

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

MAURO SÉRGIO FERREIRA SANTOS

**Eletroforese Capilar com Derivatização
Eletroquímica de Compostos Neutros: Novas
Aplicações, Otimização e Miniaturização do
Sistema em Fluxo EC-CE-C⁴D**

**Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5809
Original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
31/01/2017

MAURO SÉRGIO FERREIRA SANTOS

**Eletroforese Capilar com Derivatização
Eletroquímica de Compostos Neutros: Novas
Aplicações, Otimização e Miniaturização do
Sistema em Fluxo EC-CE-C⁴D**

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

Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica

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

Santos, Mauro Sérgio Ferreira

S237e Eletroforese capilar com derivatização eletroquímica de compostos neutros: novas aplicações, otimização e miniaturização do sistema em fluxo EC-CE-C⁴D / Mauro Sérgio Ferreira Santos. -- São Paulo, 2016.

138p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Gutz, Ivano Gebhardt Rolf

1. Química analítica (instrumentação) 2. Eletroforese capilar de zona 3. Eletroanálise I. T. II. Gutz, Ivano Gebhardt Rolf , orientador.

543.0871 CDD

Dedicatória

*Aos meus pais, Agnólia e Antônio,
por serem os pilares da minha vida.
Se hoje estou aqui, é graças a vocês.*

*Aos meus tios Agnério e Elisa, por tudo
o que fizeram e fazem por mim, apoio
essencial para vencer essa jornada.*

*Ao meu Prof. Ivano Gutz, pela paciência,
dedicação e ensinamentos
compartilhados durante esses anos.*

AGRADECIMENTOS

“A DEUS, pela minha existência, pela proteção e por toda a bênção derramada em minha vida”.

Aos meus pais, Antônio e Agnólia, por todo amor, carinho e dedicação para comigo, pelo exemplo de honestidade e seriedade que usei de alicerce para construção da minha personalidade;

A minhas irmãs, Nara e Anne, e meus sobrinhos, Mariah, Diógenes e Pedro Antônio, por existirem em minha vida, por fazerem meus momentos mais felizes e por compreenderem minha ausência;

Aos meus tios, Agnério, Elisa e Maria das Graças, por me acolherem como filho, compreenderem minhas falhas e estarem sempre dispostos a me ajudar;

A minha priminha Anita, pelo carinho e diversão todas as vezes que chego em casa;

A Tati, meu amor, por estar sempre ao meu lado, compartilhando e propiciando momentos maravilhosos. Pela contribuição e apoio durante essa jornada, e principalmente, pela compreensão em tantos momentos que estou ausente, devido aos estudos e trabalho;

Ao professor e amigo, Sílvio Miranda Prada, pelo companheirismo e ensinamentos compartilhados, e pelo incentivo para minha inserção e continuidade na carreira acadêmica;

Aos professores Lúcio e Claudimir, pela contribuição na minha formação, mesmo durante conversas informais no laboratório;

Ao professor Carlos Garcia, pela contribuição na minha formação e por fazer-me sentir parte de sua família durante o estágio em seu laboratório;

Aos amigos e companheiros de laboratório, Fernando (Ferds) e Eric (Pop), pela essencial contribuição na minha formação, que ajudaram na elaboração dessa Tese. Pelas discussões científicas que, apesar de muitas vezes não chegarem a lugar nenhum, sempre valeram a pena;

Ao amigo Kelliton (Kleston), pelos bons momentos de descontração no LAIA e pela agilidade e prestatividade na construção do detector C⁴D enviado ao Laboratório do prof. Carlos Garcia, nos EUA, para que eu pudesse dar continuidade aos trabalhos lá realizados;

Ao amigo e parceiro Wanderson (Violino) e ao prof. Jonas Gruber pela colaboração durante os estudos de eletrooxidação do glicerol realizados em seu laboratório;

Aos colegas de laboratório Alexandre (Peixe), Carlos, Daniel, Guilherme (Splinter), Iranaldo (Ira), Lucas, Luís (Sensation), Michele, Pâmela, Simone e Thiago, pela contribuição científica, pelos momentos de descontração, e principalmente, por fazer do laboratório (LAIA) um ambiente excelente lugar para estar;

A “Capoeira”, na pessoa do meu Mestre Borboleta, e dos nossos alunos e irmãos, por me oferecer momentos únicos e muitas vezes, ter o papel crucial de manter meu corpo são e mente limpa, pois mesmo nos momentos mais turbulentos, na Capoeira eu sempre encontro a paz interior;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração e desenvolvimento desse trabalho;

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o meu doutoramento, com uma bolsa de doutorado (Processo: 161293/2012-3) e doutorado sanduíche pelo programa Ciências sem Fronteiras (Processo: 208195/2014-9).

“É tanto o que eu peço a Deus, é tanto o que Deus me dá, é tão pouco o que eu mereço, mas nada me faltará”.

Mestre Boa Voz

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança”.

Albert Einstein

“Uma das coisas que aprendi na vida, é que não é necessário ser o melhor, mas sim, dar o seu melhor. Afinal, na maior parte do tempo, nós somos o nosso verdadeiro adversário”.

Mauro Santos

RESUMO

Santos, M. S. F. *Eletroforese Capilar com Derivatização Eletroquímica de Compostos Neutros: Novas Aplicações, Otimização e Miniaturização do Sistema em Fluxo EC-CE-C⁴D*. 2016. 138p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A combinação de célula eletroquímica (EC) com a entrada do equipamento de eletroforese capilar (CE), apesar de recente, tem permitido realizar determinação de ânions radicais; pré-concentração eletroquímica de metais pesados, seguida de redissolução, separação e detecção; bem como monitorar produtos carregados formados por oxidação eletrocatalítica de espécies neutras, como álcoois primários e glicerol. Empregando o sistema EC-CE-C⁴D desenvolvido pelo grupo, a determinação simultânea de cátions, ânions (no contra fluxo) e espécies neutras (detectadas após derivatização eletroquímica) foi demonstrada pela primeira vez, tendo o antisséptico bucal (Listerine® Tartar Control) como amostra real. Embora constante e reprodutível, a conversão dos álcoois primários nos respectivos carboxilatos apresentou rendimento relativamente baixo, ~16%, nas condições anteriormente adotadas, 1,6 V vs. Ag/AgCl_{KCl 3M} empregando eletrodo de platina em meio ácido (HNO₃ 5 mmol L⁻¹ / HCl 1 mmol L⁻¹). Dessa maneira, avaliou-se a oxidação de álcoois primários de cadeia normal (C2 – C5) sobre diferentes materiais de eletrodo (ouro e platina) em diferentes meios (ácido, neutro e alcalino). Os carboxilatos gerados foram monitorados injetando uma alíquota da amostra derivatizada no capilar (50 µm d.i., 45 cm de comprimento e 20 cm efetivo) aplicando 5 kPa durante 5 s, e durante as separações, 30 kV foi aplicado entre as extremidades do capilar preenchido com Tris 30 mmol L⁻¹ / HCl 10 mmol L⁻¹ usado como BGE. Os resultados obtidos com o sistema EC-CE-C⁴D apontaram maior conversão dos álcoois nos respectivos ácidos carboxílicos em meio ácido, tanto em ouro quanto em platina. Adicionalmente, em eletrodo de ouro a formação dos carboxilatos apresentou certa seletividade não observada sobre platina, favorecendo a conversão dos álcoois de cadeia menor. Noutra vertente, buscando atender as necessidades atuais por metodologias que possibilitem monitorar a eletrooxidação do glicerol em reatores eletroquímicos, desenvolveu-se um método que permitiu determinar simultaneamente o glicerol e alguns de seus possíveis produtos de oxidação neutros, como gliceraldeído e dihidroxiacetona, explorando a formação de complexo carregado com borato (presente no BGE composto por H₃BO₃ 60 mmol L⁻¹ / LiOH 30 mmol L⁻¹), além dos produtos ionizáveis (ácidos carboxílicos) que são comumente analisados por CE. O equipamento de CE utilizado, munido de dois detectores C⁴D, também permitiu avaliar a interação de alguns ácidos carboxílicos com os modificadores de EOF, Polybrene® e CTAB, empregando MES 30 mmol L⁻¹ / His 30 mmol L⁻¹ como BGE. Seguindo a atual

tendência à miniaturização de sistemas analíticos, avaliou-se a possibilidade de construir um sistema EC-CE-C⁴D miniaturizado. Para isso, um novo método para fabricação de microdispositivos em vidro, baseado em ablação a laser de CO₂ assistida por parafina, como alternativa aos dispendiosos métodos de corrosão por via úmida foi desenvolvido. Os dispositivos obtidos por esse método apresentaram canais de perfil semicircular, e as dimensões puderam ser controladas variando a potência e/ou a velocidade de ablação do laser. Contudo, pelos desafios ainda encontrados para se construir um sistema EC-CE-C⁴D completo em substrato de vidro por ablação a laser de CO₂, optou-se por iniciar a miniaturização do sistema EC-CE-C⁴D com um sistema híbrido em que se aproveita as características mais bem definidas e favoráveis dos tubos capilares de sílica fundida usados em CE convencional. Esse sistema permitiu a determinação quantitativa de metanol na presença de alta concentração de etanol, possibilitando, numa primeira aplicação, realizar o monitoramento da quantidade de metanol e etanol nas frações iniciais coletada durante o processo de destilação fracionada na produção de uísque de milho (*moonshine*) feito em laboratório. Visto a maior seletividade para conversão dos álcoois de cadeia menor obtidas em eletrodo de ouro e meio ácido, esse foi escolhido para a presente aplicação. As condições que apresentaram melhores resultados no sistema híbrido EC-CE-C⁴D abrangeram diluição de 100 vezes da amostra em HNO₃ 2 mmol L⁻¹, eletrooxidação a 1,4 V vs. Ag durante 60 s, injeção eletrocínética no capilar mediante aplicação de 3 kV durante 4 s, e a separação dos carboxilatos realizada aplicando 3 kV entre as extremidades do capilar (50 μm d.i., 15 cm de comprimento com 12 cm efetivo), preenchido com CHES 10 mmol L⁻¹ / NaOH 5 mmol L⁻¹, usado como BGE. A análise das primeiras frações destiladas da “*labmade moonshine*” apresentou um aumento na concentração de etanol (variando de ~80 % a ~100 %) e simultâneo decréscimo da concentração de metanol (variando de 4 % a ~0,1 %). Em suma, avançou-se tanto no leque de aplicações da derivatização eletroquímica hifenizada com a eletroforese capilar como na miniaturização da instrumentação analítica para EC-CE-C⁴D, favorecendo a disseminação dessa poderosa combinação de três técnicas eletroquímicas.

Palavras-chave: Derivatização eletroquímica, Eletroforese capilar, Análise de etanol e metanol, Eletroforese em microchip, Miniaturização, Instrumentação analítica, Ablação em vidro, Laser de CO₂, Eletrooxidação de glicerol.

ABSTRACT

Santos, M. S. F. ***Capillary Electrophoresis with Electrochemical Derivatization of Neutral Compounds: New Application, Optimization and Miniaturization of the Flow System EC-CE-C⁴D***. 138p. Doctoral Thesis - Graduate Program in Chemistry. Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo - Brazil.

The direct couple of electrochemical cell (EC) with the inlet of the capillary electrophoresis (CE) equipment, recently demonstrated, has allowed the determination of radical anions; to perform electrochemical preconcentration of traces of heavy metals, followed by stripping, injection, separation and detection; and the generation of charged species by electrochemical oxidation of neutral molecules, e.g. primary alcohols and glycerol. Employing the EC-CE-C⁴D system developed by our group, the simultaneous determination of cations, anions (in the counter EOF mode) and neutral species (after electrochemical derivatization) was demonstrated for the first time and a mouthwash (Listerine® Tartar Control) was used as a real sample. Although constant and reproducible, the conversion of primary alcohols into carboxylates had a low yield (~16%), under the adopted conditions, 1.6 V vs. Ag/AgCl_{KCl 3M} using platinum electrode in acid medium (5 mmol L⁻¹ HNO₃ / 1 mmol L⁻¹ HCl). Thus, the yield of carboxylates was studied for the oxidation of alcohols (C2 – C5) on two electrode materials (gold and platinum) in different media (acid, neutral and alkaline). After the electrooxidation step an aliquot of the derivatized sample was automatically injected into the capillary (50 μm i.d., 45 cm in length and 20 cm up to detector) by applying 5 kPa during 5 s. The separation was carried out applying 30 kV between the capillary ends previously filled with 30 mmol L⁻¹ Tris / 10 mmol L⁻¹ HCl BGE. Cyclic voltammograms show higher current density for alcohols oxidation in alkaline medium than in acid one both on gold and platinum electrodes. On the other hand the yields of carboxylic acids were higher in acidic medium. Besides that, only on gold electrode some selectivity for the carboxylate formation was observed favoring the conversion of the short chain alcohols. In order to meet the current needs for methodologies that allow the monitoring of the electrooxidation of glycerol in electrochemical reactors, a method was also developed that allowed the determination of glycerol and some of its possible neutral oxidation products, such as glyceraldehyde and dihydroxyacetone, by exploring the formation of borate complexes (provided in the BGE composed of 60 mmol L⁻¹ H₃BO₃ / 30 mmol L⁻¹ LiOH), together with ionizable ones like carboxylic acids. The employed CE equipment with two C⁴D detectors allowed the evaluation of the interaction between some carboxylic acids and the EOF modifiers, Polybrene® and CTAB, using 30 mmol L⁻¹ MES / 30 mmol L⁻¹ His as BGE. Aligned with a current trend of analytical instrumentation, the miniaturized EC-CE-C⁴D system was attempted. For that, a new method for manufacturing microdevices in glass, based on paraffin-assisted CO₂ laser ablation, was developed as an alternative to costly wet-etching methods. The devices obtained by this method presented channels of semicircular profile and the dimensions could be controlled by varying the laser power and/or ablation velocity. Due to remaining challenges in the construction of a complete laser ablated EC-CE-C⁴D system on glass, a miniaturized system based on a hybrid approach is presented in the thesis, by taking advantage of the more defined and favorable characteristics of the well known fused silica capillary tubes used in CE. This system allowed the quantitative determination of methanol in the

presence of high ethanol concentration by taking advantage of the higher yield of short-chain carboxylic acid formation on gold in acidic medium. The first application was the monitoring of the amount of methanol and ethanol in the initial fractions collected during the fractional distillation process in the production of corn whiskey (moonshine) made in the laboratory. The conditions that showed the best results with the hybrid EC-CE-C⁴D system included a 100-fold dilution of the sample in 2 mmol L⁻¹ HNO₃, electrooxidation at 1.4 V vs. Ag for 60 s, electrokinetic injection into the capillary by applying 3 kV for 4 s and separation of the carboxylates carried out under 3 kV between the ends of the capillary (50 μm i.d., 15 cm in length and 12 cm up to detector) previously filled with 10 mmol L⁻¹ CHES / 5 mmol L⁻¹ NaOH, used as BGE. Analysis of the first distilled fractions of labmade moonshine showed an increase in ethanol concentration (ranging from ~ 80% to ~ 100%) and a simultaneous decrease in methanol concentration (ranging from 4% to ~ 0.1%). In short, both the range of applications of electrochemical derivatization hyphenated with capillary electrophoresis as well the miniaturization of analytical instrumentation for EC-CE-C⁴D were improved, favoring the dissemination of this powerful combination of three electrochemical techniques.

Keywords: Electrochemical derivation, Capillary electrophoresis, Analysis of ethanol and methanol, Microchip electrophoresis, Miniaturization, Analytical instrumentation, Glass ablation, CO₂ laser, Glycerol electrooxidation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Au – Ouro
BGE – Eletrólito de corrida
B e BR – Reservatório do tampão
C⁴D – Detecção condutométrica sem contato por acoplamento capacitivo
CCD – Detecção condutométrica sem contato
CE – Eletroforese capilar
CGE – Eletroforese capilar em gel
CHES – Ácido 2 (ciclohexilamino)etanossulfônico
CI – Cromatografia de íons
CMC – Concentração micelar crítica
CZE – Eletroforese capilar de zona
CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio
DAFC – Célula combustível de álcool direto
d.e. – Diâmetro externo
d.i. – Diâmetro interno
EAI – Injeção eletroquimicamente assistida
EC – Eletroquímica
EPC – Pré-concentração eletroquímica
EOF – Fluxo eletroosmótico
FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier
GC – Cromatografia gasosa
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
LD – Limites de detecção
LIF – Fluorescência induzida por laser
MEKC – Cromatografia eletrocínica micelar
MES – Ácido 2[N-morfolino]etanossulfônico
MS – Espectrometria de massas
 μ CE – Eletroforese capilar em microchip
 μ TAS – Micro sistema analítico total
NACE – Eletroforese capilar em meio não aquoso
Pd – Paládio
PDMS – Polidimetilsiloxano
PMMA – Polimetilmetacrilato
Pt – Platina
SDS – Dodecil sulfato de sódio
S e SR – Reservatório da amostra
SW – Reservatório de descarte da amostra
Tris – 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV – Ultravioleta
 v_e – Velocidade eletroforética
 v_j – Velocidade aparente
 v_{osm} – Velocidade eletroosmótica
Vis – Visível
W e WR – Reservatório de descarte

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. ELETROFORESE	15
1.1.1. Breve Histórico	15
1.1.2. Eletroforese Capilar	18
1.1.3. Detecção Condutométrica para Eletroforese Capilar	22
1.2. ACOPLAMENTO DE ELETROQUÍMICA COM ELETROFORESE	24
1.3. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES NEUTRAS POR ELETROFORESE CAPILAR	26
1.3.1. Cromatografia Eletrocínética Micelar	27
1.3.2. Derivatização	29
1.4. ANÁLISE SIMULTÂNEA DE CÁTIOS, ÂNIOS E ESPÉCIES NEUTRAS POR ELETROFORESE CAPILAR	30
1.5. ELETROFORESE CAPILAR EM MICROCHIP	32
1.5.1. Miniaturização de Sistemas Analíticos	32
1.5.2. Detecção Eletroquímica para Eletroforese em Microchip	35
1.6. ÁLCOOIS	36
2. OBJETIVOS	39
3. PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	40
3.1.1. Sistema Automatizado em Fluxo EC-CE-C4D	40
3.1.2. Eletroforese Capilar com dois Detectores C4D	41
3.1.3. Microchip de Vidro por Ablação a Laser	41
3.1.4. Sistema Híbrido Miniaturizado EC-CE-C4D	42
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	42
3.2.1. Sistema Automatizado em Fluxo EC-CE-C4D	42
3.2.2. Eletroforese Capilar com dois Detectores C4D	45
3.2.3. Microchip de Vidro por Ablação a Laser	46
3.2.4. Sistema Híbrido Miniaturizado EC-CE-C4D	50
3.3. PROCEDIMENTO	53
3.3.1. Sistema Automatizado em Fluxo EC-CE-C4D	53
3.3.2. Eletroforese Capilar com dois Detectores C4D	55
3.3.3. Microchip de Vidro por Ablação a Laser	55

3.3.4. Sistema Híbrido Miniaturizado EC-CE-C4D.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. APLICAÇÃO DO SISTEMA EC-CE-C ⁴ D PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CÁTIOS, ÂNIOS E ESPÉCIES NEUTRAS	57
4.1.1. Análise das Espécies Iônicas Presentes na Formulação	58
4.1.2. Análise das Espécies Neutras após Derivatização	59
4.1.3. Variação do Potencial Aplicado para Derivatização.....	62
4.1.4. Eletrooxidação de Outros Componentes da Amostra.....	66
4.2. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EC-CE-C4D	71
4.2.1. Eletrooxidação dos Álcoois em Eletrodo de Platina	72
4.2.2. Eletrooxidação dos Álcoois em Eletrodo de Ouro	79
4.2.3. Comparação dos Resultados Obtidos nos Eletrodos de Ouro e Platina.....	87
4.3. MONITORAMENTO DA ELETROOXIDAÇÃO DO GLICEROL POR CE-C4D: DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES NEUTRAS E IÔNICAS.....	90
4.3.1. Determinação Quantitativa do Glicerol, Gliceraldeído e Dihidrixiacetona.....	91
4.3.2. Determinação dos Ácidos Carboxílicos	93
4.4. ABLAÇÃO EM VIDRO POR LASER DE CO ₂	100
4.5. SISTEMA HÍBRIDO EC-CE-C4D.....	106
4.5.1. Determinação Quantitativa do Glicerol, Gliceraldeído e Dihidrixiacetona.....	108
4.5.2. Aplicação do Sistema Híbrido EC-CE-C4D.....	116
5. CONCLUSÃO	118
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
<i>LISTA DE ANEXOS</i>	<i>139</i>
<i>CURRICULUM VITAE.....</i>	<i>147</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1. ELETROFORESE

Eletroforese é uma técnica de separação, na qual espécies carregadas são separadas entre si quando submetidas a um campo elétrico numa célula pela qual circula corrente. Devido à ação do campo elétrico estabelecido entre os eletrodos, espécies carregadas positivamente (cátions) migram no sentido do cátodo (eletrodo de carga negativa), enquanto as carregadas negativamente (ânions) migram no sentido do ânodo (eletrodo de carga positiva). Além de promover a separação entre cátions e ânions de uma amostra inserida num eletrólito, a eletroforese possibilita separar entre si espécies catiônicas com carga ou raio hidrodinâmico diferente e, portanto, mobilidades diferentes, sendo o mesmo válido para ânions.

1.1.1. Breve Histórico

A primeira demonstração do uso analítico da eletroforese foi concebida no início da década de 1930 pelo químico sueco Arne Tiselius^[1] que, com o método de fronteira móvel, realizou a separação de algumas proteínas presentes no soro sanguíneo. Em 1937 descreveu um aparelho que favoreceu a difusão da técnica e ficou conhecido como *Tiselius Apparatus*. Por suas brilhantes contribuições, Tiselius foi agraciado com Prêmio Nobel de Química em 1948.

O melhoramento da rapidez e da eficiência das separações por meio do aumento do campo elétrico aplicado no aparelho de Tiselius esbarra no aumento da temperatura, por efeito Joule, vez que, para certa resistividade do eletrólito, a

corrente que flui é diretamente proporcional à diferença de potencial, enquanto a quantidade de calor gerada cresce com o produto dessas duas variáveis. Insuficiente dissipação do calor gerado pode levar à formação de gradientes de temperatura e, conseqüentemente, gradientes de densidade, originando convecção com dispersão das bandas durante a separação. Em caso extremo, o aquecimento Joule pode provocar a formação de bolhas ou até mesmo a decomposição de espécies presentes na amostra^[2]. Visando minimizar os efeitos do aquecimento, materiais anticonvectivos, como derivados de celulose e materiais gelatinosos, passaram a ser explorados, servindo de meio e substrato para separações. Esses materiais tiveram ampla aplicação na separação de compostos biológicos^[2], sendo utilizados até os dias atuais. Contudo, esses sistemas se mantiveram restritos a valores de campo elétrico da ordem de 10 a 30 V cm⁻¹, mesmo praticando a separação em camadas delgadas, que oferecem relação área/volume mais favorável à dissipação do calor do que os tubos originalmente usados por Tiselius.

A primeira evolução significativa da técnica da eletroforese só veio quase 4 décadas depois do seu surgimento. Buscando superar os inconvenientes atrelados ao efeito Joule, Hjertén^[3] demonstrou, pela primeira vez, a possibilidade de empregar tubos de quartzo de 300 µm de diâmetro interno (d.i.), sob rotação, permitindo realizar separações sob campo elétrico da ordem de 80 V cm⁻¹. O aumento da relação entre a área de contato com as paredes e o volume interno dos tubos de pequeno diâmetro interno favorece a dissipação do calor gerado. A contribuição de Hjertén foi o primeiro passo para o desenvolvimento da eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) da forma que conhecemos hoje.

Em meados da década de 1970, Pretorius e colaboradores^[4] demonstraram a utilização do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) para

bombeamento de solução e apresentaram as vantagens de empregar o EOF em relação aos mecanismos tradicionais de bombeamento utilizados em cromatografia.

No início da década de 1980, Jorgenson e Lukacs^[5], aproveitando-se do aumento da eficiência de dissipação do calor com a redução do diâmetro interno do tubo, utilizaram pela primeira vez, tubos capilares de 75 μm (d.i.), demonstrando as potencialidades da técnica para aplicação analítica. Essa implementação marcou o início da utilização da técnica nos laboratórios de pesquisa, na modalidade de eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*) ou, como é mais conhecida atualmente, simplesmente CE.

Em 1984, Terabe e colaboradores^[6], empregando o que seria uma combinação de cromatografia e eletroforese, demonstraram a possibilidade de separar espécies neutras pela, então denominada, cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography*). Adicionando ao eletrólito de corrida tensoativos em concentração superior à micelar crítica (CMC), espécies neutras puderam ser separadas beneficiando-se da diferença nos seus coeficientes de partição entre micelas carregadas e o eletrólito de corrida.

A eletroforese capilar experimentou diversos avanços nas últimas décadas, permitindo aplicação analítica, qualitativa e quantitativa a quase, se não, todas as classes de compostos. Além das aplicações tradicionais a cátions e ânions, orgânicos e inorgânicos^[7,8], vale citar as separações de isômeros empregando sistemas seletivos a compostos quirais^[9-11], a utilização de capilares preenchidos com géis em eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês *Capillary Gel Electrophoresis*) aplicada à separação de biomoléculas^[12-14], separações em meio não aquoso (NACE, do inglês *Non-Aqueous Capillary Electrophoresis*)^[15,16], até a determinação simultânea de cátions, ânions e neutros numa mesma corrida^[17],

dentre outras. Uma visão mais aprofundada sobre a técnica e suas potencialidades e limitações pode ser obtida em livros texto^[18,19] e excelentes artigos de revisão^[2,20] publicados em português.

