := 0.003 \cdot 10^{-12}$
basic operational frequency:	$fb := 550 \cdot 10^3$
number of solution conductivity points to be evaluated:	$n := 100 \quad j := 0 .. n$
number of different values of the part under consideration:	$nc := 2 \quad x := 0 .. nc$
minimum value of conductivity:	$kmin := 1 \cdot 10^{-6}$
maximum value of conductivity:	$kmax := 2 \cdot 10^{-3}$
basic cell constant:	$cellb := 2.264 \cdot 10^3$

Components

$$Cw := Cwb \quad f := fb$$

Parts under consideration:

$$g_0 := 0.5 \quad g_1 := 1 \quad g_2 := 2$$

$$Cs_x := \frac{Csb}{g_x}$$

$$Cs = \begin{pmatrix} 6 \times 10^{-15} \\ 3 \times 10^{-15} \\ 1.5 \times 10^{-15} \end{pmatrix}$$

$$\text{cell}_x := g_x \cdot \text{cellb}$$

$$\text{CO}_x := \frac{\text{COb}}{g_x}$$

$$\text{cell} = \begin{pmatrix} 1.132 \times 10^3 \\ 2.264 \times 10^3 \\ 4.528 \times 10^3 \end{pmatrix}$$

$$\text{CO} = \begin{pmatrix} 2 \times 10^{-12} \\ 1 \times 10^{-12} \\ 5 \times 10^{-13} \end{pmatrix}$$

Conductivity and resistance ranges:

$$k_j := k_{\min} + \frac{(j+1)}{n} \cdot k_{\max}$$

$$R^{(x)} := \frac{\text{cell}_x}{k}$$

Impedance, admittance, and modulus:

$$Z_{j,x} := Zc(\text{CO}_x, Cw, Cs_x, R_{j,x}, f)$$

$$Y^{(x)} := \frac{1}{Z^{(x)}}$$

$$m^{(x)} := \overline{|Y^{(x)}|}$$

Sensitivity:

$$\text{sens}_{j,x} := \text{dmc}(\text{CO}_x, Cw, Cs_x, k_j, \text{cell}_x, f)$$

Sensitivity

Simulation of the Oscillometric Detector Cell

internal diameter

Formulas

☞ **Reference:** D:\Tese\Final\simucell.mcd(R)

Fixed values considered in the calculation

base value for C_0 :	$C_{0b} := 1.0 \cdot 10^{-12}$
base value for C_w :	$C_{wb} := 0.13 \cdot 10^{-12}$
base value for C_s :	$C_{sb} := 0.003 \cdot 10^{-12}$
basic operational frequency:	$f_b := 550 \cdot 10^3$
number of solution conductivity points to be evaluated:	$n := 100 \quad j := 0 \dots n$
number of different values of the part under consideration:	$nc := 2 \quad x := 0 \dots nc$
minimum value of conductivity:	$k_{min} := 1 \cdot 10^{-6}$
maximum value of conductivity:	$k_{max} := 5 \cdot 10^{-3}$
basic cell constant:	$cell_b := 2.264 \cdot 10^3$

Components

$$C_0 := C_{0b} \quad f := f_b$$

Parts under consideration:

$$g_0 := \frac{20}{75} \quad g_1 := \frac{50}{75} \quad g_2 := \frac{75}{75}$$

$$C_{s_x} := C_{sb} \cdot (g_x)^2$$

$$Cs = \begin{pmatrix} 2.133 \times 10^{-16} \\ 1.333 \times 10^{-15} \\ 3 \times 10^{-15} \end{pmatrix}$$

$$\text{cell}_x := \frac{\text{cellb}}{\left(\frac{g_x}{g_x}\right)^2}$$

$$Cw_x := Cwb \cdot \frac{\ln\left(\frac{360}{75}\right)}{\ln\left(\frac{360}{g_x \cdot 75}\right)}$$

$$\text{cell} = \begin{pmatrix} 3.184 \times 10^4 \\ 5.094 \times 10^3 \\ 2.264 \times 10^3 \end{pmatrix}$$

$$Cw = \begin{pmatrix} 7.055 \times 10^{-14} \\ 1.033 \times 10^{-13} \\ 1.3 \times 10^{-13} \end{pmatrix}$$

Conductivity and resistance ranges:

$$k_j := k_{\min} + \frac{(j+1)}{n} \cdot k_{\max}$$

$$R^{(x)} := \frac{\text{cell}_x}{k}$$

Impedance, admittance, and modulus:

$$Z_{j,x} := Zc(C0, Cw_x, Cs_x, R_{j,x}, f)$$

$$Y^{(x)} := \frac{1}{Z^{(x)}}$$

$$m^{(x)} := \overrightarrow{|Y^{(x)}|}$$

Sensitivity:

$$\text{sens}_{j,x} := \text{dmc}(C0, Cw_x, Cs_x, k_j, \text{cell}_x, f)$$

Sensitivity