1.1.2. Eletroforese Capilar

Em CE, espécies iônicas ou ionizáveis são separadas no interior de um tubo capilar pelo mesmo princípio das separações eletroforéticas em papel ou gel, porém mais rapidamente, como consequência da ausência da dispersão decorrente dos múltiplos caminhos não equivalentes que os analitos encontram no papel ou no gel, e do uso de valores mais elevados de campo elétrico, situados no intervalo de 100 a 700 V cm⁻¹. Os tubos capilares utilizados em CE são geralmente confeccionados em sílica fundida, tipicamente com diâmetro interno na faixa de 20 a 100 µm e comprimento entre 50 e 100 cm, sendo submetidos a diferenças de potencial da ordem de 20 a 30 kV. Devido à fragilidade da sílica quando riscada, os capilares são recobertos com um filme polimérico (geralmente poliimida) que lhes confere flexibilidade e proteção mecânica. A injeção da amostra no capilar pode ser eletrocinética ou hidrodinâmica^[2]. A injeção eletrocinética é realizada aplicando uma diferença de potencial entre os reservatórios contendo a amostra e o eletrólito de corrida (BGE, do inglês *Background Electrolyte*), sendo os analitos mobilizados pelo mesmo fenômeno de eletroforese. Consequentemente a proporção entre os analitos na alíquota injetada difere da amostra, favorecendo as espécies de maior mobilidade e com carga oposta à do pólo da injeção. A injeção hidrodinâmica pode ser realizada aplicando maior pressão no reservatório contendo a amostra frente ao reservatório do lado oposto do capilar, seja por pressurização de um extremo, redução da

pressão do lado oposto ou por sifonagem (elevando o reservatório contendo a amostra). Por deslocar mecanicamente uma alíquota de solução (amostra) para o interior do capilar, não ocorre discriminação de analitos, sendo admitida no capilar uma fração representativa da amostra.

Por ser feito de sílica, a superfície interna do capilar apresenta grupos silanol terminais que entram em contato com a solução em seu interior. Esses grupos possuem um caráter fracamente ácido (pK_a médio = 5,9), de modo que, em contato com solução aquosa de pH com valor superior ao pK_a , se dissociam significativamente (acima de 50 %) liberando íons H^+ e deixando a superfície interna do capilar carregada negativamente. A região adjacente à superfície interna do capilar se comporta como a dupla camada elétrica e pode ser descrita pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern-Grahame^[21], segundo o qual cátions são atraídos eletrostaticamente e adsorvem na superfície. Nesse modelo, o centro dos íons adsorvidos na superfície define um plano paralelo à superfície do capilar. Quando há suficiente interação química para deslocar a camada de hidratação interposta (adsorção dita específica), esse plano é denominado de plano interno de Helmholtz (IHP, do inglês *Inner Helmholtz Plane*). Quando a bainha de hidratação dos íons persiste e precisa ser somada à distância entre os planos (adsorção não específica), é denominado de plano externo de Helmholtz (OHP, do inglês *Outer Helmholtz Plane*). Uma terceira região, definida como camada difusa, corresponde a um gradiente de concentração dos íons de carga oposta à superfície, que diminui com a distância da superfície do capilar até atingir a concentração do âmago (*bulk*) da solução. Ao ser aplicado o potencial de separação, os cátions próximos à interface negativamente carregada migram, sob a influência do campo elétrico, no sentido do eletrodo de carga oposta (cátodo), arrastando consigo o restante do líquido contido

no âmago do fino capilar, sendo esse processo denominado fluxo eletrosmótico (EOF). O EOF já é detectável a partir de pH 2,5, tornando-se maior com o aumento do pH da solução, como consequência da dissociação dos grupos silanol, atingindo um patamar, de valor máximo, em pH superior a 7,9.

Por ser gerado pelo deslocamento de uma camada catiônica, o EOF migra no sentido do cátodo, com uma velocidade denominada de velocidade do fluxo eletrosmótico (v_{osm}), que ao se manter fixo o comprimento do capilar e o campo elétrico aplicado, depende do pH do meio, da composição e da concentração do BGE. Dessa maneira, na presença do EOF, cátions têm seu deslocamento acelerado em direção ao cátodo (e ao detector, quando posicionado neste extremo), migrando com velocidade aparente (v_i) que corresponde a soma das velocidades eletroforética (v_{ef}) da espécie e eletrosmótica (v_{osm}) do EOF. Por outro lado, apenas os ânions com velocidade inferior ao EOF alcançarão o detector, enquanto os que apresentam velocidade maior que o EOF migrarão para fora do capilar na extremidade em que foi realizada a injeção. As espécies neutras, por não sofrerem influência do campo elétrico, são deslocadas pelo EOF, ou seja, sem que haja separação entre duas ou mais.

Frente às técnicas de separação em fase líquida como cromatografia de íons (IC, do inglês *Ion Chromatography*) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), a CE apresenta vantagens como baixo volume de amostra necessário para análise (alguns μL , dos quais 1 a 10 nL são injetados) e pequeno consumo de eletrólito diluído, resultando em baixa geração de resíduos. O mecanismo eletrosmótico de transporte gera um perfil radial linear, minimizando os efeitos de dispersão das bandas observados em fluxo com perfil parabólico, característico de propulsão realizada por pressão, como em

HPLC e IC. O equipamento trabalha a pressão atmosférica, dispensando o uso de bombas de alta pressão, e o tempo necessário para separação é geralmente menor, enquanto a capacidade de resolução dos picos é superior à da HPLC, alcançando, em alguns casos, um milhão de pratos teóricos^[2].

Os avanços obtidos em CE estão relacionados, parcialmente, com a possibilidade de utilizar os mesmos detectores empregados em HPLC, como por exemplo, os espectrométricos (absorção, fluorescência, Raman e massas) e/ou eletroquímicos (condutividade, amperometria, potenciometria e voltametria). Devido ao baixo volume de amostra injetado e conseqüentemente, a pequena quantidade de mols do analito, os limites de detecção (LDs) em CE são geralmente menos favoráveis que os alcançados para compostos orgânicos por HPLC ou metais por espectrometria de emissão ou absorção atômica. Entre as alternativas usadas para melhorar o LD existem estratégias aplicáveis dentro do próprio capilar, como o *stacking*, e outras, de pré-concentração^[22,23]. O *stacking*^[24] consiste em introduzir a amostra num meio com condutividade inferior à do tampão de corrida, de modo que essa região estará sujeita à maior campo elétrico, promovendo rápida acumulação dos analitos numa banda estreita na interfase entre o *plug* de amostra e o tampão de corrida, a partir de onde passam a ser separados normalmente. Os exemplos mais conhecidos de pré-concentração do analito incluem os processos de extração (em fase sólida, líquido-líquido ou gás-líquido)^[25,26], sendo possível realizar acumulação também por meios eletroquímicos^[27,28].

Recentemente, buscando viabilizar determinações de metais tóxicos nos baixos níveis exigidos pela legislação, Gutz e colaboradores^[27] introduziram a combinação da pré-concentração eletroquímica (EPC, do inglês *Electrochemical Preconcentration*) com a CE. Nesse sistema, os analitos são pré-concentrados na

superfície de um eletrodo em uma célula eletroquímica em fluxo e posteriormente redissolvidos por eletrooxidação e injetados no CE. Durante a separação, além da pré-concentração eletroquímica, os autores empregaram adicionalmente *stacking* e, com o aproveitamento simultâneo das duas estratégias, alcançaram uma intensificação do sinal de até cinco ordens de grandeza, sendo duas devido à EPC^[27] e de uma a três devido ao *stacking*^[24].

1.1.3. Detecção Condutométrica para Eletroforese Capilar

A primeira utilização da detecção condutométrica em eletroforese capilar foi reportada na década de 1970, no trabalho de Van Der Steen *et. al.*^[29], demonstrando sua aplicação em isotacoforese. Em 1987, Zare e colaboradores^[30] inseriram dois microeletrodos de platina (25 µm de diâmetro) em capilares de 50 e 75 µm. Para perfurar os capilares, os autores recorreram ao laser de CO₂, obtendo células condutométricas de aproximadamente 30 pL de volume. Contribuições significativas no desenvolvimento teórico e fundamental nos mecanismos de detecção para eletroforese foram as de Katzmayer e colaboradores^[31]. Nesse trabalho os autores discutiram sobre a otimização do tampão de corrida para detecção condutométrica em CE, demonstrando que as diferenças de condutância observada, bem como a relação sinal-ruído não são dependentes apenas das diferenças de mobilidade entre o analito e o co-íon do tampão, mas também do contra-íon utilizado.

O detector condutométrico, por responder indiretamente à diferença de condutividade entre componentes da amostra e o tampão de corrida (detector universal), permite monitorar todas as espécies que possam ser separadas por CE. Apesar da universalidade desse detector, amplamente usado na cromatografia de

íons, a laboriosidade para construção da célula condutométrica (devido à necessidade de fazer furos micrométricos e fixação dos eletrodos sem bloquear o capilar) e inativação dos eletrodos devido ao desgaste (p. ex., ao usar eletrodos de cobre ou níquel) ou adsorção de espécies presentes na amostra e/ou tampão, restringiram o seu uso em CE.

O surgimento dos detectores condutométricos por acoplamento capacitivo, sem contato direto com a solução, também chamados de detectores oscilométricos ou de impedância, no fim da década de 90, superou os inconvenientes citados, marcando o início duma combinação que viria a ganhar destaque nessa área. Como os eletrodos são posicionados do lado externo do capilar, sem entrar em contato com a solução, problemas como contaminação e desgaste dos eletrodos são eliminados e os efeitos do campo elétrico aplicado durante as separações eletroforéticas são minimizados.

A oscilometria, datada da primeira metade do século XX para medições de constante dielétrica e posteriormente também usada em titulações, caiu em desuso nos laboratórios analíticos até que a aplicação dos detectores condutométricos sem contato em CE foi introduzida simultaneamente, em publicações independentes, por Fracassi da Silva e do Lago^[32], com um protótipo operado a 600 kHz, e por Zemann e colaboradores^[33], com um protótipo operando a 20 e 40 kHz. Nesse tipo de detector, uma onda senoidal de radiofrequência é aplicada entre os dois eletrodos externos ao capilar (tipicamente em forma de anel) e a corrente alternada circulante entre eles é retificada e amplificada, correspondendo ao sinal, predominantemente, de condutância. Apesar dos eletrodos não estarem em contato com a solução, a medida de condutividade é possível, pois, com o aumento da frequência, a reatância capacitiva diminui e conseqüentemente a impedância da parede do capilar também

é reduzida. A diminuição da reatância capacitiva possibilita monitorar as variações de condutividade da solução no interior do capilar, mesmo com os eletrodos posicionados do lado externo. Quando aplicado à CE, esses detectores se consagraram com o nome de detecção condutométrica sem contato (CCD, do inglês *Contactless Conductivity Detection*) e, posteriormente, C⁴D (*Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*). O número de trabalhos que empregam esse tipo de detecção vem crescendo significativamente nas últimas décadas^[34], e um entendimento mais aprofundado no que se refere à fundamentação teórica e aos mecanismos de detecção, pode ser obtido em artigos de revisão^[35-37].

1.2. ACOPLAMENTO DE ELETROQUÍMICA COM ELETROFORESE

Além do uso como detectores, células eletroquímicas também têm sido combinadas com técnicas espectrométricas e analíticas de separação, principalmente com finalidade de pré-concentração ou tratamento da amostra. Serve de exemplo a determinação de catecolaminas e seus produtos de eletrooxidação gerados em uma célula eletroquímica acoplada à HPLC com detecção UV-vis^[38], a geração de fase móvel com gradiente de pH para separação cromatográfica de proteínas^[39,40] e a determinação de traços de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica após a pré-concentração em uma célula eletroquímica^[41].

A hifenação da célula eletroquímica com a entrada do equipamento de eletroforese capilar (EC-CE) é mais recente, mas sua versatilidade tem possibilitado o desenvolvimento de diversas estratégias novas a serem exploradas. Em 2003, Osaka e colaboradores^[42] demonstraram a separação e detecção de ânions radicais de quinonas por eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica empregando

um detector por arranjo de diodos, após geração dos radicais numa célula eletroquímica acoplada ao CE. No mesmo ano, Matysik^[43] introduziu o que chamou de injeção eletroquimicamente assistida (EAI, do inglês *Electrochemically Assisted Injection*), demonstrando a separação e detecção de derivados de ferroceno por CE-UV. Em 2011, com uma célula eletroquímica melhorada, Scholz e Matysik^[44] passaram a efetuar a detecção de ferroceno e alguns derivados por espectrometria de massas após a separação por CE. Apesar de abrir perspectivas favoráveis, esses protótipos não se aplicavam à determinação quantitativa, vez que o capilar ficava posicionado a distâncias diferentes do eletrodo a cada montagem do sistema. Em 2012, Palatzky e Matysik^[45] empregaram um microposicionador para delimitar a distância entre a ponta do capilar e o eletrodo de trabalho na célula eletroquímica, possibilitando assim a aplicação desse sistema também para quantificação dos analitos.

Em 2010, Gutz e colaboradores^[27] publicaram um sistema automatizado em fluxo designado EC-CE-C⁴D (*ElectroChemistry - Capillary Electrophoresis - Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*) com o qual ampliaram as perspectivas de aplicação das pesquisas exploratórias apresentadas em tese defendida em 2008^[46]. Nesse sistema, a ponta do capilar foi lapidada em ângulo (em forma de bisel), de modo a tocar na superfície do eletrodo de trabalho sem bloquear o orifício do capilar, que permanece numa distância fixa da superfície do eletrodo, permitindo um posicionamento reprodutível, dispensando o inconveniente uso de microposicionadores. Inicialmente esse sistema foi aplicado à determinação de metais pesados em nível traço, após pré-concentração eletroquímica na superfície do eletrodo, seguida de redissolução e injeção no capilar^[27,28]. Noutra vertente, foi possível estudar os produtos da eletrooxidação do glicerol em diferentes eletrodos

de metais nobres (Au, Pd e Pt), abrindo perspectivas para acompanhar produtos iônicos ou ionizáveis formados durante processos eletrocatalíticos^[47].

Esses trabalhos pioneiros de EC-CE-C⁴D inspiraram a avaliação do sistema para derivatização eletroquímica de compostos neutros, visando à determinação quantitativa dos produtos gerados, na qual se demonstrou pela primeira vez, a determinação quantitativa de álcoois primários^[48], após a conversão em seus respectivos carboxilatos, numa célula eletroquímica em fluxo com eletrodo de trabalho de Pt, acoplada ao equipamento de CE com detecção por C⁴D. Aprofundando os estudos nesta linha (durante o doutoramento), foi possível demonstrar também, pela primeira vez, a determinação simultânea de cátions, ânions (no contra fluxo) e espécies neutras (após derivatização) por CE-C⁴D numa única corrida, empregando antisséptico bucal como amostra real^[17].

1.3. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES NEUTRAS POR ELETROFORESE CAPILAR

Em eletroforese capilar, a determinação de compostos neutros é possível empregando a cromatografia eletrocinética micelar (MECK)^[49,50]. Alternativamente à MEKC, a formação de complexo carregado^[51] ou derivatização química da molécula^[52], gerando uma espécie carregada, podem ser empregadas previamente ou durante a etapa de separação. A derivatização prévia do analito é geralmente a mais utilizada, mas esse tipo de estratégia implica num aumento do número de espécies a serem separadas, da força iônica do meio e do risco de interferentes na análise. Nesse contexto, a derivatização eletroquímica da molécula consiste numa estratégia atraente.

1.3.1. Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC)

A idéia de separar analitos neutros por eletroforese empregando micelas carregadas foi proposta, pela primeira vez, por Nakagawa^[50] em 1981, porém sua aplicação só foi realizada em 1984, por Terabe e colaboradores^[6], demonstrando a separação de 15 compostos fenólicos por CE. Nesse trabalho, 1 mmol L⁻¹ de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi usado para formar as micelas negativamente carregadas no eletrólito de corrida, composto por 20 mmol L⁻¹ de tampão borato/fosfato, pH 7,0.

Em MEKC, surfactantes são adicionados ao eletrólito de corrida, em concentração superior a CMC, e as micelas formadas, geralmente aniônicas, migram sob ação do campo elétrico aplicado. Em CE com eletrólitos neutros ou alcalinos, devido à velocidade alta do EOF em comparação com a velocidade de migração de micelas carregadas negativamente em direção ao ânodo, essas são arrastadas até o detector (quando posicionado na extremidade próxima ao cátodo e oposta à da injeção) com velocidade que corresponde à soma vetorial das duas citadas. Quando houver diferença nos coeficientes de partição dos analitos neutros a separar entre as micelas carregadas e o BGE, cada analito alcançará o detector num determinado tempo. Isso porque os analitos (neutros) mais solúveis nas micelas (aniônicas) sofrerão maior atraso que os mais solúveis no BGE e, na média desse equilíbrio dinâmico, serão arrastados pelo EOF por fração proporcionalmente maior do tempo rumo ao detector^[49,50]. Nessa técnica, as micelas agem como uma fase estacionária (fase pseudo-estacionária) enquanto o eletrólito de corrida age como uma fase móvel em analogia com as separações cromatográficas. Dessa forma, a separação das espécies, apesar de depender do campo elétrico, ocorre principalmente devido à partição diferenciada dos analitos entre as duas fases, como em cromatografia.

Quando a separação dos analitos por MEKC^[53] não é satisfatória, aditivos tem sido empregados para melhorar a seletividade e aumentar a eficiência das separações. Devido à similaridade da técnica com HPLC, na qual solventes orgânicos são geralmente empregados para melhorar as separações, também na MEKC os solventes tem sido os aditivos mais avaliados^[54], seguidos das ciclodextrinas, mas nesse caso como complexantes auxiliares^[55,56]. As ciclodextrinas são constituídas de 6 a 8 moléculas de glicose e apresentam formato cônico, que permite a interação com o analito em seu interior. Por serem neutras, as ciclodextrinas são simplesmente arrastadas pelo EOF até o detector e a diferenciação agora ocorre devido às diferenças na partição dos analitos nos três meios (o interior da ciclodextrina, o interior da micela e o eletrólito de corrida).

Por não exigir modificação no equipamento de CE, e principalmente devido à maior disponibilidade de instrumentos que possuem esse tipo de detector, em MEKC a detecção é geralmente realizada por espectrofotometria UV-vis^[49,57,58]. Assim como em CZE, é necessário realizar derivatização (previa ou durante a separação) de analitos que não absorvem para inserir um grupo cromóforo ou, empregar detecção indireta, adicionando um co-íon cromóforo ao eletrólito de corrida. Os limites de detecção alcançados em MEKC empregando detecção UV-vis, tal como em CZE, são menos favoráveis que os alcançados com técnicas de detecção mais sensíveis, entre as quais tem ganhado preferência à fluorescência induzida por laser (LIF, do inglês *Laser-Induced Fluorescence*)^[59]. Com a elevada sensibilidade e adicional capacidade de identificação dos picos, a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*)^[60] tem se mostrado como a técnica de detecção mais favorável para as técnicas de separação em geral. Contudo, o elevado custo de aquisição de um MS (ficando um equipamento de LIF em posição intermediária)

juntamente com o alto custo de manutenção, tem fomentado a busca por alternativas mais acessíveis, sendo que, dentre elas, os sistemas eletroquímicos de detecção tem ganhado destaque. Apesar de ainda poucos trabalhos utilizarem detecção eletroquímica em MEKC, vale ressaltar a quantificação de alcoóis primários^[61] e a determinação simultânea de cafeína e taurina^[62] usando C⁴D, e a determinação de compostos fenólicos empregando detecção amperométrica^[63].

1.3.2. Derivatização

A derivatização é uma estratégia de preparo/manipulação da amostra e tem sido amplamente utilizada em técnicas de separação, como HPLC^[64,65] e CE^[52,66,67], com a finalidade de melhorar ou permitir a detecção do analito de interesse. A derivatização pode acontecer previamente à separação (*pre-column* ou *pre-capillary*), diretamente no capilar (*on-column* ou *on-capillary*) e após separação (*post-column* ou *post-capillary*). De maneira geral, a derivatização consiste em realizar uma modificação da espécie química, como por exemplo, inserindo grupos cromóforos ou fluoróforos em espécies que não absorvem, permitindo assim a detecção por espectrofotometria UV-vis ou fluorescência, respectivamente. Em alguns casos, a derivatização pode ser empregada para permitir a separação de compostos quirais. Adicionalmente, reações que visam conferir carga a moléculas neutras com finalidade de permitir separação desses compostos por CE, por exemplo, álcoois^[68], poliálcoois^[69,70], álcoois graxos^[71], aldeídos^[72], cetonas, e açúcares, têm sido empregadas.

O pré-processamento eletroquímico tem se mostrado uma alternativa à análise de espécies neutras por CE quando estas são susceptíveis a eletrooxidação

ou eletrorredução com formação de espécies iônicas ou ionizáveis. Até o momento, essa estratégia foi explorada para: determinação de traços de metais pesados através da pré-concentração em fluxo, seguida de redissolução, separação por CE e detecção por C^4D ^[27,28]; estudo de processos de eletrooxidação de espécies orgânicas sobre diferentes materiais de eletrodo, monitorando os produtos gerados durante a electrocatálise por CE- C^4D ^[43,47] e CE-UV/Vis^[73]; detecção de ânions radicais de quinonas gerados na superfície do eletrodo de trabalho^[42]; e geração de espécies ionizáveis a partir de neutras, permitindo a quantificação de álcoois primários por CE- C^4D ^[17,48], monitorando os ácidos carboxílicos gerados durante a eletrooxidação. Adicionalmente, essa técnica tem sido utilizada para melhorar a eficiência de ionização de espécies no *electrospray* quando empregada detecção por espectrometria de massas^[44,45].

1.4. ANÁLISE SIMULTÂNEA DE CÁTIONS, ÂNIONS E ESPÉCIES NEUTRAS POR ELETROFORESE CAPILAR

Apesar da elevada capacidade da cromatografia a gás (GC, do inglês *Gas Chromatography*) para separação e quantificação de espécies voláteis, compostos não volatilizáveis (p. ex., metais) ou termicamente instáveis não podem ser analisados por essa técnica sem derivatização previa^[74]. Por outro lado, HPLC possui ampla aplicabilidade, porém, também apresenta algumas limitações. Por exemplo, para análise simultânea de cátions e ânions por cromatografia de íons, duas diferentes colunas são necessárias^[75,76]. Nesse contexto, a eletroforese capilar é uma técnica versátil que permite a separação simultânea de espécies catiônicas e aniônicas (orgânicas ou inorgânicas)^[77,78].

Em CE, ao se colocar o detector no extremo negativo do capilar, serão separados e detectados os cátions em ordem decrescente de mobilidade, seguidos pelos ânions que estiverem migrando com velocidade inferior à do fluxo eletroosmótico (separação em contra-fluxo)^[79,80]. Nos últimos anos, diversos trabalhos têm reportado a separação simultânea de cátions e ânions por CE^[77,78], sendo algumas estratégias particularmente interessantes. Utilizando um equipamento com dois detectores, um em cada extremidade do capilar, e transportando a amostra hidrodinamicamente até o meio do capilar antes da aplicação da alta tensão, a separação simultânea é possível vez que, sob efeito do campo elétrico aplicado, os cátions migram no sentido do cátodo e os ânions, do ânodo, passando pelos detectores, como demonstrado por Hauser e colaboradores^[81]. Kuban e colaboradores^[82] demonstraram a possibilidade da detecção simultânea injetando a amostra em ambas as extremidades do capilar. Nessa implementação basta um detector na região intermediária, mas a distinção entre cátions e ânions é dificultada, vez que espécies provenientes de extremos opostos do capilar podem alcançar o detector ao mesmo tempo. Nesse contexto, como apresentado nos resultados desta tese, a separação de cátions, ânions (no contra fluxo) e espécies neutras (detectando as espécies carregadas que foram geradas após derivatização eletroquímica) pode ser demonstrada pela primeira vez, empregando o sistema automatizado em fluxo EC-CE-C⁴D^[17].

1.5. ELETROFORESE CAPILAR EM MICROCHIP

1.5.1. Miniaturização de Sistemas Analíticos

A partir da década de 1960, com o desenvolvimento da microtecnologia, o mundo vem experimentando uma tendência à miniaturização dos sistemas, extraordinariamente bem sucedida no campo da eletrônica, mas não restrita a ela. Assim também na Química Analítica há muita atividade de pesquisa em curso nesse campo, das quais já derivaram dispositivos comerciais, especialmente na área de biodiagnósticos^[83]. As vantagens observadas abrangem produção em massa, menor volume de amostras e reagentes, menor tempo de análise, custo relativamente baixo e descartabilidade do dispositivo, se conveniente (amostras infectantes ou radioativas).

Os primeiros dispositivos microfluídicos para aplicação analítica apareceram na década de 1970^[83] e foram desenvolvidos em *wafer* de silício^[84,85], quartzo e vidro^[86] usando os, hoje bem consolidados, métodos fotolitográficos^[87-90], provenientes da tecnologia eletrônica de microfabricação. O nível de integração das diferentes etapas do processo analítico em sistemas miniaturizados vem crescendo e já na década de 1990 foi cunhado o termo μ TAS, para designar um micro sistema analítico total. Também na mesma época, para uma designação mais ampla, não restrita a sistemas analíticos, o termo *Lab-On-a-Chip* passou a ser empregado, correspondendo à integração de etapas completas de procedimentos desenvolvidos em bancada num único bloco de dimensões reduzidas, podendo contemplar etapas de amostragem, pré-tratamento, reações químicas, separação e detecção^[83].

Entre os sistemas de detecção que conferem maior sensibilidade e seletividade ao μ TAS estão a LIF e a MS. Todavia, quando aplicáveis, outras técnicas de custo e dimensões mais reduzidas e mais facilmente integráveis no próprio *chip* durante a fabricação despertam grande interesse, destacando-se entre elas as técnicas eletroquímicas^[91-93].

Principalmente devido à simplicidade da instrumentação, a eletroforese capilar é a técnica de separação mais utilizada em sistemas miniaturizados. Basicamente, as etapas de injeção (eletrocínética) e separação necessitam apenas de fontes de alta tensão, dispensando o uso de aparatos externos como bombas de pressão usadas em LC ou GC^[88,94]. O uso de bombas e micro válvulas no próprio chip também pode ser evitado ou minimizado.

Para fabricação de microdispositivos, o vidro é um excelente material por possuir características próximas às da sílica fundida (empregada para fabricação dos capilares usados em CE): é inerte a grande parte dos reagentes químicos, fácil de limpar, resistente a altas temperaturas e possui boas propriedades ópticas. O processo de microfabricação em vidro é realizado, em geral, através dos métodos fotolitográficos, que requerem longos tempos de processamento, custo elevado e necessitam do uso de salas limpas^[89,95]. Por outro lado, isso tem fomentado a busca por materiais e métodos de fabricação alternativos.

Entre as mais populares alternativas ao vidro figuram materiais poliméricos como polidimetilsiloxano (PDMS)^[96,97], policarbonato^[98,99], toner-poliéster^[100,101] e polimetilmetacrilato (PMMA)^[102-105], que permitem rápida prototipagem, fácil manipulação, custo relativamente baixo e menor fragilidade que o vidro. Os métodos empregados para microfabricação nesses materiais incluem litografia *soft*^[96,97], *hot embossing*^[99,106], impressão direta^[100,101] e ablação a laser^[104,105,107]. Nessa linha,

uma alternativa de fácil implementação em qualquer laboratório, por requerer somente uma impressora a laser, foi introduzida por do Lago e colaboradores^[100]. Nesse trabalho, um filme de poliéster (material das antigas transparências para retroprojeter) foi usado como substrato para fabricação do dispositivo e os canais de espessura micrométrica foram delimitados pela deposição de *toner* por impressão a laser, seguida de selagem térmica entre dois filmes impressos com auxílio de uma laminadora (empregada para plastificar documentos). A detecção condutométrica sem contato é compatível com esses dispositivos impressos desenhados para CE, vez que os eletrodos podem ser aplicados na face externa do filme de poliéster. Contrapondo-se às vantagens supracitadas, algumas características dos polímeros que são relevantes a algumas aplicações, como resistência química, transparência óptica e resistência a alta temperatura, são inferiores às obtidas com vidro.

Realizar, por ablação a laser, gravação de estruturas em vidro com dimensões maiores e menos precisas que as atingíveis por fotolitografia, dispensa o uso de salas limpas e evita a necessidade de máscaras e moldes empregados durante o processo de micro fabricação, porém, devido ao elevado custo à exceção do laser de CO₂, esses equipamentos não são facilmente encontrados em laboratórios de química^[108]. A versátil ablação com laser de CO₂ tem sido largamente empregada para prototipagem em materiais poliméricos, como por exemplo, PDMS^[107] e PMMA^[104,105,109], mas em vidro foi pouco explorada até o momento^[110-112]. Talvez isso se deva aos desafios encontrados para conseguir dispositivos de vidro isentos de rachaduras, uma vez que, devido à alta potência do laser requerida para a ablação, o aquecimento acompanhado de expansão térmica local resulta na quebra do dispositivo e/ou obtenção de canais de baixa qualidade.

1.5.2. Detecção Eletroquímica para Eletroforese em Microchip

Geralmente, a detecção eletroquímica, quando aplicada a técnicas de separação (HPLC, CE ou μ CE) refere-se ao uso de amperometria, salvo na cromatografia de íons, em que prevalece a condutometria convencional e na eletroforese capilar, que conta com crescente presença da condutometria sem contato, técnica já introduzida no item 1.1.3 da tese. De uma forma mais ampla, a detecção eletroquímica engloba o uso de sensores voltamétricos, amperométricos, potenciométricos e condutométricos^[93,113] e todos foram avaliados na ampla literatura à respeito, sendo que detalhes e os avanços recentes podem ser encontrados em artigos de revisão^[93,113-115].

As primeiras aplicações da detecção amperométrica para CE em microchip surgiram no final da década de 1990^[116], com a introdução da técnica por Wang e colaboradores, e desde então, o número de trabalhos que empregam esse tipo de detecção vem aumentando a cada ano^[91-93]. Entre os substratos para a fabricação dos microchips figuram o vidro e diversos materiais poliméricos (PDMS, PMMA, etc.), e como aplicações, servem de exemplo compostos de interesse biológico e ambiental, como compostos fenólicos^[112,117], carboidratos^[118], metabolitos^[119], aminoácidos e anticorpos^[120], dentre outros^[107,115,121].

Com a detecção condutométrica sem contato para CE em microchip não foi diferente; desde 2002, quando foi demonstrada pela primeira vez por Wang e colaboradores^[122], é cada vez mais utilizada, como reportado em artigos de revisão sobre o tema^[93,113]. As aplicações abrangem a determinação de agentes químicos explosivos^[123,124], metais pesados^[125], aminas^[126], cátions e ânions inorgânicos^[127], aminoácidos e alcalóides^[128], dentre outros^[115,129].

1.6. ÁLCOOIS

As aplicações analíticas dos sistemas EC-CE-C⁴D abordadas nessa tese envolvem, principalmente, álcoois alifáticos de cadeia curta, largamente empregado em diversos ramos da indústria (farmacêutica, cosméticos, tintas, etc.) como matéria-prima e/ou solvente. Devido, principalmente, à sua importância na produção de bebidas alcoólicas (fermentadas e destiladas) e como combustível alternativo ou aditivo aos derivados de petróleo, o etanol ocupa um lugar de destaque. O etanol é eficientemente produzido a partir de biomassa, sendo no Brasil, a cana-de-açúcar, devido ao maior rendimento por área plantada, a principal matéria prima para produção em larga escala. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, tendo alcançado em 2015 o recorde de 30 bilhões de litros produzidos, conforme publicação anual da Empresa de Pesquisa Energética (Ministério de Minas e Energia)^[130].

Devido às propriedades físico-químicas dos álcoois alifáticos, a técnica mais difundida para a análise de amostras contendo essas espécies é GC com coluna capilar^[131,132], pois, em geral, possibilita a injeção sem derivatização, requer tempo de análise relativamente curto e proporciona excelente resolução e baixo limite de detecção. Alguns trabalhos realizam a determinação desses compostos por HPLC, sendo, nesses casos, principalmente devido aos sistemas de detecção utilizados, necessário realizar derivatização dos álcoois, por exemplo, inserindo um grupo cromóforo^[133,134] ou fluoróforo^[135].

Por serem neutros, álcoois alifáticos não podem ser separados por CZE, sendo necessário, por exemplo, recorrer-se a MEKC. Assim como por HPLC, devido aos detectores utilizados em CE, a derivatização para inserir um grupo cromóforo ou

fluoróforo se faz necessária, afora trabalhos que utilizam detecção indireta^[136] ou empregam detecção eletroquímica, amperométrica^[137] ou condutométrica^[61].

Álcoois alifáticos podem ser facilmente oxidados quando na presença de espécies fortemente oxidantes em meio ácido, como por exemplo, permanganato ($\text{MnO}_4^-/\text{H}^+$) ou dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}/\text{H}^+$), sendo possível, em alguns casos, realizar a determinação indireta de álcoois, e.g. o etanol^[138], com base na mudança de cor, pela redução dos íons Cr^{6+} (amarelo) para Cr^{3+} (verde) ou Cr^{2+} (violeta). Por processo eletrocatalítico, álcoois também podem ser oxidados em eletrodos metálicos, como platina, ouro, paládio, cobre e níquel polarizados positivamente. Essa propriedade favoreceu o aumento dos estudos desses compostos como alternativa aos combustíveis gasosos (p. ex., metano e hidrogênio), visando à aplicação em células combustível, principalmente pela facilidade de obtenção, manipulação e armazenamento.

Para aplicação em células combustível de álcool direto (DAFC, do inglês *Direct Alcohol Fuel Cell*), a oxidação total do álcool (conversão a CO_2) é desejada considerando a maior densidade energética obtida^[139]. A oxidação total de álcoois com mais de um átomo de carbono, p. ex., etanol, implica na quebra da ligação carbono-carbono, sabidamente difícil. Nesse contexto, por ter apenas um átomo de carbono, favorecendo a conversão total a CO_2 , o metanol tem se mostrado mais eficiente para aplicação em DAFCs^[140]. Por outro lado, devido à sua toxicidade, outros combustíveis líquidos, como etanol, têm sido avaliados como alternativa ao metanol.

A oxidação de álcoois primários em eletrodos de metais nobres, como Pt, Pd e Au, geram como produtos principais aldeídos, ácidos carboxílicos e dióxido de carbono (CO_2), enquanto que álcoois secundários formam predominantemente cetonas e CO_2 ^[141]. Dessa forma, os principais produtos da oxidação catalítica do

etanol são acetaldeído (CH_3COH) e ácido acético (CH_3COOH), com uma pequena fração sendo convertida a dióxido de carbono (CO_2), dependendo da composição do eletrólito, pH do meio^[142], temperatura, material do eletrodo e concentração do álcool^[139]. Além disso, intermediários gerados como o monóxido de carbono (CO), podem adsorver fortemente no eletrodo, levando à inativação (envenenamento) devido ao bloqueio da superfície.

Resultados semelhantes são observados com poliálcoois, por exemplo, o glicerol. Com o aumento da produção do biodiesel, quantidades elevadas de glicerol são geradas como subproduto. Apesar de o glicerol ser amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos^[143], há excedente, justificando a pesquisa de novas aplicações como o uso em células combustíveis (DAFC)^[144]. Como citado previamente, em DAFC é interessante, em termos de rendimento energético, alcançar a oxidação total do combustível, ou seja, a conversão a CO_2 , porém, a quebra da ligação C–C tem sido um desafio. Nesse contexto é importante conhecer os intermediários e produtos envolvidos na eletrooxidação do glicerol.

A eletrooxidação do glicerol em eletrodos de platina^[145], ouro e paládio^[146] pode gerar espécies neutras, como gliceraldeído e dihidroxiacetona, e iônicas ou ionizáveis (dependendo do pH), como os ácidos glicérico, tartrônico, glicólico, hidroxipirúvico, oxálico e fórmico. A análise dos intermediários e produtos da eletrooxidação do glicerol é geralmente realizada por combinação de técnicas voltamétricas com espectroscópicas, como FTIR^[144], ou de separação, como CE^[47] e HPLC^[147]. Por CE, o glicerol pode ser determinado indiretamente medindo o iodato formado por sua reação com periodato^[69,70], ou através da formação de complexo com borato em meio alcalino^[51].

2. OBJETIVOS

Como objetivo geral, buscar-se-á ampliar e aprofundar as pesquisas para aplicação analítica quantitativa da derivatização eletroquímica de compostos neutros no sistema em EC-CE-C⁴D, especialmente:

a) Avaliar melhor a influência do meio e do material de eletrodo, comparando platina e ouro em meios ácido, neutro e alcalino, buscando otimizar a eficiência e reprodutibilidade da conversão de álcoois alifáticos a carboxilatos, bem como estudar o efeito de interferentes;

b) Avaliar a possibilidade de empregar o sistema EC-CE-C⁴D para determinação simultânea de cátions, ânions e espécies neutras numa única corrida;

c) Avaliar a possibilidade de projetar e construir um sistema EC-CE-C⁴D miniaturizado, preferencialmente num único chip.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (resistividade > 18 MΩ cm) obtida em sistema de purificação Nanopure[®] (Barnstead, NH, USA). Todos os reagentes comumente utilizados em laboratório, como hidróxido de sódio, hidróxido de lítio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, nitrato de potássio, metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, n-pentanol, glicerol, e os ácidos fórmico, acético, propanóico, bórico, clorídrico (37%, m/v) e nítrico (65%, m/v) foram de grau de pureza analítica ou superior, sendo parte desses obtidos de empresas nacionais como Synth[®] ou Vetec[™]. Os reagentes mais específicos como gliceraldeído, dihidroxiacetona, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico (CHES), sacarina sódica, salicilato de metila, ácido 2[N-morfolino]etanosulfônico (MES), dopamina, catecol, histidina (His), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), Polybrene[®] e os ácidos benzóico, úrico, glicérico, hidroxipirúvico, glicólico, glioxílico, mesoxálico e tartrônico, foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI, USA) ou Merck (Darmstadt, HE, Alemanha).

3.1.1. Sistema Automatizado em Fluxo EC-CE-C⁴D

Para as corridas realizadas no sistema automatizado em fluxo EC-CE-C⁴D, solução de Tris 30 mmol L⁻¹ + HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 8,6) foi utilizada como eletrólito de corrida (BGE). Eletrólitos compostos por: HNO₃ 5 mmol L⁻¹ + HCl 1 mmol L⁻¹ (meio ácido, pH 2,3), KNO₃ 5 mmol L⁻¹ + KCl 1 mmol L⁻¹ (meio neutro, pH 6,9) e

NaOH 5 mmol L⁻¹ + NaCl 1 mmol L⁻¹ (meio alcalino, pH 11,7) foram usados para eletrooxidação dos álcoois durante a otimização do sistema. A amostra de antisséptico bucal (Listerine[®] Tartar Control) foi diluída 50 vezes no eletrólito usado para eletrooxidação, composto por HNO₃ 5 mmol L⁻¹ e HCl 1 mmol L⁻¹, pH 2,3. No início de cada dia de trabalho, os capilares foram condicionados passando NaOH 0,1 mol L⁻¹, água e BGE durante 10 minutos cada.

3.1.2. Eletroforese Capilar com dois Detectores C⁴D

Para as corridas realizadas no CE munido de dois C⁴D, H₃BO₃ 60 mmol L⁻¹ + LiOH 30 mmol L⁻¹ (pH 9,1) foi utilizado como eletrólito de corrida para separação das espécies neutras e para separação simultânea (neutros e carboxilatos no contra fluxo). Para as separações dos ácidos carboxílicos utilizando inversão de fluxo, MES 30 mmol L⁻¹ + His 30 mmol L⁻¹ (pH 6,0) foi usado como BGE, ora tratando o capilar previamente com solução de Polybrene[®] 5 % (m/m), ora adicionando CTAB (0,2 mmol L⁻¹) ao BGE. As soluções padrão contendo glicerol, gliceraldeído, dihidroxiacetona e os ácidos fórmico, glicérico, hidroxipirúvico, glicólico, glioxílico, mesoxálico e tartrônico, 1,0 mmol L⁻¹ cada, foram preparadas em NaOH 10 mmol L⁻¹. Antes de iniciar os experimentos, o capilar foi condicionado passando NaOH 0,1 mol L⁻¹, água e BGE durante 10 minutos cada.

3.1.3. Microchip de Vidro por Ablação a Laser

Nos experimentos com o microchip de vidro, Na₂HPO₄ 10 mmol L⁻¹ + SDS 0,5 mmol L⁻¹ (pH 9,0) foi utilizado como BGE. Uma solução padrão contendo

dopamina, catecol e ácido úrico, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada, foi preparada em BGE e utilizada como sistema modelo. No início de cada dia de trabalho, os canais do microchip foram condicionados passando NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, água e BGE durante 10 minutos cada.

3.1.4. Sistema Híbrido Miniaturizado EC-CE-C⁴D

No sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D, as corridas foram realizadas empregando CHES 10 mmol L^{-1} + NaOH 5 mmol L^{-1} (pH 9,2). Para eletrooxidação dos álcoois nesse sistema, HNO₃ 2 mmol L^{-1} foi usado como eletrólito de suporte. As soluções padrão de ácidos carboxílicos (metanóico, etanóico e propanóico) também foram preparadas no mesmo eletrólito de suporte. As frações do uísque de milho (*moonshine*), produzido em laboratório por fermentação seguida de destilação fracionada, foram diluídas 100 vezes no eletrólito de suporte. Algumas imagens do processo de fabricação da *moonshine* no laboratório estão disponíveis no **Anexo I**. Antes de iniciar os experimentos, o capilar foi condicionado passando NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, água e BGE durante 10 minutos cada.

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1. Sistema Automatizado em Fluxo EC-CE-C⁴D

O equipamento de eletroforese capilar^[148] que compõe o sistema EC-CE-C⁴D foi construído no próprio laboratório pelo grupo do Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago, que também desenvolveu o detector do tipo C⁴D utilizado^[149]. Para construção do

presente sistema, o equipamento de eletroforese capilar sofreu algumas modificações, por exemplo, o reservatório de eletrólito situado na parte aterrada do equipamento foi substituído por uma célula eletroquímica em fluxo^[27], como apresentado na Figura 1 (desenho esquemático fora de escala, com ênfase na célula eletroquímica). Devido aos elevados valores de tensão aplicada durante as separações eletroforéticas, um potenciostato com proteção a descargas elétricas acidentais foi construído no laboratório e acoplado ao sistema^[27] (S1, S2 e S3, na Figura 1, representam os relês responsáveis por conectar e desconectar o potenciostato durante o procedimento). O software para aquisição e controle de dados do sistema EC-CE-C⁴D foi desenvolvido no laboratório utilizando LabVIEW 8.0, National Instruments (Austin, TX, EUA). Os experimentos foram realizados utilizando capilares de sílica fundida (Agilent) com 50 µm de diâmetro interno e 45 cm de comprimento (com comprimento efetivo variável - entre 15 e 25 cm). Durante as separações, o equipamento permite aplicar até 30 kV entre as extremidades do capilar.

O sistema EC-CE-C⁴D é totalmente baseado em fenômenos eletroquímicos, tem funcionamento automatizado e as soluções são propelidas para a célula eletroquímica por microbombas solenóide. Esse sistema permite injetar no capilar alguns nanolitros de amostra colhida a poucos micrometros na interface eletrodo/solução, distância esta definida pelo ângulo de lapidação da extremidade do capilar, como descrito em trabalho do grupo^[28].

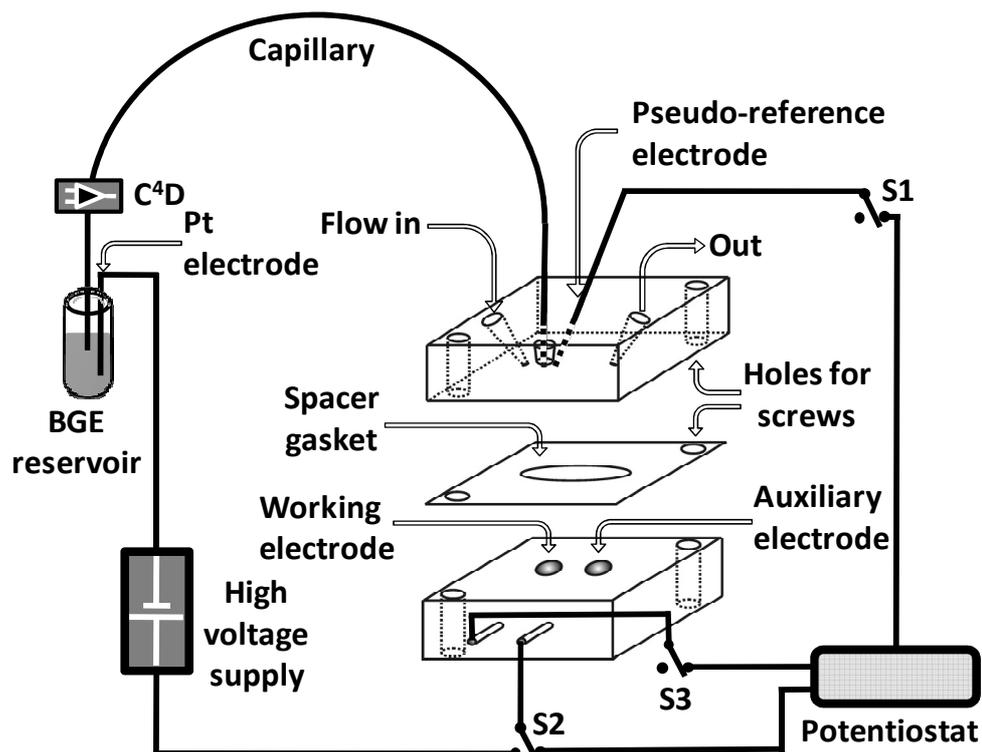


Figura 1: Esquema da célula eletroquímica em fluxo acoplada ao CE. Flow in e Out: entrada e saída de soluções, respectivamente. S1, S2 e S3: relês para chavear os eletrodos da célula eletroquímica entre controle pelo potenciostato ou somente o auxiliar pelo CE^[17].

A célula eletroquímica acoplada ao equipamento de eletroforese capilar (em destaque na Figura 1) é composta por dois blocos separados por um espaçador de 200 µm de espessura. A parte inferior é um bloco de *Kel-F* com dois eletrodos, sendo um utilizado como eletrodo de trabalho e outro como auxiliar. No presente projeto, dois blocos foram utilizados (um com eletrodos de platina e outro com eletrodos de ouro), mas em experimentos diferentes. A parte superior da célula, que foi construída no laboratório, consiste de um bloco de acrílico com um orifício para entrada do capilar, um orifício para entrada e outro para saída do fluxo de solução e um 4º orifício no qual está embutido um fio de prata recoberto por um filme de cloreto de prata, utilizado como eletrodo de referência (quase-referência). Essa célula foi anteriormente desenvolvida no próprio laboratório e está detalhadamente descrita na literatura^[48].

Para propulsão das soluções, o sistema dispõe de 3 microbombas solenóide modelo 090SP - Biochem Valve (Boonton, NJ, USA), não representadas na Figura 1. A propulsão do tampão de corrida e água é realizada, respectivamente, pelas microbombas 1 ($\mu\text{B}1$) e 2 ($\mu\text{B}2$), de volume nominal fixo de $10 \mu\text{L}/\text{pulso}$, enquanto que a microbomba 3 ($\mu\text{B}3$), de volume nominal de $5 \mu\text{L}/\text{pulso}$, é responsável pela propulsão da amostra. Tubos de Teflon de $0,5 \text{ mm}$ de diâmetro interno são utilizados para conectar as bombas à célula e aos reservatórios com as soluções. Mais detalhes sobre a instrumentação e o funcionamento do equipamento podem ser obtidos em tese de doutorado defendida por integrante do grupo^[150].

3.2.2. Eletroforese Capilar com dois Detectores C^4D

O equipamento de eletroforese capilar utilizado dispõe de dois detectores do tipo C^4D posicionados a 10 centímetros de cada extremidade do capilar. Tanto o equipamento de $\text{CE}^{[148]}$ quanto os detectores^[149] foram construídos no próprio laboratório pelo grupo do Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago. O uso de dois detectores C^4D permite realizar o monitoramento de reações químicas (ou interações) que ocorram no interior do capilar, como por exemplo, interações entre analito e modificadores de superfície (p.ex., CTAB)^[151] ou formação de espécies (p.ex., adutos) com curto tempo de meia-vida^[152]. Para as corridas eletroforéticas, utilizou-se um capilar de sílica fundida (Agilent) de $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e 60 cm de comprimento, com comprimento efetivo de 10 centímetros (primeiro detector) e 50 centímetros (segundo detector). Durante as separações, o equipamento permite aplicar até 30 kV . Para aquisição e controle de dados durante

as análises, empregou-se um software desenvolvido no nosso laboratório, empregando LabVIEW 8.0, National Instruments (Austin, TX, EUA).

3.2.3. Microchip de Vidro por Ablação a Laser

O desenvolvimento do método que permitiu a fabricação dos microchips de vidro por ablação a laser de CO₂ foi realizado durante o estágio sanduíche na Universidade de Clemson (*Clemson University – South Carolina – USA*).

Todos os canais e reservatórios foram fabricados em lâminas de vidro para microscopia com dimensões de 76,2 x 25,4 x 1,0 mm, obtidas da Propper Manufacturing Co. Inc. (Long Island, NY, USA). As estruturas a serem gravadas nas lâminas foram desenhadas em CorelDRAW® Graphics Suite X6, Corel Corporation (Ottawa, ON, Canada). Antes de realizar as ablações, uma fina e uniforme camada de parafina obtida da Pillar Candle Unscented, MVP Group International (Bentonville, AR, USA) foi depositada em ambas as faces da lâmina de vidro. Para fazer a camada inferior de parafina, 0,20 g de parafina triturada foram derretidos sobre uma lâmina de silício (*wafer*, que serviu de suporte) utilizando uma chapa de aquecimento a 70 °C. Em seguida, uma lâmina de vidro limpa foi colocada sobre a parafina derretida e pressionada com a mão contra a superfície do *wafer* para eliminar o excesso de parafina. Eventuais bolhas de ar retidas na parafina entre a lâmina de vidro e o *wafer*, foram eliminadas realizando movimentos circulares com a própria lâmina de vidro. Logo após, fundiu-se 0,40 g de parafina sobre a lâmina de vidro para formar a fina camada superior. Para esfriar a parafina, o *wafer* de silício com a lâmina parafinada foram colocados sobre a bancada em granito (plana e nivelada) durante aproximadamente 10 s, tempo suficiente para que o aspecto da

parafina mudasse de transparente para opaco, sinalizando a solidificação (temperatura inferior a 60 °C). A uniformidade da camada de parafina também pode ser visualmente inspecionada pela coloração da parafina. Imagens da lâmina de vidro com parafina, antes e após a ablação usando a gravadora a laser de CO₂ estão disponíveis no **Anexo II**. A disposição das camadas (lâmina de vidro, parafina e *wafer* de silício) do substrato pronto para ser gravado, pode ser melhor compreendida no desenho esquemático representado, em detalhe, na Figura 2.

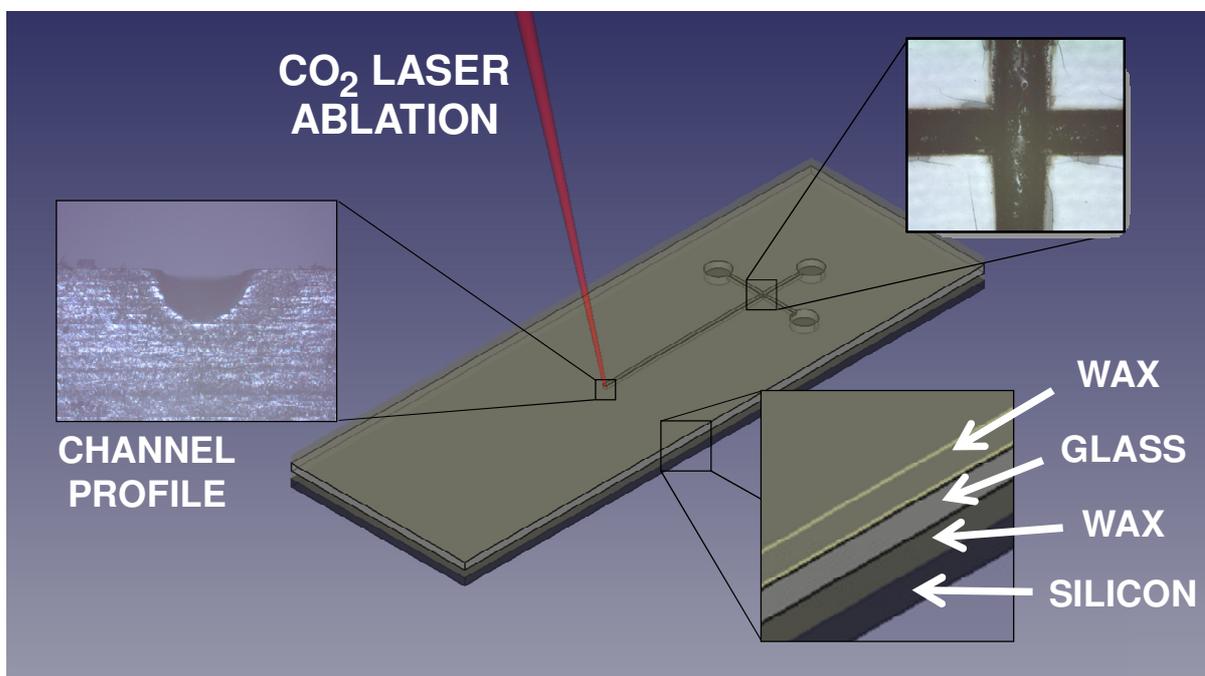


Figura 2: Desenho esquemático da fabricação do microchip de vidro por ablação a laser de CO₂. Em detalhe: visualização do perfil semicircular do canal (channel profile), cruzamento utilizado para injeção da amostra e ampliação da borda mostrando as camadas dos materiais empregados durante a ablação (silicon: wafer de silício, wax: parafina e glass: lâmina de vidro)^[12].

Todas as ablações foram realizadas usando uma gravadora/cortadora a laser de CO₂ *Mini 24* (30 W) obtida da Epilog Laser Systems (Golden, CO, USA) provida com laser no comprimento de onda de 10,6 µm e sistema automático de foco para delimitar a distância da superfície da peça (no modo manual, o equipamento também permite a usinagem fora da distância focal). Esse instrumento possui um conjunto de espelhos e lentes acopladas a braços mecânicos móveis para que o

feixe do laser percorra, por reflexão e focalização, a superfícies das peças nas regiões desejadas (semelhante a um *plotter*). Ele possui dois modos de ablação, o vetorial (usado para realizar cortes e gravar canais), com velocidade máxima dos braços de 90 mm s^{-1} e o *raster* (usado para fazer rebaixos nas peças), com velocidade máxima de 2200 mm s^{-1} . Um desenho esquemático do processo de gravação da lâmina de vidro utilizando laser de CO_2 , mostrando em detalhe a disposição das camadas dos materiais, o perfil semicircular do canal obtido e o cruzamento utilizado para injeção da amostra, é apresentado na Figura 2.

Os canais com aproximadamente $400 \mu\text{m}$ de largura e $70 \mu\text{m}$ de profundidade usados para injeção e separação no microchip foram fabricados usando a gravadora a laser no modo vetorial com 80 % de potência e 10 % de velocidade, enquanto que os furos de 3 mm de diâmetros usados para fazer os reservatórios foram cortados no modo vetorial com 100 % de potência e 2 % de velocidade (com 5 passes consecutivos). Todas as ablações foram realizadas com a distância focal do feixe do laser ajustado $0,5 \text{ mm}$ abaixo da superfície do vidro. Para injeção da amostra, os canais dos reservatórios da amostra e descarte da amostra foram desenhados com configuração "T duplo". A distância entre esses dois canais, que define a zona de amostra (ou *plug* de amostra) foi $500 \mu\text{m}$, correspondendo a um volume de $3,5 \text{ nL}$ de amostra no canal central (canal de separação). O comprimento total do canal de separação foi 5 cm , sendo $4,5 \text{ cm}$ o comprimento efetivo.

Para fabricar os microchips, os vidros gravados foram limpos (lavagem com isopropanol) e selados permanentemente contra uma manta de PDMS ($0,25 \text{ mm}$ de espessura) usando um *Plasma Cleaner* PDC-32G da Harrick (Ithaca, NY, USA). Para conferir sustentação mecânica e evitar deformação dos canais (ao passar solução sob pressão pelo microchip), a manta de PDMS foi previamente selada

contra uma lâmina de vidro não gravada. O processo de separação das espécies^[112] foi monitorado por detecção amperométrica no fim do canal (*end channel*)^[105,117,120]. Como demonstrado na Figura 3, um fio de ouro de 25 μm de diâmetro (identificado por Au), posicionado ao fim do canal de separação, na intersecção com o reservatório de descarte, foi usado como eletrodo de trabalho. Um fio de prata e outro de platina (0,5 mm de diâmetro), posicionados no reservatório de descarte, foram usados como eletrodos de pseudo-referência e auxiliar, respectivamente (não aparecem na Figura 3). Uma imagem do microchip de vidro em funcionamento, com todos os eletrodos posicionados e identificados, está disponível no **Anexo III**. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados empregando um potenciostato *Electrochemical Analyzer CHI 810B*, CH Instruments (Austin, TX, USA). Uma imagem do microchip obtido nas condições especificadas é apresentada na Figura 3.

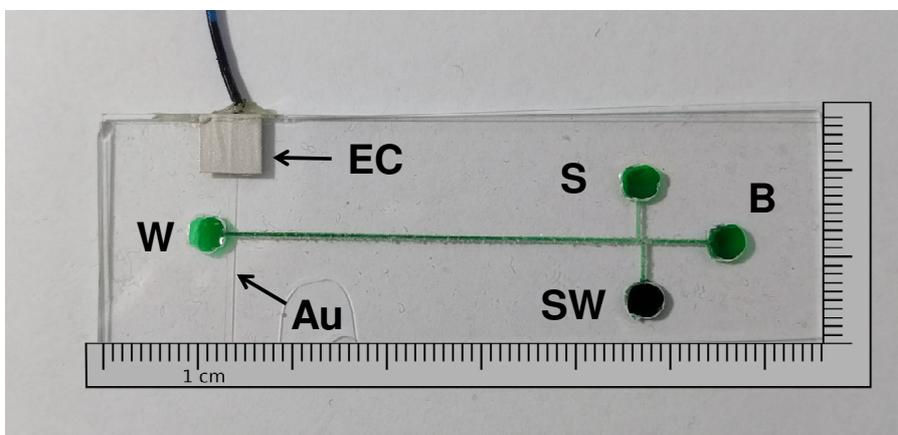


Figura 3: Imagem de um microchip de vidro produzido por ablação a laser de CO_2 de uma lâmina de microscópio recoberta com parafina. Os canais e reservatórios foram preenchidos com corante alimentício verde (solução 5 %). Au- eletrodo de trabalho (fio de ouro de 25 μm de diâmetro), EC- contato elétrico feito com fio de cobre e cola de prata, W- reservatório de descarte, B- reservatório do BGE, S- reservatório da amostra e SW- reservatório de descarte da amostra^[112].

Para realizar a mobilização (injeção) da amostra e separação dos analitos, uma fonte de alta tensão automatizada *HVS448 High Voltage Sequencer*, com 8 canais, obtida da LabSmith (Livermore, CA, USA) foi utilizada. Um microscópio

óptico (LEXT™ OLS 4000) da Olympus® (Center Valley, PA, USA) foi usado para obter as imagens 3D e realizar as medições de largura, profundidade e rugosidade dos canais (lente com aumento 20 x). Para obter as imagens dos reservatórios e dos canais, foi usado um microscópio BX41M da Olympus (Center Valley, PA, USA) com aumento de 25 x, acoplado a uma câmera (Infinity 1), controlado por software.

3.2.4. Sistema Híbrido Miniaturizado EC-CE-C⁴D

A miniaturização do sistema EC-CE-C⁴D foi realizada durante o estágio sanduíche na Universidade de Clemson (*Clemson University – South Carolina – USA*).

O desenho esquemático do sistema híbrido EC-CE-C⁴D é apresentado na Figura 4A. O sistema é composto de (i) uma célula eletroquímica utilizada para realizar a derivatização eletroquímica dos analitos, injeção da amostra e semi-célula anódica durante as separações eletroforéticas (indicada como *electrochemical cell* na Figura 4A); (ii) um capilar de sílica fundida de 15 cm de comprimento e 50 µm d.i. (indicado como *capillary* na Figura 4A); (iii) um detector condutométrico sem contato (indicado como C⁴D na Figura 4A); (iv) um reservatório de descarte também usado como semi-célula catódica durante as separações (indicado com *WR* na Figura 4A); (v) uma fonte de alta tensão para eletroforese em microchip; e (vi) um potenciostato para controle dos potenciais aplicados na célula eletroquímica. A fonte de alta tensão e o potenciostato não aparecem na Figura. Imagens do sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D, com os eletrodos posicionados e identificados, estão disponíveis no **Anexo IV**.

Como apresentado na Figura 4B, a célula eletroquímica é composta por três partes: dois paralelepípedos em PMMA (15 x 15 x 3 mm) com um furo central (2 mm de diâmetro) para fixar o tubo Tygon[®] (2 mm d.e. e 0,3 mm d.i.). Na peça frontal, o tubo é usado para segurar o capilar de sílica fundida (0,36 mm d.e.), enquanto que na de fundo é utilizada para fixar o eletrodo de trabalho (fio de ouro de 0,5 mm de diâmetro); a terceira parte, a peça do meio, foi cortada em forma de “U” como mostrado na Figura 4B. Quando vista por cima, a parte interna do “U” possui a forma de um quadrado de 10 x 10 mm. As peças foram seladas com clorofórmio para se obter o reservatório.

Como pode ser observado na Figura 4A, o reservatório de descarte e semi-célula catódica (indicado como *WR*) foi construído da mesma maneira que a célula eletroquímica, porém, apenas umas das peças (a frontal) possui o furo com o tubo Tygon[®], que nesse caso é usado para fixar o capilar. As peças de PMMA foram cortadas usando uma cortadora a laser de CO₂ comercial *Mini 24* de 30 W de potência, obtida da Epilog Laser Systems (Golden, CO, USA). Dois fios, sendo um de platina (0,5 mm de diâmetro) e outro de prata (0,5 mm de diâmetro), foram usados como eletrodos auxiliar e pseudo-referência, respectivamente (não mostrados na Figura 4). Imagens do sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D e da célula eletroquímica, com os eletrodos posicionados e identificados, estão disponíveis no **Anexo IV**. Após a eletrooxidação dos álcoois, os eletrodos auxiliar e pseudo-referência são removidos da célula eletroquímica e substituídos pelo eletrodo para realizar a injeção eletrocínética e a separação eletroforética. Os desenhos esquemáticos das Figura 4B e C detalham, respectivamente, a montagem da célula eletroquímica e a ponta do capilar (lapidada em bisel) tocando o eletrodo de trabalho. Essa estratégia de polir o capilar em ângulo para definir uma distancia

fixa entre a ponta do capilar e a superfície do eletrodo de trabalho foi demonstrada previamente pelo grupo de pesquisa do orientador desse trabalho [27,28]. Além disso, essa estratégia permitiu pela primeira vez, realizar análises quantitativas por EC-CE^[48], superando a falta de reprodutibilidade devido ao reposicionamento do capilar.

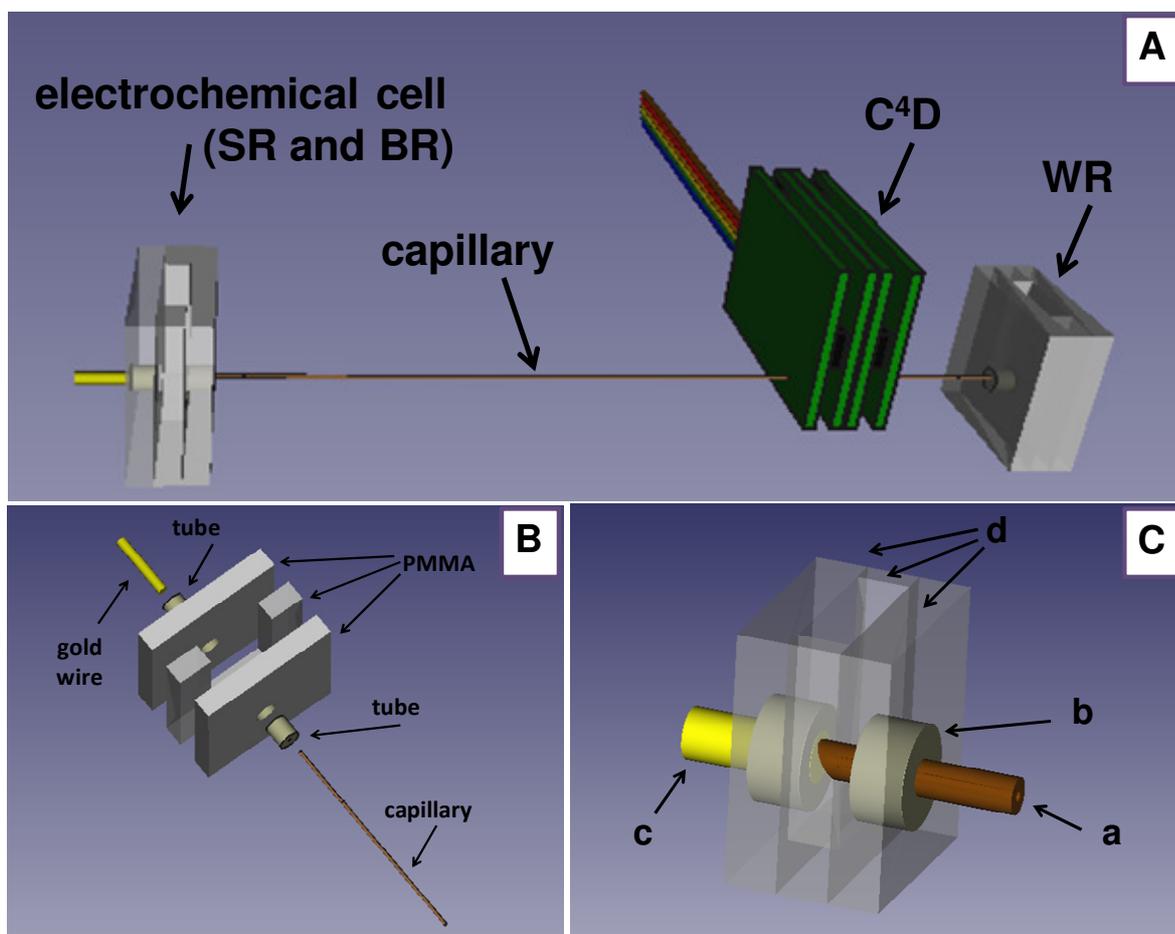


Figura 4: Desenho esquemático do sistema híbrido EC-CE-C⁴D (A). Desenho esquemático da montagem da célula eletroquímica para derivatização (B) e mostrando a ponta do capilar (polida em ângulo) tocando o eletrodo de trabalho (C). a- capilar de sílica fundida (50 μm d.i.), b- tubo de Tygon[®], c- eletrodo de trabalho (fio de ouro com 0,5 mm de diâmetro), d- célula eletroquímica construída em PMMA, BR- reservatório do tampão, SR- reservatório da amostra, WR- reservatório de descarte e C⁴D- detector condutométrico sem contato^[153].

As separações foram realizadas empregando um capilar de sílica fundida (Agilent) de 50 μm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento (com 12 cm de comprimento efetivo). Para realizar a separação e mobilização da amostra (injeção eletrocínética), utilizou-se uma fonte de alta tensão de 8 canais, *HVS448 High*

Voltage Sequencer, LabSmith (Livermore, CA, USA), controlada por computador. Para aplicar e controlar os potenciais utilizados durante os processos de eletrooxidação dos analitos, um potenciostato *Electrochemical Analyzer CHI 810B*, CH Instruments (Austin, TX, USA) foi empregado. Imagens da interface dos software usados para controlar o potenciostato e a fonte de alta tensão estão disponíveis no **Anexo IV**.

3.3. PROCEDIMENTO

3.3.1. Sistema Automatizado em Fluxo EC-CE-C⁴D

Inicialmente, através da μ B1, 0,2 mL (vazão 0,2 mL min⁻¹) do tampão de corrida são bombeados pela célula eletroquímica. Aplicando aproximadamente 5 kPa, durante 20 s, no reservatório situado na extremidade oposta à célula eletroquímica, todo o capilar do CE é preenchido com tampão (armazenado no reservatório do CE). Em seguida, 0,1 mL (vazão 0,2 mL min⁻¹) de água deionizada são propelidos pela μ B2 para lavagem da célula. Em casos onde se deseja explorar a estratégia de pré-concentração por *stacking*, ainda nessa etapa, um *plug* de água pode também ser injetado no capilar, previamente ao processamento e injeção da amostra, como já demonstrado em trabalhos do grupo^[28]. Posteriormente, através da μ B3, 0,2 mL (vazão 1 mL min⁻¹) da amostra são bombeados pela célula eletroquímica. A eletrooxidação das espécies, nesse caso, álcoois, é promovida aplicando um potencial constante, durante determinado tempo. Após a etapa de eletrooxidação, a amostra é injetada no CE aplicando pressão negativa no reservatório situado na extremidade oposta à célula eletroquímica, durante 3 s, e em

seguida 0,3 mL (vazão 1 mL min⁻¹) do tampão são bombeados através da célula eletroquímica. Finalmente, um potencial de 30 kV (670 V cm⁻¹) é aplicado com o objetivo de separar e detectar as espécies catiônicas e aniônicas presentes na amostra, assim como os produtos iônicos formados durante a oxidação. Para comutar entre padrões e amostras, recorreu-se a uma válvula solenóide multicanal; para operar ininterruptamente com muitas amostras, bastaria acoplar um trocador automático de amostras.

O software desenvolvido possibilita programar um número ilimitado de corridas, variando parâmetros como tempo e potencial de oxidação. Isso permite a automação da análise e facilita realizar estudos por longos períodos, como por exemplo, para otimização de condições, avaliação de repetibilidade e calibração.

Durante a etapa de eletrooxidação dos álcoois, os potenciais aplicados são referenciados *versus* Ag/AgCl_{quase-referência}, que consiste em um fio de prata recoberto com um filme de cloreto de prata^[48]. Uma vez que a célula utilizada no sistema EC-CE-C⁴D é de camada delgada, existe uma queda de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de quase-referência, ou seja, o produto iR não compensado pelo potenciostato, que varia de acordo com o meio, a magnitude da corrente e a área do eletrodo utilizado. Apesar da correção do potencial (*versus* Ag/AgCl_{KCl 3M}) não ter sido feita para alguns experimentos em que se optou por reportar o potencial *versus* Ag/AgCl_{quase-referência}, esse procedimento pode ser realizado como demonstrado na Dissertação de Mestrado^[154].

3.3.2. Eletroforese Capilar com dois Detectores C⁴D

Inicialmente, aproximadamente 1,5 mL de eletrólito de corrida são colocados nos dois reservatórios do CE. O capilar é preenchido com BGE reduzindo a pressão no reservatório situado na extremidade oposta ao ponto de injeção. Em seguida, o reservatório situado do lado da injeção é substituído por um reservatório contendo amostra e aplica-se 5 kPa durante 3 s para introdução de uma alíquota no capilar. Após injeção, o reservatório da amostra é retirado, retornando o reservatório contendo BGE e a corrida é realizada ligando a fonte de alta tensão, sendo, nesse caso, 30 kV aplicados entre os eletrodos nas extremidades do capilar (500 V cm⁻¹).

3.3.3. Microchip de Vidro por Ablação a Laser

Durante as análises, todos os reservatórios são preenchidos com 20 µL de solução, sendo o reservatório da amostra (S) preenchido com amostra e cada um dos outros reservatórios (tampão (B), descarte (W) e descarte da amostra (SW)) preenchido com BGE. A injeção da amostra foi realizada no modo *pullback*, aplicando +700, +200 e +800 V nos reservatórios B, SW e S, respectivamente, enquanto que durante a separação eletroforética, os potenciais aplicados foram +1100, +850 e +850 V, respectivamente. O reservatório de descarte permaneceu aterrado durante todas as etapas. O potencial aplicado para detecção amperométrica é +0,8 V, condição já definida em trabalhos publicados pelo grupo do Prof. Dr. Carlos D. Garcia^[112,117,155].

3.3.4. Sistema Híbrido Miniaturizado EC-CE-C⁴D

Inicialmente, o reservatório do descarte (WR) é preenchido BGE enquanto o reservatório do tampão/amostra (SR/BR) é preenchido com 50 µL da amostra. Em seguida, os eletrodos auxiliar e pseudo-referência são posicionados na célula eletroquímica e aplica-se o potencial desejado no eletrodo de trabalho, durante o tempo necessário para promover a eletrooxidação dos álcoois, sendo que, nesses estudos, avaliou-se de 1,2 a 1,5 V (vs. Ag) durante 60 s. Posteriormente, os eletrodos (auxiliar e pseudo-referência) são removidos da célula e os eletrodos de platina são posicionados (um em cada reservatório). Em seguida, uma fração da amostra derivatizada é injetada eletrocineticamente no capilar aplicando 3 kV no reservatório WR durante 4 s, mantendo o SR/BR aterrado. Após a injeção, a amostra é removida por sucção (usando uma micropipeta) e o reservatório SR/BR é preenchido com 50 µL de BGE. Finalmente, a separação é iniciada aplicando 3 kV entre as extremidades do capilar (200 V cm^{-1}). Para evitar contaminação ou efeito de memória durante consecutivas análises, por serem a amostra e o BGE alocados no mesmo reservatório, cada troca de solução é feita em duplicata, ou seja, o compartimento é lavado e condicionado com uma alíquota de 50 µL, renovada em seguida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. APLICAÇÃO DO SISTEMA EC-CE-C⁴D PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CÁTIOS, ÂNIOS E ESPÉCIES NEUTRAS

Durante o desenvolvimento do projeto de mestrado^[154], mostrou-se a possibilidade de empregar o sistema EC-CE-C⁴D para realizar determinação quantitativa de álcoois primários após conversão eletroquímica nos respectivos carboxilatos. Aproveitando as condições que se mostraram satisfatórias para essa aplicação^[48], BGE composto por Tris 30 mmol L⁻¹ + HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 8,6) e HNO₃ 5 mmol L⁻¹ + HCl 1 mmol L⁻¹ (pH 2,3) como eletrólito para eletrooxidação, avaliou-se a possibilidade de realizar determinação simultânea de cátions, ânions (no contra fluxo) e espécies neutras (detectadas após derivatização eletroquímica) empregando o sistema EC-CE-C⁴D. Para fazer a demonstração do novo conceito, o antisséptico bucal (Listerine[®] Tartar Control) foi escolhido como amostra real^[17].

De acordo com o fabricante, o antisséptico bucal Listerine[®] Tartar Control é uma solução aquosa contendo ácido benzóico e benzoato de sódio, sacarina sódica, etanol, salicilato de metila, mentol, eucaliptol, n-propanol, timol, sorbitol, fluoreto de sódio, sucralose, aroma, corantes azuis e um surfactante não iônico (poloxâmero 407). A concentração desses componentes não está descrita no rótulo dos produtos comercializados no Brasil e a formulação pode variar de um país para o outro.

4.1.1. Análise das Espécies Iônicas Presentes na Formulação

Das espécies presentes na formulação, o íon sódio pode ser facilmente determinado por CE-C⁴D e, por possuir uma maior mobilidade que o co-íon presente no tampão de corrida (Tris⁺), o sinal previsto corresponde a um pico positivo no eletroferograma. No tampão utilizado Tris/Cl⁻ (pH 8,6), o benzoato (pKa 4,08) e a sacarina (pKa 4,83) encontram-se ionizados, permitindo a separação e detecção por CE-C⁴D em contra fluxo vez que possuem mobilidade inferior à do EOF e são arrastados até o detector. O benzoato e a sacarina possuem uma mobilidade menor que o co-íon do BGE (Cl⁻), dessa forma, um pico negativo (vale) é esperado no eletroferograma para esses ânions. Mais detalhes sobre os fundamentos e mecanismos de detecção do C⁴D podem ser obtidos em trabalhos disponíveis na literatura^[35,36]. Apesar de presente na formulação, o íon fluoreto não foi detectado, pois, por possuir mobilidade superior à do EOF nessas condições, não é deslocado no sentido do detector. Um eletroferograma da injeção da amostra sem derivatização é apresentado na Figura 5. Os picos foram identificados por fortificação com padrões (*spiking*) e baseando-se no tempo de migração das espécies obtido em simulação no PeakMaster 5.3 Complex[®].

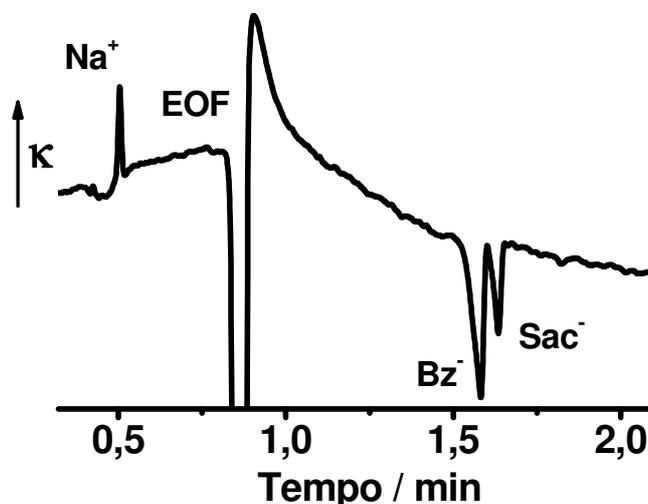


Figura 5: Eletroferograma obtido pela injeção da amostra de Listerine diluída 50 vezes em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} . Capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i., 45 cm de comprimento (20 cm efetivo), potencial de separação: 30 kV , tempo de injeção: 5 s , tampão de corrida: 30 mmol L^{-1} Tris / 10 mmol L^{-1} HCl . Na^+ : sódio, EOF: fluxo eletrosmótico, Bz^- : benzoato e Sac^- : sacarinato.

4.1.2. Análise das Espécies Neutras após Derivatização

Sem realizar a derivatização eletroquímica, apenas sinais para os ânions benzoato e sacarinato são observados nos eletroferogramas, como apresentado na Figura 6 (curva EC OFF). Após a etapa de eletrooxidação, os picos negativos do etanoato (oxidação do etanol) e pentanoato (oxidação do n-pentanol usado como padrão interno) também são observados (curvas $1,54$ e $1,67 \text{ V}$). Os potenciais aplicados durante a etapa de eletrooxidação foram referenciados vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{KCl } 3\text{M}}$. O uso de um padrão interno neutro eletrooxidável como o n-pentanol foi descrito anteriormente para correção de eventuais variações nas condições experimentais durante a oxidação eletroquímica^[48] e, por não está presente nessa amostra, foi escolhido para essa aplicação. A pequena perturbação na linha de base após o pico do etanoato corresponde ao bicarbonado (HCO_3^-) presente na amostra e no BGE. A

presença do bicarbonato nas soluções pode ser atribuída à dissolução de CO_2 do ar, ou mesmo, do CO_2 produzido durante a eletrooxidação dos álcoois, que no pH do meio, 8,6, encontra-se majoritariamente na forma de HCO_3^- . Um segundo padrão interno para correção dos sinais do sódio, benzoato e sacarinato não foi necessário devido à alta repetibilidade de todas as etapas controladas pelo *software*, incluindo a de injeção no capilar (a redução de pressão durante a injeção foi estabilizada por 20 cm de coluna d'água). Alguns eletroferogramas obtidos sem (EC OFF) e com (1,54 e 1,67 V) eletrooxidação da amostra são apresentados na Figura 6.

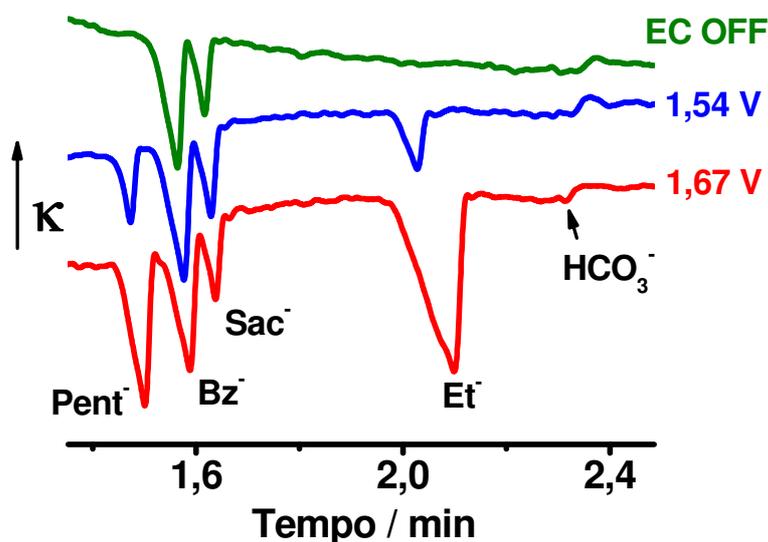


Figura 6: Eletroferogramas sem (EC OFF) e com derivatização da amostra diluída 50 vezes em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} , com adição de 10 mmol L^{-1} de *n*-pentanol (padrão interno) na solução final. Potencial de oxidação: 1,54 e 1,67 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{, \text{KCl } 3\text{M}}$. Tempo de oxidação: 60 s. Capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i., 45 cm de comprimento (20 cm efetivo), potencial de separação: 30 kV, tempo de injeção: 5 s, tampão de corrida: 30 mmol L^{-1} Tris / 10 mmol L^{-1} HCl. Pent⁻: pentanoato, Bz⁻: benzoato, Sac⁻: sacarinato, Et⁻: etanoato e HCO_3^- : bicarbonato^[17].

Além do sódio, sacarina (na forma de sacarinato) e benzoato, todas as outras espécies presentes na formulação são neutras no pH do tampão, sendo que o etanol e o *n*-propanol podem ser convertidos a etanoato e propanoato, respectivamente, por derivatização eletroquímica^[48]. Como apresentado na Figura 6, o etanoato foi

efetivamente separado e detectado utilizando essa estratégia, mas o propanoato não foi detectado mesmo em menor diluição da amostra (diluída 10 vezes ao invés de 50 vezes). Duas hipóteses poderiam justificar não ter sido observado o pico correspondente ao n-propanol, a co-migração do propanoato com alguma espécie presente na amostra ou sua presença em concentração inferior ao LD da técnica nessas condições. Dessa maneira, optou-se por adicionar 10 mmol L^{-1} de n-propanol na amostra diluída 50 vezes e, após a derivatização eletroquímica, um pico bem resolvido foi obtido para o propanoato. Apesar de, na formulação descrita no rótulo do produto constar n-propanol como ingrediente, a concentração presente não é informada, e, na formulação brasileira, é provavelmente inferior à faixa relatada numa Patente (0,5 a 0,75 % de n-propanol em massa)^[156]. Eletroferogramas obtidos com e sem derivatização eletroquímica após fortificação da amostra (diluída 50 vezes) com 10 mmol L^{-1} de n-propanol e n-pentanol são apresentados na Figura 7.

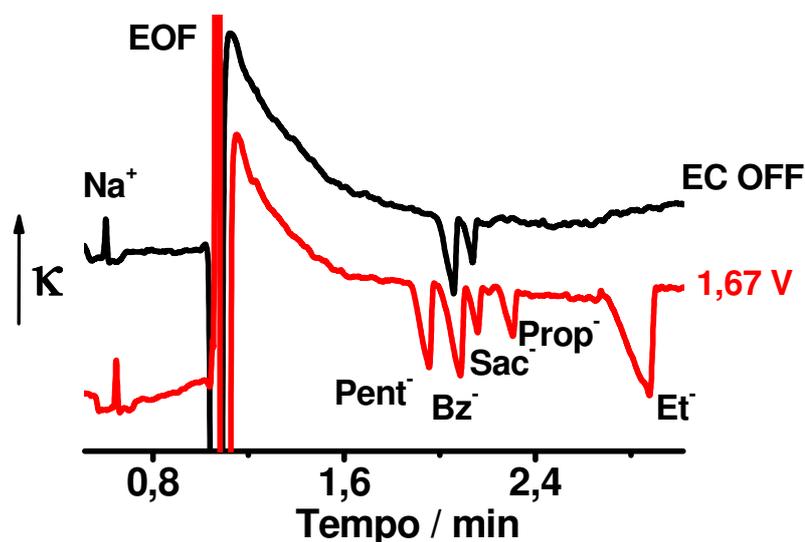


Figura 7: Eletroferogramas com (1,67 V) e sem (EC OFF) derivatização eletroquímica da amostra diluída 50 vezes em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} , como adição de 10 mmol L^{-1} de n-propanol e n-pentanol (padrão interno). Potencial de oxidação: 1,67 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl } 3\text{M}}$. Tempo de oxidação: 60 s. Capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i., 45 cm de comprimento (25 cm efetivo), potencial de separação: 30 kV, tempo de injeção: 5 s, tampão de corrida: 30 mmol L^{-1} Tris / 10 mmol L^{-1} HCl. Na^+ : sódio, Pent^- : pentanoato, Bz^- : benzoato, Sac^- : sacarinato, Prop^- : propanoato (spiking de n-propanol) e Et^- : etanoato.

Salicilato de metila também pode ser medido na forma de salicilato após hidrólise alcalina. A concentração presente na amostra diluída 50 vezes foi inferior ao limite de detecção, e um pico bem resolvido foi obtido após fortificação da amostra com salicilato de metila, seguida de hidrólise pela adição de NaOH (10 mmol L^{-1} na solução final). Ao analisar a amostra menos diluída, p. ex. 10 vezes, observou-se redução gradual no fluxo eletroosmótico após consecutivas injeções, provavelmente devido à acumulação de surfactantes adsorvidos na parede do capilar. Isso deve ser evitado por exigir uma frequente regeneração do capilar. Outros ingredientes presentes na formulação são difíceis de eletrooxidar para formar espécies ionizáveis no potencial aplicado. Em potenciais mais elevados, além da formação de O_2 , outras espécies como metanoato (formiato) e CO_2 são formadas, porém, uma vez que, mais de um álcool pode gerar ambas as espécies em condições mais extremas, não é possível fazer uma relação quantitativa direta entre essas espécies e a concentração do analito de interesse.

4.1.3. Variação do Potencial Aplicado para Derivatização

O conjunto de eletroferogramas apresentados na Figura 8 mostra o efeito da variação do potencial aplicado durante a derivatização. A fração de etanol convertido em etanoato aumenta significativamente entre 1,47 V e 1,67 V, enquanto do pentanol convertido em pentanoato aumenta no intervalo de 1,47 V a 1,60 V. Os ganhos na sensibilidade e limite de detecção para os álcoois em potenciais mais altos foram acompanhados por alargamento na base do pico, mas sem comprometer a resolução entre o pentanoato e o benzoato nas concentrações testadas. Em 1,74 V a eletrólise da água já ocorre em escala suficiente para ocasionar eventual

formação de bolhas de oxigênio dentro da célula eletroquímica, reduzindo a área ativa do eletrodo e, em casos extremos, interrompendo o filme de líquido no canal, com conseqüente perda do controle de potencial pelo potenciostato. Os potenciais de 1,50 ou 1,54 V são apropriados para a análise vez que o ganho de sensibilidade em 1,67 V, referente à conversão de etanol em etanoato, é dispensável dada à concentração relativamente alta de etanol na formulação. Como se observa, o potencial de derivatização é um parâmetro facilmente ajustável que proporciona certo grau de controle sobre a sensibilidade de diferentes espécies, mas nem sempre na ordem desejada, sendo o presente caso um exemplo favorável. Todos os potenciais aplicados durante a etapa de eletrooxidação foram referenciados vs. Ag/AgCl,_{KCl} 3M.

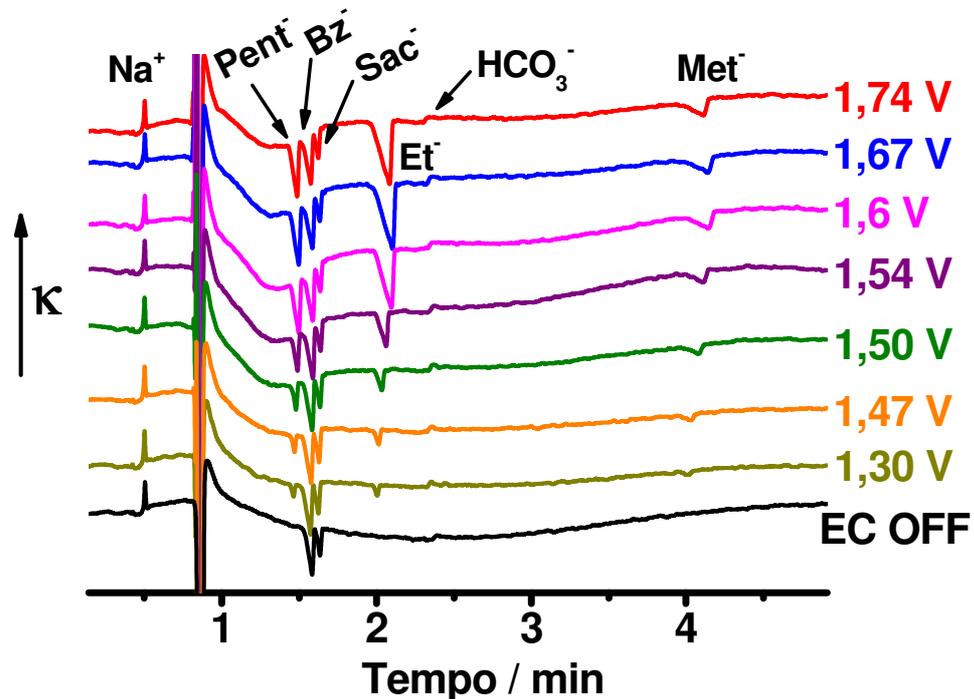


Figura 8: Conjunto de eletroferogramas da amostra diluída 50 vezes em HNO₃ 5 mmol L⁻¹ / HCl 1 mmol L⁻¹, como adição de 10 mmol L⁻¹ de n-pentanol (padrão interno), variando o potencial aplicado (vs. Ag/AgCl,_{KCl} 3M) durante a derivatização eletroquímica para determinação simultânea de cátions, ânions e espécies neutras por EC-CE-C⁴D. Na⁺: sódio, Pent: pentanoato, Bz: benzoato, Sac: sacarinato, Et: etanoato, HCO₃⁻: bicarbonato e Met: metanoato^[17]. Todos os parâmetros são semelhantes aos descritos na Figura 7.

A amostra do antisséptico bucal diluída 50 vezes (com adição de n-pentanol como padrão interno) foi eletrooxidada em diferentes potenciais e os dados obtidos da área dos picos de cada espécie presente na amostra em função do potencial de derivatização são apresentados na Figura 9. Os sinais correspondentes aos carboxilatos apresentam crescimento com perfil sigmoidal tendendo a um patamar, como esperado em voltametria. Independentemente da altura dos patamares, os potenciais à meia altura são semelhantes para o pentanoato, o etanoato e o metanoato, indicando que a determinação direta por voltametria seria inviável. A separação e detecção de espécies neutras, como por exemplo, n-pentanol, etanol e metanol, não seria exequível por CE-C⁴D. O sucesso foi alcançado somente com a conjugação das três técnicas eletroquímicas, voltametria ou, mais precisamente, microeletrólise a potencial controlado, eletroforese capilar e condutometria sem contato.

Além do crescimento das áreas dos picos dos carboxilatos com o potencial aplicado, especialmente acima de 1,5 V, notou-se ligeira atenuação das áreas de pico das espécies iônicas da amostra, como pode ser observado na Figura 9. Em potenciais de eletrooxidação suficientemente altos, o benzoato e a sacarina podem ser oxidados a CO₂ e/ou produtos intermediários, como por exemplo, metanoato e salicilato no caso do benzoato, ou outras espécies não iônicas indetectáveis. Especulação semelhante não se aplica, todavia, aos íons de sódio, cujo pico também apresentou decréscimo de cerca de 5 % entre o patamar observado até 1,50 V e o patamar acima de 1,55 V.

Uma mudança menor na forma do pico e na linha de base ajustada para a integração do pico do sódio foi observada experimentalmente na presença de mais produtos de eletrólise, possivelmente devido à mudança na condição de *stacking* do

plug da amostra durante a separação eletroforética. Uma pequena diminuição de concentração de íons sódio próximo ao eletrodo devido à sua migração, afastando-se do anodo durante a eletrólise, poderia também influenciar a quantidade de sódio injetada no capilar, se bem que o transporte de carga por migração na solução é realizado majoritariamente pelos íons H^+ presentes no eletrólito em pH 2,3.

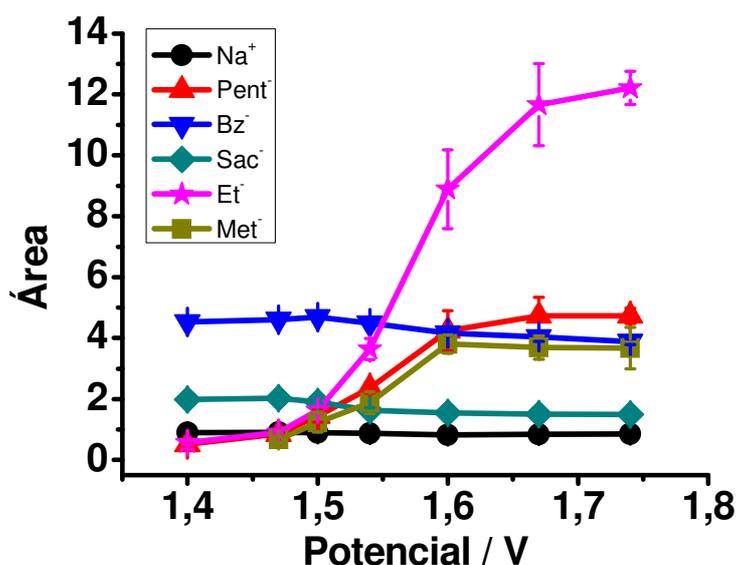


Figura 9: Variação do sinal dos analitos (área dos picos) em função do potencial aplicado durante a derivatização eletroquímica para a análise da amostra de Listerine® Tartar Control diluída 50 vezes. Condições do experimento semelhantes as da Figura 7^[17].

Uma vez que o potencial de derivatização para uma amostra é escolhido e mantido constante, a curva de calibração para cada analito é pouco afetada, exceto quando a concentração de um analito apresenta grande variação, p. ex., antisséptico bucal alcoólico *versus* não-alcoólico. Nesta situação o uso de adição de padrão interno para as espécies iônicas é indispensável, além da adição de n-pentanol (padrão interno) para corrigir os analitos derivatizados.

Embora a avaliação da determinação quantitativa de todas as espécies detectáveis no antisséptico não tenha sido realizada, curvas analíticas para benzoato, sacarinato e etanoato (etanol) foram obtidas visando cobrir a faixa de

concentração aproximada dessas espécies na amostra. As características do método obtidas para benzoato, sacarinato e etanoato estão sumarizadas na Tabela 1. A estabilidade do eletrodo durante repetidas análises, nessas condições, não foi avaliada, contudo, espera-se que o comportamento do sistema EC-CE-C⁴D para a quantificação dessas espécies não difira muito da análise de álcool em cerveja, demonstrada recentemente^[48], na qual a avaliação da repetibilidade durante 40 sucessivas determinações não mostrou decréscimo no sinal que indicasse gradual inativação do eletrodo.

Tabela 1: Coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para benzoato, sacarinato e etanoato. O desvio padrão (s) do ruído da linha base foi de 0,00057 u.a.

	Coeficiente angular da curva de calibração (u.a. mmol ⁻¹ L)	Coeficiente de correlação (R)	LD (mmol L ⁻¹) (3 x S _{ruído}) / a (0,00171) / a	LQ (mmol L ⁻¹) (10 x S _{ruído}) / a (0,0057) / a	Faixa de conc. avaliada (mmol L ⁻¹)
Benzoato	0,194	0,999	0,009	0,029	0,05 - 0,20
Sacarinato	0,168	0,995	0,010	0,034	0,02 - 0,10
Etanoato	0,0316	0,997	0,054	0,180	5,0 - 75,0

4.1.4. Eletrooxidação de Outros Componentes da Amostra

Em adição ao efeito do potencial de derivatização nos sinais do etanoato e pentanoato, um pico correspondente ao metanoato foi observado, aparecendo 4 minutos após injeção (Figura 8). Devido à sua elevada toxicidade, obviamente metanol não é um ingrediente da amostra, ou um contaminante detectável no antisséptico bucal alcoólico. O metanoato parece então ter se formado a partir da quebra de ligação carbono-carbono ou carbono-oxigênio (éster) de algum ingrediente da amostra, com possível geração de intermediários como metanol e metanal. Dessa maneira, procurou-se identificar qual substância poderia produzir metanol (convertido a metanoato após derivatização eletroquímica) ou metanoato durante a etapa de eletrooxidação.

O salicilato de metila presente na formulação poderia ser o responsável, uma vez que, em hidrólise alcalina, produz salicilato e metanol^[157,158]. Contudo, além da baixa concentração desse ingrediente na formulação, o antisséptico bucal é uma solução ácida (pH em torno de 3,9) e o eletrólito usado durante a etapa de eletrooxidação também é ácido (pH 2,3), desfavorável à hidrólise em extensão significativa. Apesar disso, uma solução de salicilato de metila $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} foi avaliada no sistema EC-CE-C⁴D em três condições: sem (EC OFF) eletrooxidação e aplicando 1,50 e 1,67 V durante 60 s. Os eletroferogramas obtidos são apresentados na Figura 10. Como pode ser observado, mesmo sob condição mais extrema, 1,67 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl } 3\text{M}}$, não aparece sinal referente ao metanoato.

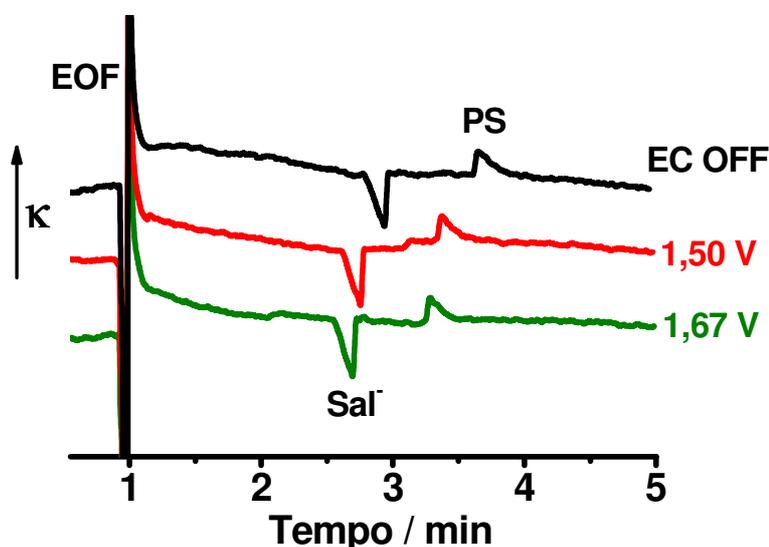


Figura 10: Eletroferogramas obtidos para salicilato de metila $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} sem (EC OFF) e com eletrooxidação aplicando 1,50 e 1,67 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl } 3\text{M}}$ durante 60 s. Todos os parâmetros são semelhantes aos descritos na Figura 7.

Dando continuidade, uma solução de sacarina sódica $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} foi avaliada sem (EC OFF) e com eletrooxidação, aplicando 1,47, 1,54 e 1,67 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl } 3\text{M}}$ usando o sistema EC-CE-C⁴D. Em

condições fortemente oxidantes, como na presença de radicais hidroxila^[159], alguns ácidos carboxílicos, como por exemplo, os ácidos fórmico, maléico e oxálico podem ser formados a partir da oxidação da sacarina. Contudo, assim como observado para solução de salicilato de metila, nenhum sinal correspondendo a metanoato apareceu nos eletroferogramas registrados após eletrooxidação do sacarinato nas condições experimentais utilizadas. Um conjunto de eletroferogramas obtido em cada condição é apresentado na Figura 11.

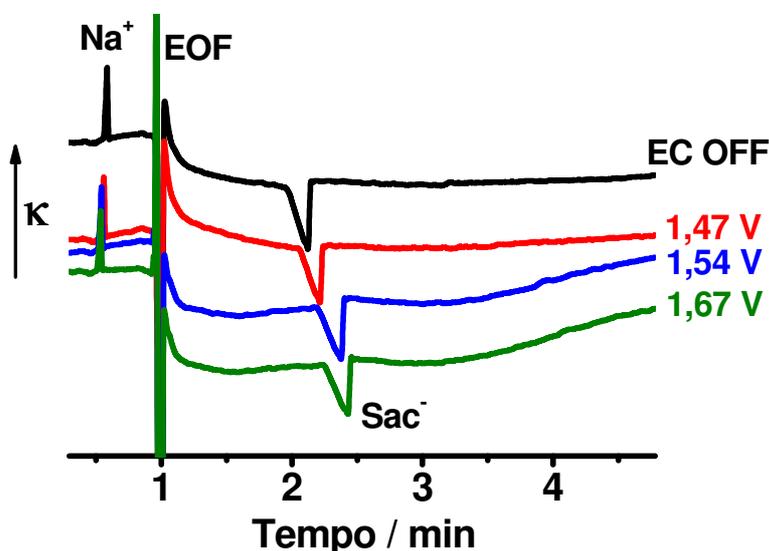


Figura 11: Eletroferogramas obtidos para sacarinato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} sem (EC OFF) e com eletrooxidação aplicando 1,47, 1,54 e 1,67 V vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl } 3\text{M}}$ durante 60 s. Todos os parâmetros são semelhantes aos descritos na Figura 7.

Visto que a eletrooxidação de sacarina sódica ou de salicilato de metila não deu indícios da formação de metanoato avaliou-se solução de ácido benzóico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} sem (EC OFF) e com eletrooxidação aplicando 1,50 e 1,67 V empregando o sistema EC-CE-C⁴D. Na primeira condição de eletrooxidação, 1,50 V, observou-se um sinal em 3,5 minutos, que poderia corresponder ao metanoato. Dessa maneira, ampliou-se o leque de

valores de potencial aplicados para eletrooxidação do benzoato para 1,47, 1,50, 1,54, 1,60, 1,67 e 1,74 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{, \text{KCl } 3\text{M}}$).

Como apresentado na Figura 12, os eletroferogramas obtidos após eletrooxidação da solução de benzoato apresentaram sinal atribuído ao metanoato a partir de 1,47 V (identificação realizada através do tempo de migração e fortificação da solução padrão com metanol).

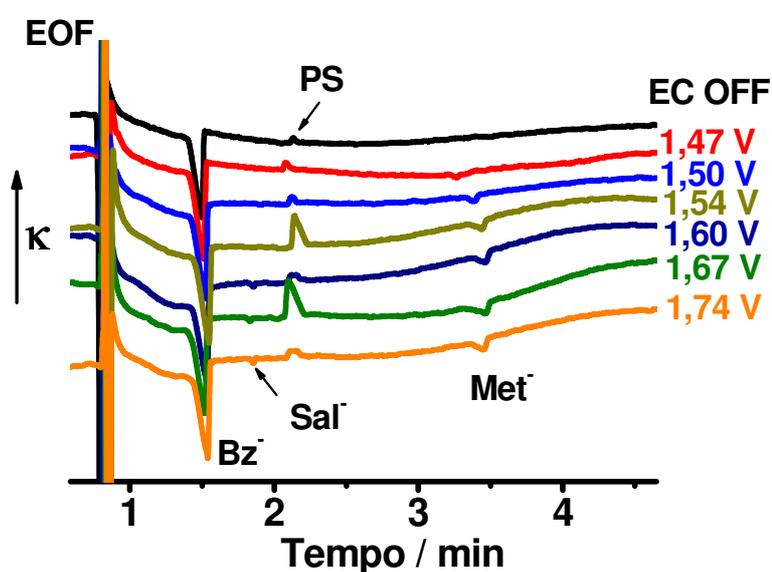


Figura 12: Eletroferogramas obtidos para benzoato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} sem (EC OFF) e com eletrooxidação aplicando 1,47, 1,50, 1,54, 1,60, 1,67 e 1,74 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{, \text{KCl } 3\text{M}}$ durante 60 s. Todos os parâmetros são semelhantes aos descritos na Figura 7.

Trabalhos reportados na literatura empregaram um equipamento de HPLC acoplado com uma célula eletroquímica para estudar espécies solúveis geradas durante eletrooxidação do ácido benzóico sobre eletrodos de diamante dopado com boro^[160]. Nessas condições, traços de ácido salicílico, ácido 2,5-hidroxibenzóico e hidroquinona foram detectados. Empregando espectrometria de massas, CO_2 foi reportado como o principal produto volátil para oxidação irreversível do ácido benzóico adsorvido em eletrodos de platina policristalina em meio ácido^[161]. Embora

volátil, o ácido fórmico não foi detectado, provavelmente devido à produção não significativa nessas condições.

Como pode ser observado na Figura 13, além da formação de metanoato durante a eletrooxidação do benzoato em 1,67 V, uma ampliação da região em torno de 1,8 min no eletroferograma (Figura 13B) revela um pico quase imperceptível após derivatização eletroquímica. Esse pico pode corresponder ao salicilato (baseando-se no tempo de eletromigração de um padrão de salicilato), indicando que uma pequena quantidade de ácido salicílico é formada não só em eletrodos de diamante dopado com boro, mas também em platina^[160]. Uma identificação conclusiva do pico do salicilato ainda é necessária, no entanto, os resultados iniciais mostram a potencialidade do sistema EC-CE-C⁴D para realização desse tipo de pesquisa. Adicionalmente, a variação do sinal obtido para os picos identificados como salicilato e metanoato em função do potencial aplicado para derivatização eletroquímica é apresentado na a Figura 13A e C, respectivamente.

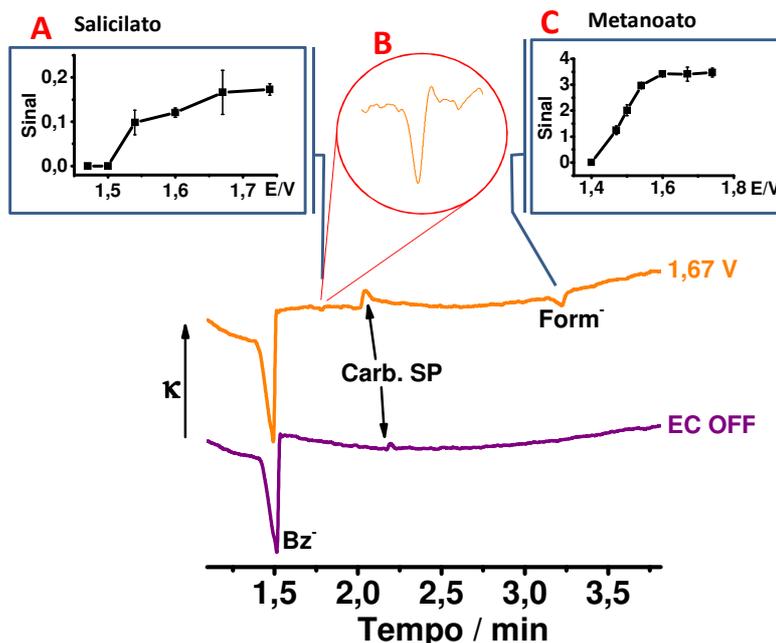


Figura 13: Comparação de eletroferogramas obtidos para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido benzóico em $\text{HNO}_3 \text{ } 5 \text{ mmol L}^{-1} / \text{HCl } 1 \text{ mmol L}^{-1}$ sem derivatização eletroquímica (EC OFF) e após 60 s de eletrooxidação à 1,67 V. A – Variação no sinal do salicilato com o potencial de derivatização. B – Ampliação do sinal do salicilato. C – Variação no sinal do metanoato com o potencial de derivatização^[17]. Condições semelhantes as da Figura 7.

4.2. OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EC-CE-C⁴D

Baseando-se na literatura consultada^[139,141,142,162-164] e nos estudos voltamétricos realizados durante o mestrado^[154], definiu-se o eletrodo de platina em meio ácido ($\text{HNO}_3 \text{ } 5 \text{ mmol L}^{-1} + \text{HCl } 1 \text{ mmol L}^{-1}$) como melhor condição a ser explorada. Esse trabalho pioneiro demonstrou a quantificação de álcoois primários por CE convencional, medindo os respectivos carboxilatos gerados durante a eletrooxidação^[48]. Utilizando as condições que se mostraram satisfatórias para essa aplicação, foi possível demonstrar, pela primeira vez, a separação simultânea de cátions, ânions (no contra fluxo) e espécies neutras (após derivatização eletroquímica)^[17].

Mesmo sendo constante e reprodutível sobre platina policristalina polida, a eficiência da conversão eletroquímica dos álcoois nos respectivos carboxilatos foi relativamente baixa nas condições utilizadas, em torno de 16%. Esses resultados motivaram a retomada dos estudos nesta tese visando à otimização da conversão de álcoois aos seus respectivos carboxilatos. Para tanto, avaliou-se a eficiência em eletrodos policristalinos polidos de ouro e de platina nos meios ácido, neutro e alcalino.

4.2.1. Eletrooxidação dos Álcoois em Eletrodo de Platina

Como os estudos iniciais para conversão eletroquímica dos álcoois foram realizados empregando eletrodo de platina em meio ácido e se mostraram satisfatórios para a aplicação proposta^[48,154], utilizou-se essa condição para comparação com as outras avaliadas. Um conjunto de eletroferogramas obtidos no sistema EC-CE-C⁴D para oxidação de uma solução padrão contendo 1 mmol L⁻¹ dos álcoois (etanol, n-propanol, n-butanol e n-pentanol) em meio ácido, variando o potencial aplicado durante a eletrooxidação, é apresentado na Figura 14A.

No gráfico com as áreas dos picos em função do potencial aplicado (Figura 14B), observa-se um aumento da área dos picos até 1,50 V, decrescendo para valores mais elevados de potencial. Essa diminuição do sinal pode estar associada, provavelmente, à ocupação parcial do eletrodo de trabalho por microbolhas de O₂, observáveis mesmo a “olho nu”. Por apresentar sinal de maior magnitude, 1,5 V foi definido como melhor potencial para oxidação dos álcoois em platina em meio ácido.

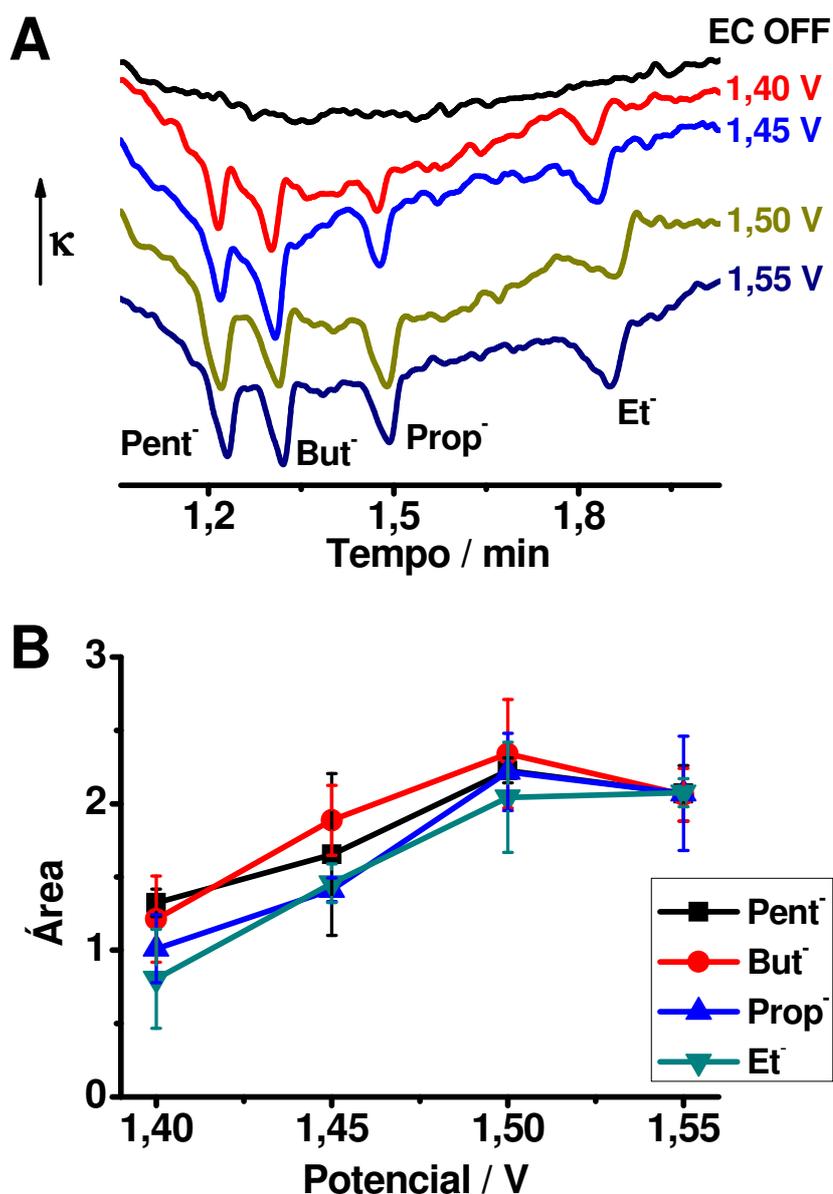


Figura 14: (A) Variação do potencial aplicado para oxidação duma solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de platina (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do potencial aplicado. Eletrólito de oxidação: HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} . Tempo de oxidação: 50 s, tempo de injeção: 2 s (5 kPa). Potencial de separação: 30 kV. Pent⁻: pentanoato, But⁻: butanoato, Prop⁻: propanoato, Et⁻: etanoato. Comprimento do capilar: 45 cm (20 ± 2 cm efetivo), tampão de corrida: Tris 30 mmol L^{-1} / HCl 10 mmol L^{-1} .

Após definir o potencial para oxidação, avaliou-se a influência do tempo de eletrólise. Um conjunto de eletroferogramas obtidos durante a eletrooxidação dos álcoois, aplicando 1,5 V, é apresentado na Figura 15A. Para as áreas de todos os picos em função do tempo verifica-se na Figura 15B um aumento até 45 segundos,

seguido de estabilização ou decréscimo. Esse comportamento pode estar associado ao progressivo esgotamento do álcool na camada delgada de solução, difusão do ácido carboxílico já formado e/ou consumo deste por gradual oxidação à CO_2 . Sendo assim, adotou-se 45 segundos como melhor tempo de oxidação em eletrodo de platina e meio ácido.

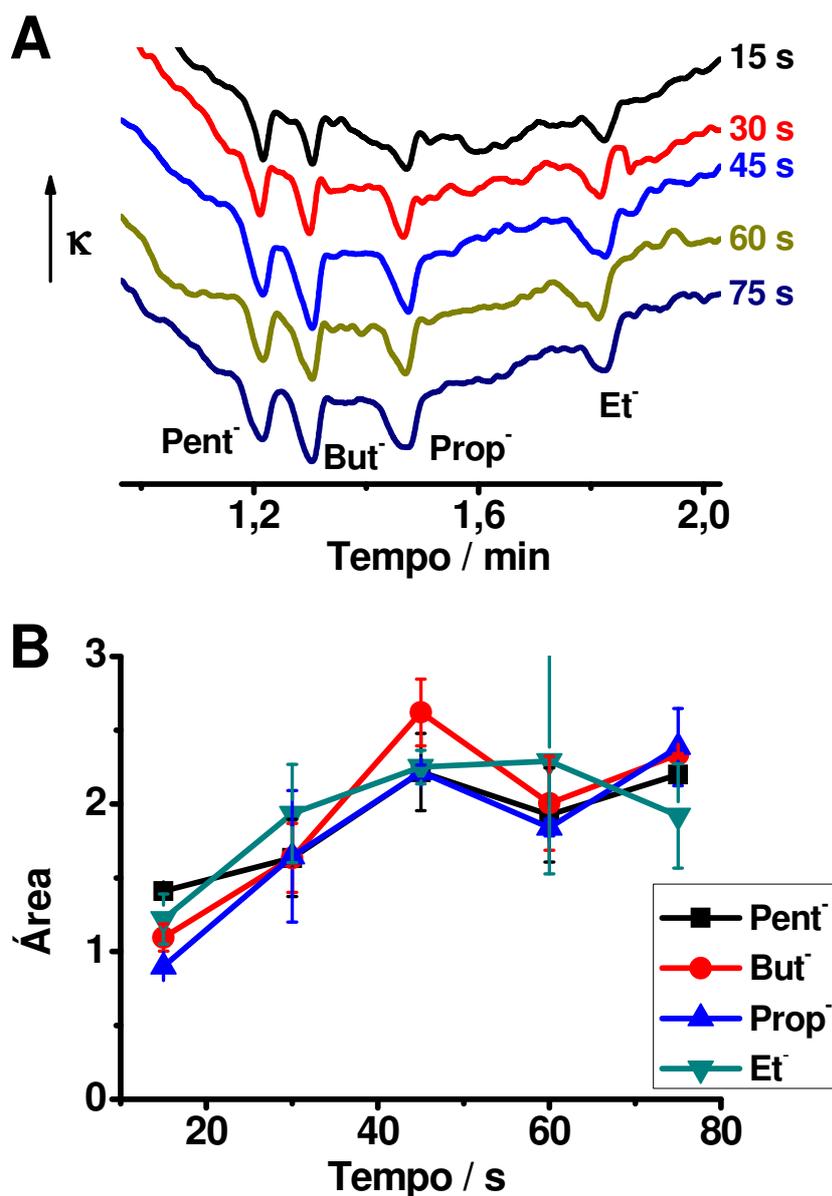


Figura 15: (A) Variação do tempo de oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de platina. (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do tempo de oxidação. Eletrólito de oxidação: HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} . Potencial de oxidação: $1,50 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{quase-referência}}$). Outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 14.

Mesmo sendo raramente utilizado para estudos de oxidação catalítica de álcoois, o meio neutro também foi avaliado. Estudos da eletrooxidação de álcoois primários, como etanol, em função do pH da solução, indicam aumento da intensidade de corrente com o aumento do pH do meio^[142]. Isso pode ser atribuído ao aumento da disponibilidade de íons OH⁻, adsorvidos na superfície do eletrodo, responsáveis por fornecer o oxigênio extra, necessário para oxidação do álcool até espécies dioxigenadas, como ácido carboxílico e CO₂^[162], propiciando transferência, ao eletrodo, de maior quantidade de elétrons por molécula. Os sinais observados para os carboxilatos gerados após eletrooxidação apresentaram menor intensidade que em meio ácido, indicando menor rendimento na obtenção dessas espécies de interesse. Um conjunto de eletroferogramas para oxidação em meio neutro a diversos potenciais é apresentado na Figura 16A. Assim como observado em meio ácido, as curvas das áreas dos picos crescem em função do potencial aplicado (Figura 16B) até 1,50 ou 1,55 V, mantendo-se ou decrescendo em potenciais mais altos.

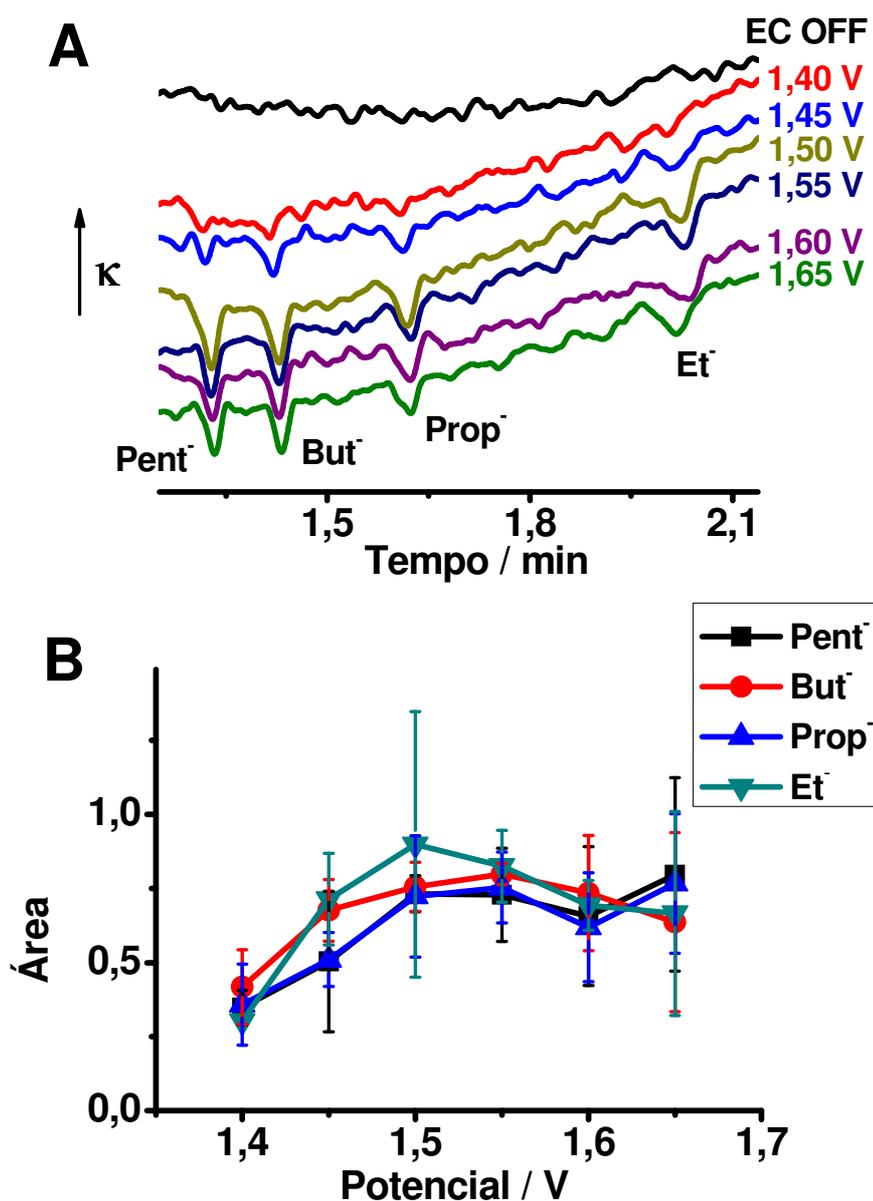


Figura 16: (A) Variação do potencial aplicado para oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de platina (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do potencial aplicado. Eletrólito de oxidação: KNO_3 5 mmol L^{-1} / KCl 1 mmol L^{-1} . Tempo de oxidação: 50 s. Outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 14.

Diferentemente do observado em meio ácido, ao construir uma curva da área dos sinais obtidos para os ácidos carboxílicos (Figura 17A) em função do tempo de eletrólise a 1,5 V, observa-se um crescimento linear até o limite estudado de 90 segundos, o que permite realizar a eletrólise por períodos mais longos, aumentando o rendimento (Figura 17B). Contudo, nas mesmas condições, as áreas

dos picos obtidas em meio neutro em 90 s correspondem a não mais que aproximadamente 60 % das áreas obtidas em meio ácido em 50 s de eletrólise.

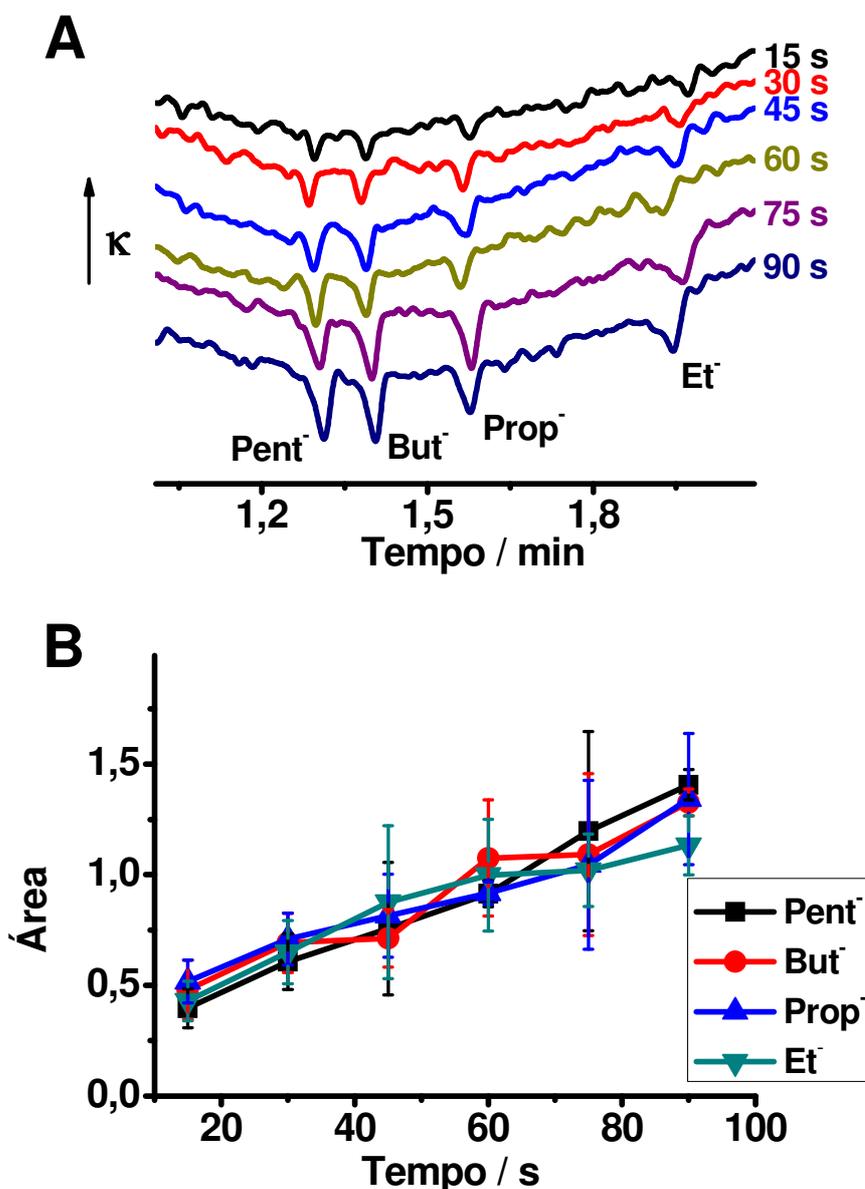


Figura 17: (A) Variação do tempo de oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de platina. (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do tempo de oxidação. Eletrólito de oxidação: KNO_3 5 mmol L^{-1} / KCl 1 mmol L^{-1} . Potencial de oxidação: $1,50 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{quase-referência}}$). Outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 14.

Platina tem se mostrado um eficiente catalisador para oxidação de pequenas moléculas orgânicas como etanol^[139,141,142,162,164-168]. Voltamogramas cíclicos registrados em meio alcalino mostram que a intensidade de corrente possui magnitude superior (em torno de 5 vezes) à observada em meio ácido^[142]. Isso pode

estar associado à diminuição da sobretensão, facilitando a oxidação de intermediários adsorvidos e a quebra da ligação C-C^[164], aumentando a fração convertida a CO₂, que pode gerar seis ou três vezes a quantidade de elétrons envolvida na oxidação do etanol a aldeído ou a ácido carboxílico, respectivamente^[139]. Além disso, o potencial de oxidação dos álcoois é antecipado, provavelmente devido à melhor estabilização dos íons H⁺ (gerados durante a oxidação) pelos íons OH⁻ do meio, como pode ser observado para o etanol^[154]. Porém, mesmo em meio alcalino, a quebra da ligação C-C é difícil, sendo ainda significativa a fração convertida ao ácido carboxílico^[142].

Apesar das expectativas favoráveis advindas dos voltamogramas cíclicos, a eletrooxidação dos álcoois em meio alcalino apresentou menor rendimento em carboxilatos que em meio neutro ou ácido, ao menos nas condições em que os eletroferogramas da Figura 18 foram obtidos, ou seja, em eletrólito composto de NaOH 5 mmol L⁻¹ e NaCl 1 mmol L⁻¹. Nota-se que, em estudos voltamétricos, a concentração de eletrólito de suporte é, geralmente, mais elevada do que em EC-CE, sendo valores típicos da ordem de 50 a 100 vezes a concentração do analito. Isso permite trabalhar em valores de pH mais elevados (ao menos uma unidade maior), sendo que, mudanças de fração de unidade de pH podem causar alterações significativas nos processos eletrocatalíticos^[142].

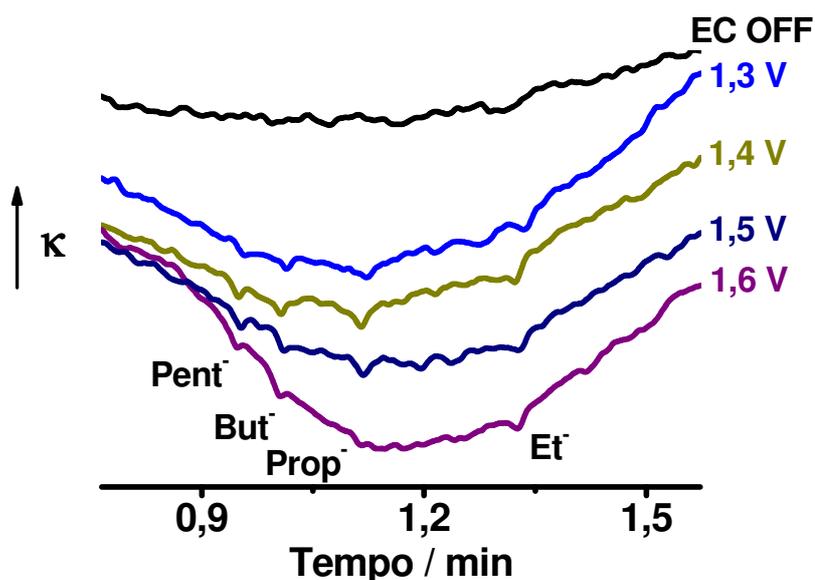


Figura 18: Variação do potencial aplicado para oxidação duma solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de platina (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). Eletrólito de oxidação: $\text{NaOH } 5 \text{ mmol L}^{-1} / \text{NaCl } 1 \text{ mmol L}^{-1}$. Tempo de oxidação: 50 s. Outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 14.

4.2.2. Eletrooxidação dos Álcoois em Eletrodo de Ouro

Apesar de possuir eficiência inferior à platina para eletrooxidação de pequenas moléculas orgânicas, como etanol, ouro tem sido investigado como catalisador em meio ácido e alcalino^[142]. Através de estudos voltamétricos é possível observar baixa densidade de corrente para eletrooxidação de etanol em meio ácido, porém em meio alcalino, a magnitude da corrente obtida chega ser uma ordem de grandeza maior^[142].

Por serem os estudos de caráter investigativos, o meio ácido foi avaliado para eletrooxidação dos álcoois, mesmo conhecendo a baixa atividade quando comparada a experimentos realizados em meio alcalino, como descrito na literatura^[142]. Um conjunto de eletroferogramas obtidos para eletrooxidação dos álcoois é apresentado na Figura 19A. Os resultados obtidos mostraram quantidade significativa dos carboxilatos e desfavorecimento da conversão dos álcoois de maior

cadeia em potencial mais elevado. Colocando o sinal obtido em função potencial aplicado (Figura 19B), observou-se aumento na área dos picos até 1,55 V, exceto para o pentanoato, que também apresenta deformação do pico. Sendo assim, 1,50 V foi definido como potencial para investigação do tempo de eletrólise.

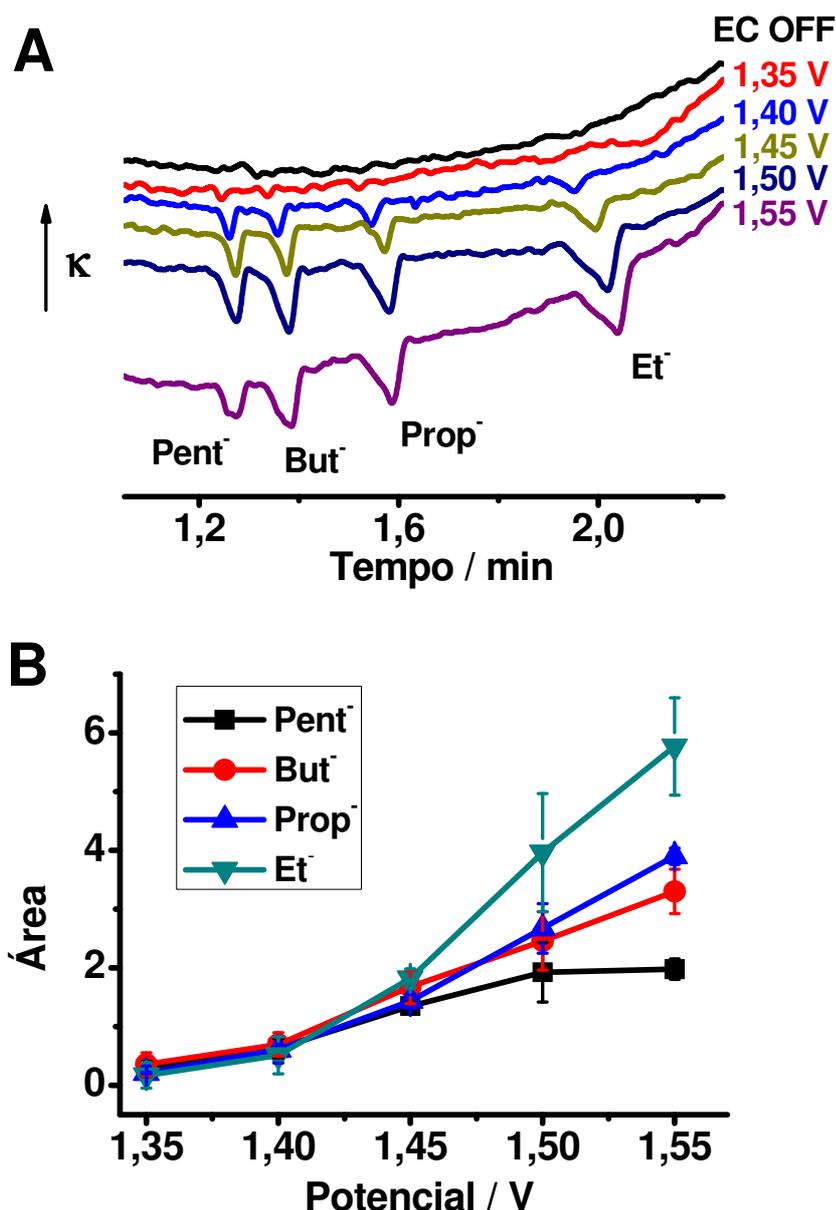


Figura 19: (A) Variação do potencial aplicado para oxidação duma solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de ouro (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do potencial aplicado. Eletrólito de oxidação: HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} . Tempo de oxidação: 50 s. Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 14.

Mantendo constante o potencial aplicado (1,50 V), avaliou-se o efeito da variação do tempo de eletrólise na formação dos ácidos carboxílicos a partir dos álcoois (Figura 20A). Uma curva da área dos picos em função do potencial (Figura 20B) mostrou aumento do sinal de todos os carboxilatos até 75 segundos de eletrólise, sendo que em tempos maiores, uma leve diminuição do sinal foi observada, afora para o etanoato. Esse decréscimo pode estar associado ao esgotamento do álcool na camada delgada de solução e consumo do ácido carboxílico já formado por gradual oxidação à CO_2 , sendo, aparentemente, a oxidação do etanol à etanoato favorecida (frente à oxidação dos outros álcoois) nessas condições. Dessa forma, 75 segundos representa a escolha mais satisfatória para oxidação dos álcoois em meio ácido nas condições dadas.

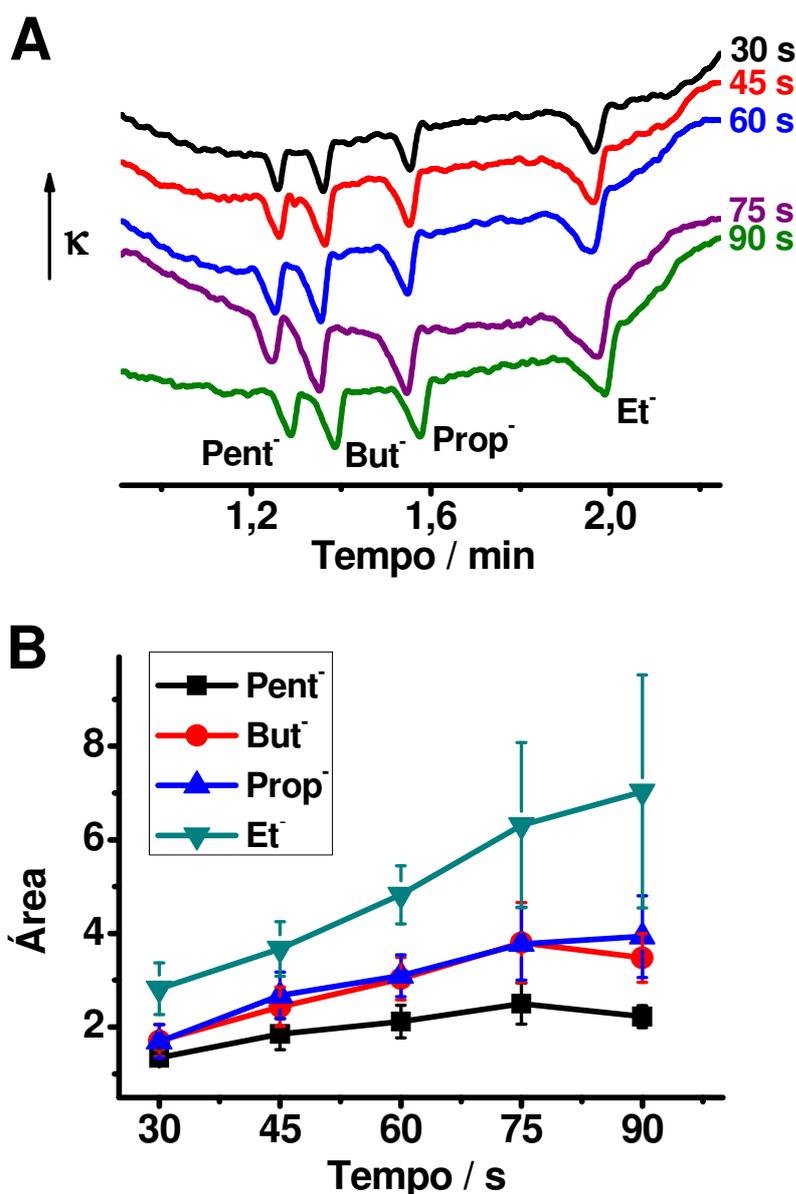


Figura 20: (A) Variação do tempo de oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de ouro. (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do tempo de oxidação. Eletrólito de oxidação: HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} . Potencial de oxidação: $1,50 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). Outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 14.

Embora um número elevado de trabalhos tenha estudado a oxidação eletrocatalítica do etanol em eletrodos metálicos, como ouro e platina, inclusive monocristalinos^[139,141,142,162,164-168], raríssimos são os que abordam o efeito da composição do meio, sendo que, os que visam um estudo mais amplo do pH, empregam geralmente tampão fosfato^[142]. Apesar do meio neutro ser raramente utilizado para estudos de oxidação catalítica de álcoois, no presente trabalho

avaliou-se também essa condição, empregando eletrólito de suporte composto por KNO_3 e KCl (usado para estabilizar o potencial do eletrodo de quase-referência, por manter constante a concentração de íons cloreto na solução). A Figura 21A mostra um conjunto de eletroferogramas obtidos, variando o potencial aplicado durante a eletrólise. Constata-se que em meio neutro foi possível realizar a oxidação dos álcoois em potenciais mais elevados que em meio ácido sem observar deformação nos picos ou instabilidade na linha de base. Mesmo em potenciais maiores, as alturas dos picos nos eletroferogramas obtidos em meio neutro foram inferiores às alcançadas em meio ácido, porém, o mesmo perfil de intensidades relativas (aumentando dos álcoois de cadeia maior para os de cadeia menor) foi observado. Um gráfico da área do pico em função do potencial aplicado (Figura 21B) mostrou um aumento dos sinais até 1,50 V, certo decréscimo em 1,55 V e valores constantes até o maior potencial examinado, 1,65 V.

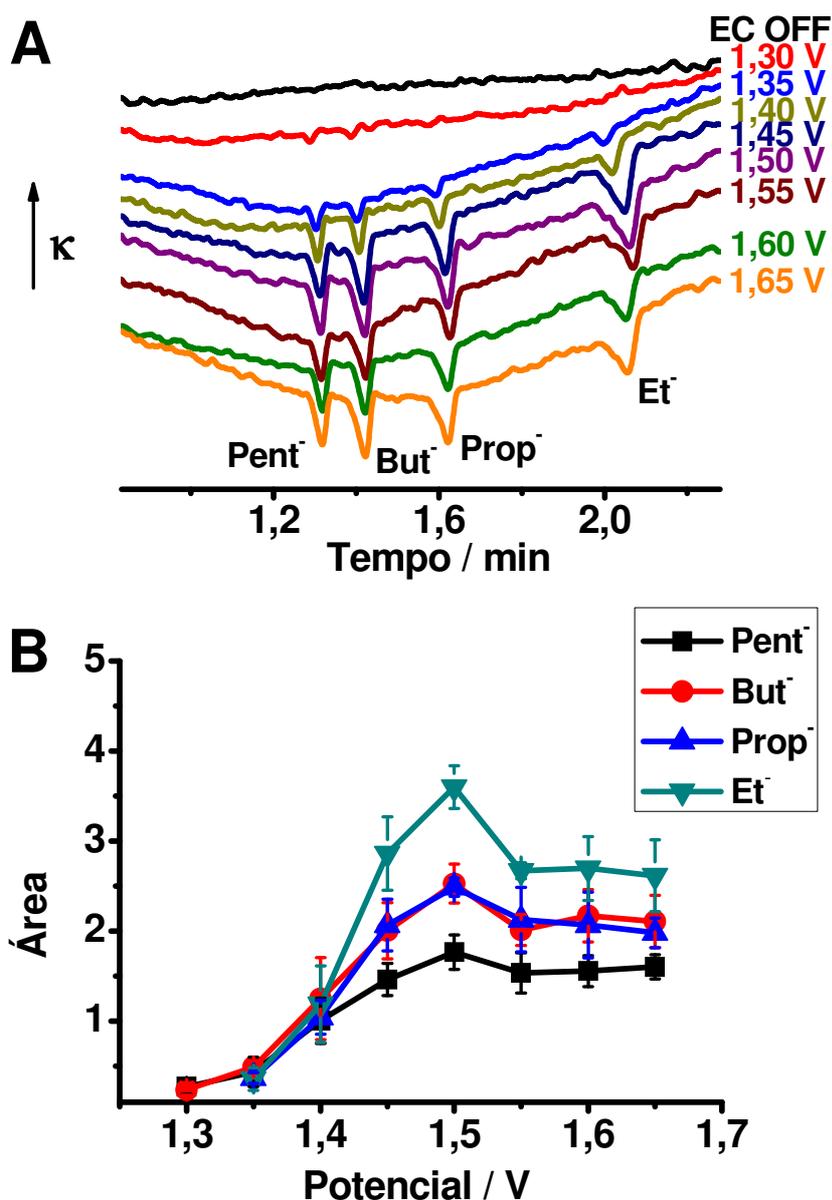


Figura 21: (A) Variação do potencial aplicado para oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de ouro (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{quase-referência}}$). (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do potencial aplicado. Eletrólito de oxidação: KNO_3 5 mmol L^{-1} / KCl 1 mmol L^{-1} . Tempo de injeção: 2 s, tempo de oxidação: 50 s. Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 14.

Mantendo o potencial constante em 1,50 V, variou-se o tempo de eletrólise, como mostrado no conjunto de eletroferogramas da Figura 22A. Um gráfico da área dos picos em função do potencial aplicado (Figura 22B) mostrou um aumento dos sinais até 75 segundos de eletrólise, diminuindo em tempos maiores, assim como em meio ácido, provavelmente devido ao esgotamento do álcool na camada delgada

de solução e/ou consumo do ácido carboxílico por gradual oxidação à CO_2 . Os resultados apontaram 75 segundos como melhor tempo de eletrólise para meio neutro, semelhante ao observado em meio ácido.

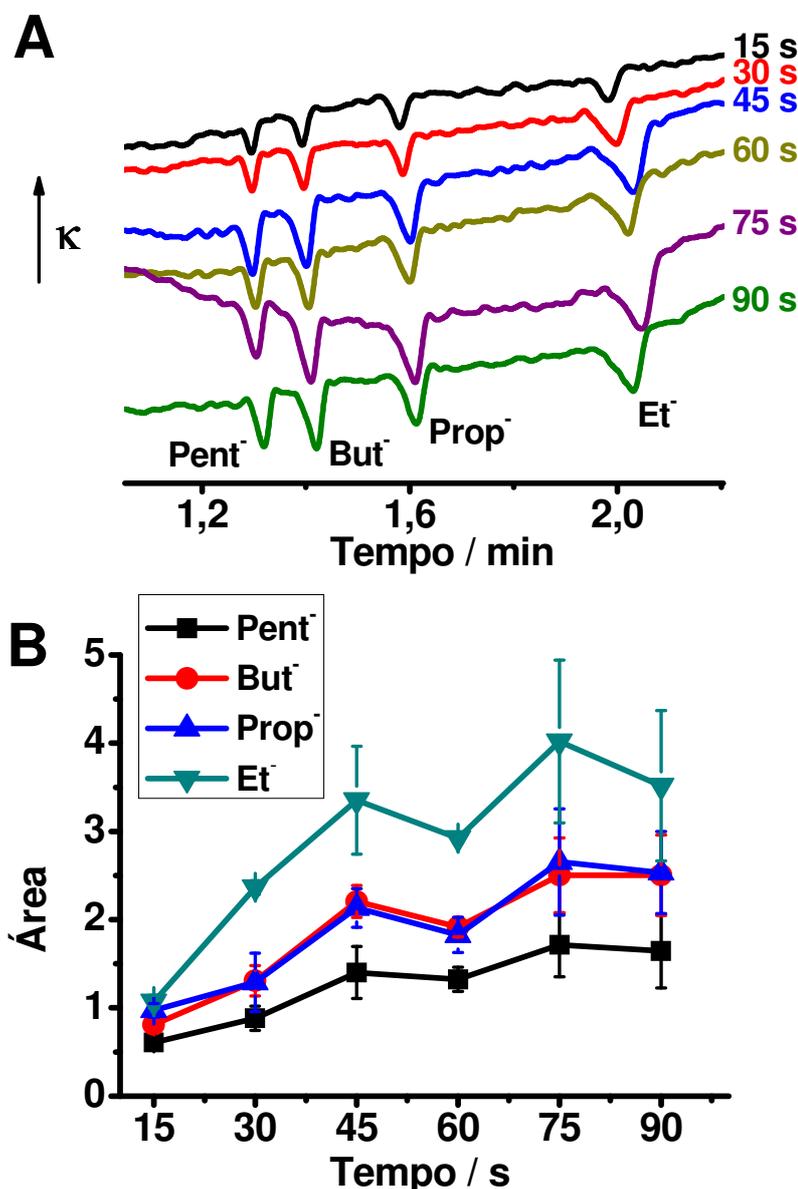


Figura 22: (A) Variação do tempo de oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de ouro. (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do tempo de oxidação. Eletrólito de oxidação: KNO_3 5 mmol L^{-1} / KCl 1 mmol L^{-1} . Potencial de oxidação: $1,50 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). Outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 14.

Assim como em eletrodo de platina, em eletrodo de ouro e meio alcalino, a fração dos álcoois convertida aos respectivos carboxilatos foi baixa. Voltamogramas cíclicos disponíveis na literatura mostram um aumento significativo da densidade de

corrente (geralmente 10 vezes maior) obtida durante a eletrooxidação de etanol em eletrodos de ouro em meio alcalino, quando comparado com meio ácido^[142]. Além disso, apesar de favorecida em meio alcalino, a quebra da ligação carbono-carbono ainda é difícil de ocorrer, sendo reportado que o ácido carboxílico é o produto majoritário da eletrooxidação de álcoois primários com mais de um carbono^[163], como etanol. Os resultados obtidos com o sistema EC-CE-C⁴D apontam, todavia, uma fração muito baixa de carboxilatos gerados nessas condições (Figura 23A), inferior à registrada em meio ácido, porém, que se inicia em valores menores de potencial, sendo detectável a partir de 0,85 V, ao invés de 1,4 V. Isso pode estar associado à diminuição da sobretensão, facilitando à oxidação de intermediários adsorvidos na superfície do eletrodo e à quebra da ligação C-C^[164], aumentando a fração convertida a CO₂. Além disso, o potencial de oxidação dos álcoois é antecipado, provavelmente devido a uma melhor estabilização dos íons H⁺ (gerados durante a oxidação) pelos íons OH⁻ do meio^[154], como observado para eletrodo de platina. Vale ressaltar que estudos realizados por voltametria cíclica utilizam eletrólito geralmente em concentrações 100 vezes maiores que as dos analitos. Tipicamente NaOH 1,0 mol L⁻¹ é empregado como meio alcalino, enquanto que para EC-CE não é possível trabalhar com valores superiores a 0,01 mol L⁻¹, pois o aumento da força iônica do meio, causa um aumento na temperatura devido à corrente que flui no sistema (efeito Joule), gerando por exemplo, instabilidade na linha de base do CE. Apesar dos sinais pequenos e com desvios padrão relativo maiores, quando comparados aos obtidos em meio ácido e neutro, a tendência de aumento das áreas dos picos em função do potencial persiste, como seria de esperar (Figura 23B).

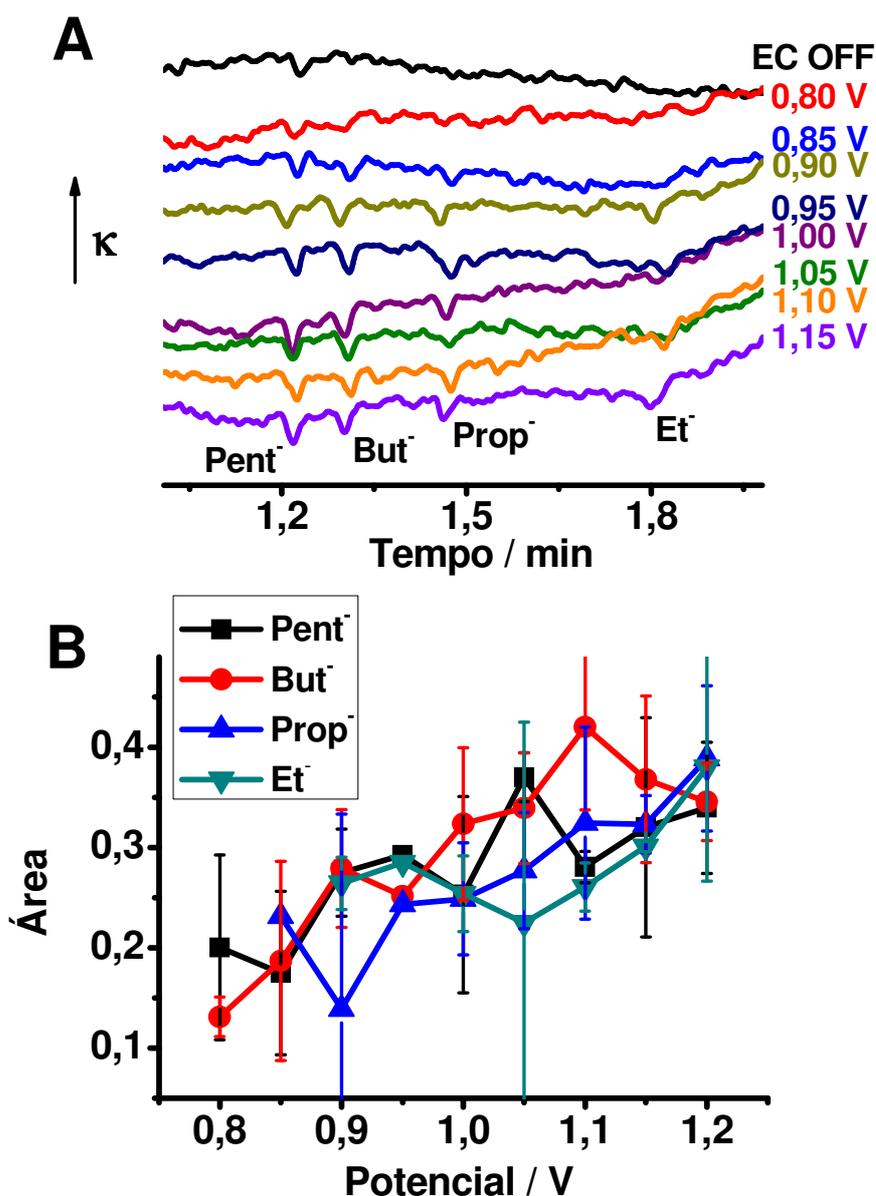


Figura 23: (A) Variação do potencial aplicado para oxidação numa solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em eletrodo de ouro (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). (B) Áreas dos picos (média das triplicatas) em função do potencial aplicado. Eletrólito de oxidação: $\text{NaOH } 5 \text{ mmol L}^{-1} / \text{NaCl } 1 \text{ mmol L}^{-1}$. Tempo de injeção: 2 s, tempo de oxidação: 50 s. Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 14.

4.2.3. Comparação dos Resultados Obtidos nos Eletrodos de Ouro e Platina

Apesar da superior eficiência da platina policristalina quando comparada com ouro para oxidação de álcoois^[142,163,164,166], baseando-se na densidade de corrente gerada durante a eletrocatalise, no presente trabalho os sinais de carboxilatos

obtidos para eletrooxidação dos álcoois em eletrodo de ouro foram superiores aos obtidos em platina nas mesmas condições, como apresentado na Figura 24. Nos experimentos realizados com eletrodo de platina, os sinais obtidos para os carboxilatos possuíam intensidade semelhante, apresentando uma leve diminuição do sinal correspondente ao carboxilato de cadeia maior para o de cadeia menor. Esse fenômeno pode ser explicado pelo mecanismo de detecção utilizado, pelo qual o sinal observado corresponde à diferença de mobilidade entre o co-íon (espécies de mesma carga presente do eletrólito de corrida) e o analito. Como o co-íon empregado nessas análises é o cloreto (íon de alta mobilidade), para uma mesma concentração, os carboxilatos de cadeia maior apresentam condutividade iônica molar menor, dando uma diferença maior, enquanto que na mesma concentração, os de cadeia menor, mais rápidos, geram um sinal de menor intensidade, como detalhado em trabalho sobre o detector condutométrico sem contato^[35,36].

No eletrodo de ouro a variação nos sinais obtidos foi inversa ao esperado, indicando uma tendência ou seletividade para maior rendimento da oxidação a carboxilato para os álcoois de cadeia menor frente aos de cadeia maior. Quando comparado com platina, o sinal correspondente ao pentanoato possui mesma intensidade nos eletrodos de ambos os metais nobres, enquanto que o sinal do etanoato em ouro tem aproximadamente 4 vezes a área do obtido em platina, nas mesmas condições, como pode ser visualizado na Figura 24. Essa diferença pode ser mais facilmente observada ao realizar o acerto na linha de base dos eletroferogramas, como apresentado na Figura 24B.

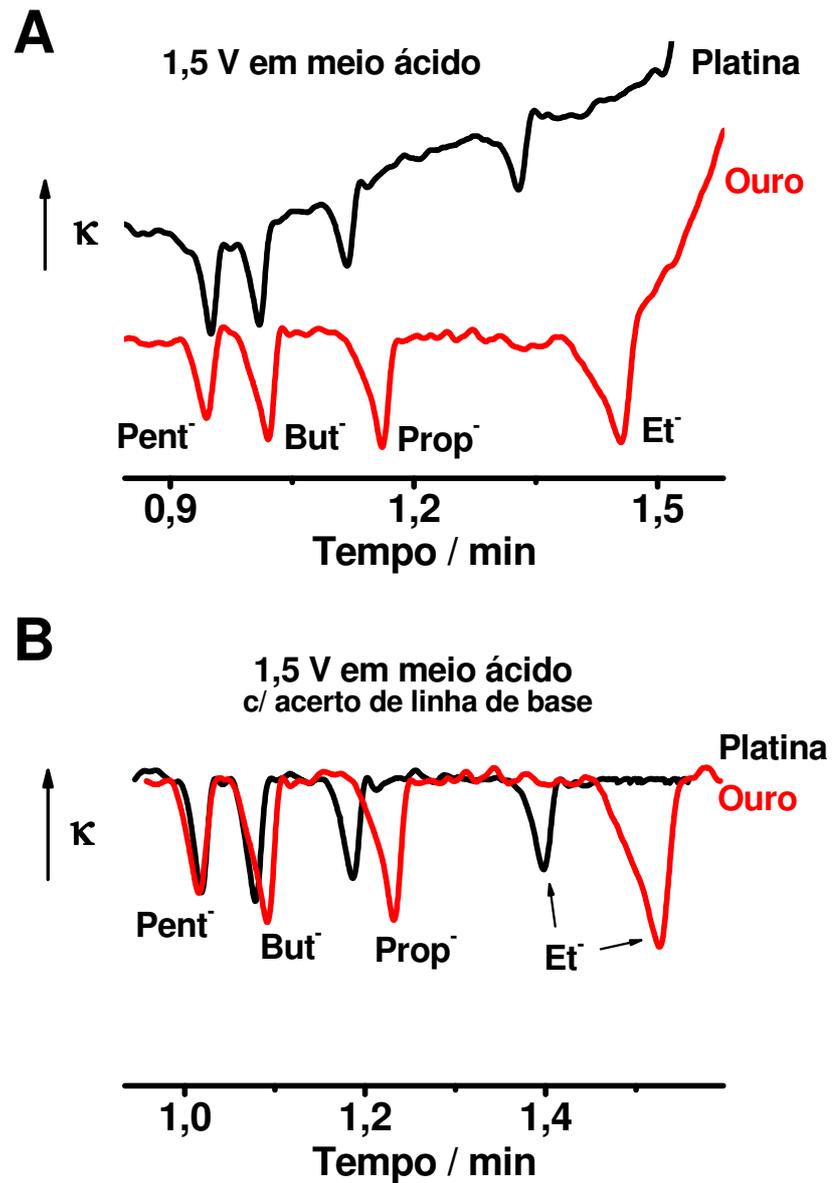


Figura 24: Comparação dos eletroferogramas obtidos para oxidação duma solução de 1 mmol L^{-1} dos álcoois em platina e ouro antes (A) e após (B) acerto da linha de base. Potencial de oxidação: $1,50 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag/AgCl}_{\text{quase-referência}}$). Eletrólito de oxidação: HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} . Tempo de injeção: 2 s , tempo de oxidação: 50 s . Comprimento do capilar: 45 cm ($15 \pm 2 \text{ cm}$ efetivo).

4.3. MONITORAMENTO DA ELETROOXIDAÇÃO DO GLICEROL POR CE-C⁴D: DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES NEUTRAS E IÔNICAS

Já foi dito na introdução (item 1.6) que o glicerol é um poliol obtido em larga escala como sub-produto da fabricação de biodiesel. Pesquisas visando à conversão do glicerol excedente em produtos de maior valor abrangem a sua oxidação, inclusive, por via eletroquímica e o monitoramento desses processos demanda métodos analíticos apropriados. A possibilidade de comparar a eficiência de eletrocatalisadores em microescala recorrendo ao sistema EC-CE-C⁴D para eletrooxidar glicerol e separar e determinar alguns dos produtos iônicos ou ionizáveis foi demonstrada anteriormente pelo grupo do orientador^[47]. Na prática, há interesse em estudar o desempenho de reatores eletroquímicos de maior dimensão, sob diversas condições e em função do tempo de eletrólise, monitorando também o consumo do glicerol e a formação de dióis, além de carboxilatos. Dessa forma, avaliou-se a possibilidade de desenvolver um método para determinação de glicerol ao lado de alguns de seus possíveis produtos de oxidação, como gliceraldeído e dihidroxiacetona (espécies neutras), bem como espécies iônicas (ácidos carboxílicos), facilmente determináveis por CE. A principal diferença dos métodos analíticos por CE-C⁴D apresentados a seguir frente aos já apresentados por EC-CE-C⁴D está no detalhe da etapa eletroquímica ocorrer ex-situ, em célula de maior volume e com eletrólises prolongadas (várias horas) durante as quais são coletadas amostras de pequeno volume para análise imediata ou posterior. Essa parte do trabalho foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do Professor Jonas Gruber, também do Instituto de Química da USP, que buscavam um

método analítico para monitorar os produtos formados durante a eletrooxidação do glicerol.

Como já mencionado, para a separação de espécies neutras por CE faz-se necessário recorrer à MEKC, derivatização ou ainda formação de complexo carregado. A conhecida formação de complexo entre polióis e borato pode ser aproveitada para permitir a separação do glicerol de outras espécies neutras por CE, dispensando a necessidade de realizar reações prévias. É conveniente que o borato requerido para a formação do complexo com o glicerol esteja presente no próprio eletrólito de corrida (BGE), o que se consegue escolhendo tampão composto por ácido bórico e hidróxido de lítio, pH 9,1^[51].

4.3.1. Determinação Quantitativa do Glicerol, Gliceraldeído e Dihidrixiacetona.

Uma solução contendo padrões de glicerol, gliceraldeído e dihidroxiacetona $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada em NaOH 10 mmol L^{-1} e injetada no CE. A separação dos complexos formados entre os analitos e o borato foi realizada no contra-fluxo e monitorada empregando os dois detectores C⁴D. Como esperado, somente após o sinal correspondente ao EOF, surgiram os picos para glicerol, dihidroxiacetona e gliceraldeído, em 2,1, 2,3 e 2,6 minutos, respectivamente (o tempo total de análise foi inferior a 3,5 minutos). Um eletroferograma obtido no segundo detector é apresentado na Figura 25A. A separação dos três analitos até o primeiro detector (10 cm) foi alcançada, porém observou-se co-migração entre o pico correspondente ao glicerol e um pico de sistema. A separação desse par crítico pode ser efetivamente alcançada com resolução (1,8) de linha de base no segundo detector,

como apresentado na Figura 25A. O curto tempo necessário para separação e determinação das espécies usando CE-C⁴D permite realizar o monitoramento do processo de eletrooxidação do glicerol com alta frequência analítica, quando comparada com o elevado tempo de eletrólise do glicerol num reator eletroquímico.

Injeções das soluções contendo glicerol, dihidroxiacetona e gliceraldeído em concentrações crescentes foram realizadas em triplicada e as curvas de calibração obtidas para as áreas dos picos dos complexos formados são apresentadas na Figura 25B. Na faixa linear avaliada (de 0,2 a 20,0 mmol L⁻¹), coeficientes de correlação superiores a 0,999 foram obtidos para todas as espécies, e os limites de detecção calculados (LODs) para glicerol, dihidroxiacetona e gliceraldeído foram 15, 15 e 10 μmol L⁻¹, respectivamente. Dentre essas espécies, maior sensibilidade foi obtida para o gliceraldeído (maior coeficiente angular), como pode ser observado na Figura 25B. Como discutido anteriormente, o sinal obtido no detector condutométrico sem contato refere-se à diferença entre a mobilidade do analito e o seu co-íon^[35,36]. Nesse caso, a diferença na intensidade dos picos observada no eletroferograma se deve, além da condutância, a fatores como constante de equilíbrio (complexação e ácido-base) e raio hidrodinâmico de cada complexo, que alteram o tempo de migração e a detectabilidade.

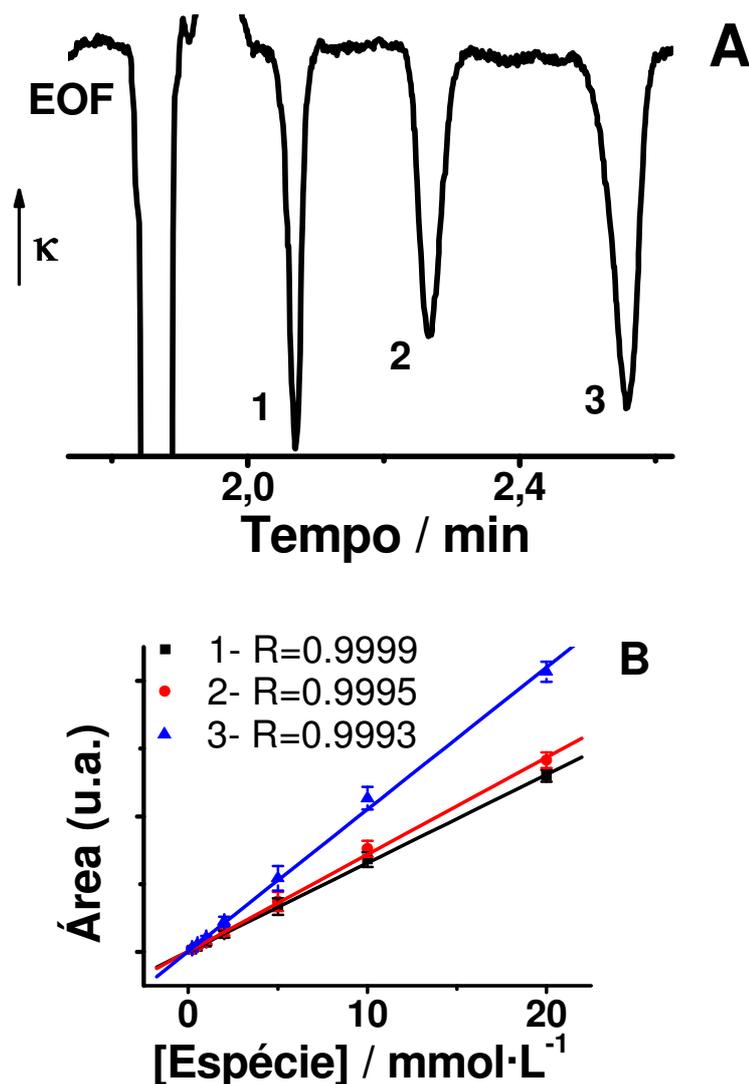


Figura 25: (A) Eletroferograma da separação dos complexos formados de polióis com borato, 1-glicerol, 2-gliceraldeído e 3-dihidroxiacetona, todos a 1 mmol L^{-1} . Tempo de injeção: 3 s, potencial de separação: 30 kV. Comprimento do capilar: 60 cm (50 cm efetivo, segundo detector), $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, tampão de corrida: H_3BO_3 60 mmol L^{-1} / LiOH 30 mmol L^{-1} (pH 9,1). (B) Curva de calibração na faixa de concentração de 0,2 a $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.3.2. Determinação dos Ácidos Carboxílicos

Para demonstrar a possibilidade de determinar glicerol e seus principais produtos de eletrooxidação (neutros e iônicos), uma solução padrão contendo glicerol, dihidroxiacetona, gliceraldeído, e os ácidos glicérico, hidroxipirúvico, glicólico, glioxílico, mesoxálico, tartrônico e fórmico, todos a 1 mmol L^{-1} , foi

preparada em NaOH 10 mmol L⁻¹ e injetada no CE-C⁴D utilizando H₃BO₃ 60 mmol L⁻¹ + LiOH 30 mmol L⁻¹ (pH 9,1) como BGE. No primeiro detector, a separação da maioria dos picos não ficou resolvida, enquanto que no segundo detector, todas as espécies, com exceção do mesoxalato, foram separadas, como apresentado na Figura 26. A principal vantagem desse método é a possibilidade de determinar a maioria dos produtos provenientes da eletrooxidação do glicerol num único procedimento. Por outro lado, além da variação observada na linha de base, devido ao mecanismo de detecção do C⁴D, os carboxilatos com mobilidade próxima a do EOF apresentam baixa detectabilidade e os carboxilatos com mobilidade superior à do EOF não podem ser determinados, pois saem do capilar após aplicar a alta tensão. Adicionalmente, o pico correspondente ao tartronato (última espécie detectada) aparece somente 8 minutos após injeção, elevando o tempo de análise. Com isso, estratégias normalmente empregadas para análises de ânions, baseadas no uso de modificadores de superfícies para inverter sentido do EOF, foram avaliadas para determinação dos carboxilatos. Recorreu-se a um BGE composto por MES 30 mmol L⁻¹ + His 30 mmol L⁻¹ (pH 6,1) para comparar o Polybrene[®] com o CTAB como inversor de fluxo. Cabe lembrar que, nessas condições, as espécies neutras são simplesmente arrastadas pelo EOF, não havendo discriminação entre elas.

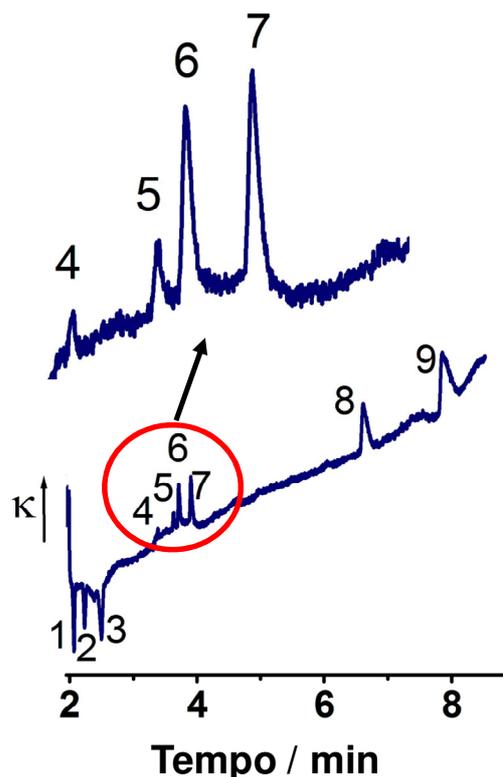


Figura 26: Eletroferograma obtido (segundo detector) para a solução padrão de: 1-glicerol, 2-gliceraldeído, 3-dihidroxiacetona, 4-glicerato, 5-hidroxipiruvato, 6-glioxilato, 7-glicolato, 8-formiato e 9-tartronato (todos a 1 mmol L^{-1}). Tampão de corrida: H_3BO_3 60 mmol L^{-1} / LiOH 30 mmol L^{-1} (pH 9,1), tempo de injeção: 3 s, potencial de separação: 30 kV. Comprimento do capilar: 60 cm (50 cm efetivo, segundo detector), $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno.

A mesma solução padrão contendo 1 mmol L^{-1} de cada carboxilato foi injetada no CE em duas condições, a saber, usando (i) MES 30 mmol L^{-1} + His 30 mmol L^{-1} após modificação do capilar com solução de Polybrene[®] 5 % (m/m)^[169,170] e (ii) MES 30 mmol L^{-1} + His 30 mmol L^{-1} + $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ CTAB. Eletroferogramas obtidos no primeiro e segundo detector empregando Polybrene[®] como modificador de fluxo é apresentado na Figura 27A e B, respectivamente. Como pode ser observado, os sinais para formiato, glicolato, glioxilato e glicerato aparecem separados em ambos os detectores, enquanto tartronato e mesoxalato não apresentam separação de linha de base. Comparando o eletroferograma obtido no primeiro detector (Figura 27A) com o do segundo (Figura 27B), observa-se um decréscimo no sinal correspondente

ao glioxilato (pico 6), o que indica interação (adsorção) dessa espécie com o Polybrene[®] presente na superfície interna do capilar. Além disso, não foi observado sinal para hidroxipiruvato nessas condições, o que também, pode ser devido à forte interação dessa espécie com o modificador de superfície utilizado.

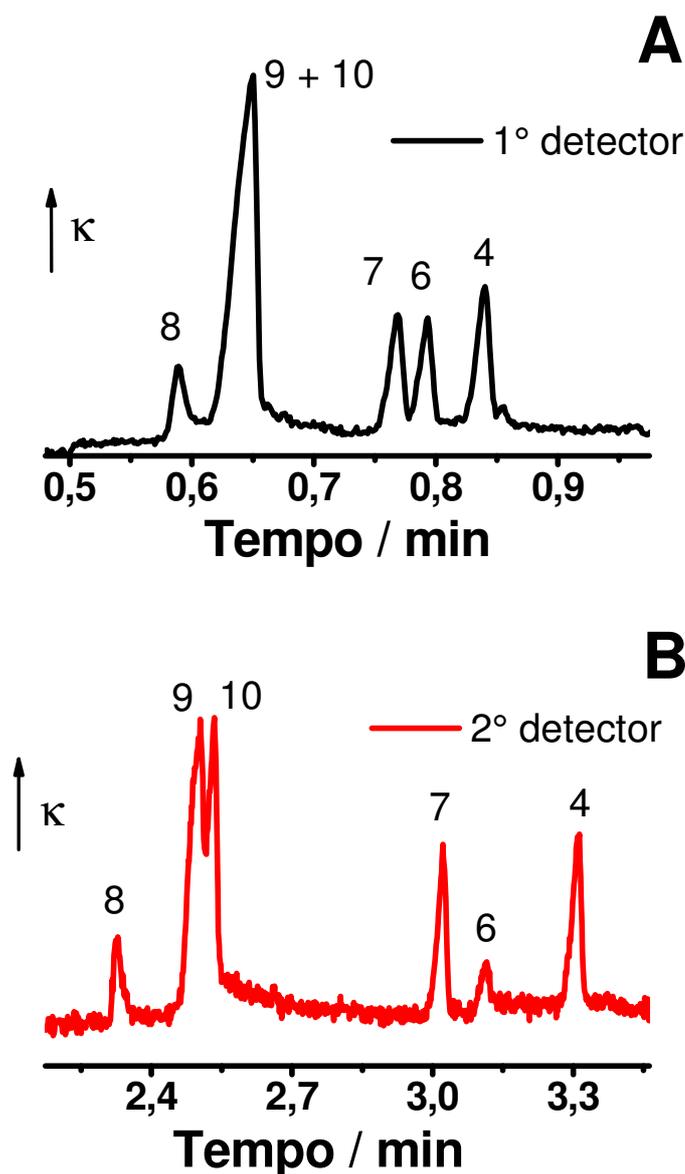


Figura 27: Eletroferogramas obtidos para a solução padrão de: 4-glicerato, 6-glioxilato, 7-glicolato, 8-formiato, 9-tartronato e 10-mesoxalato (todos a 1 mmol L^{-1}). (A) primeiro detector e (B) segundo detector. Tampão de corrida: MES 30 mmol L^{-1} / His 30 mmol L^{-1} (pH 6,1). Inversão do EOF tratando o capilar com solução de Polybrene[®] 5% (m/m). Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 26.

Eletroferogramas obtidos no primeiro e segundo detector empregando CTAB como inversor do EOF são apresentados na Figura 28A e B, respectivamente. O uso de CTAB apresentou resultados semelhantes aos obtidos com Polybrene[®]. Embora o pico do glicerato (espécie mais lenta) tenha aparecido em menos de 0,6 min no primeiro detector, nessa condição observou-se co-migração entre formiato e mesoxalato. Já no segundo detector foi possível obter separação de linha de base para tartronato, formiato, mesoxalato, glicolato, glioxilato e glicerato. Contudo, do primeiro detector (Figura 28A) para o segundo (Figura 28B), um decréscimo/deformação no sinal correspondente a mesoxalato (pico 10) e glioxilato (pico 6) foi observado. Adicionalmente, a ausência de sinal correspondente ao hidroxipiruvato, pode ser atribuída à interação dessa espécie com o CTAB (modificador de superfície utilizado) presente na parede interna do capilar e no BGE.

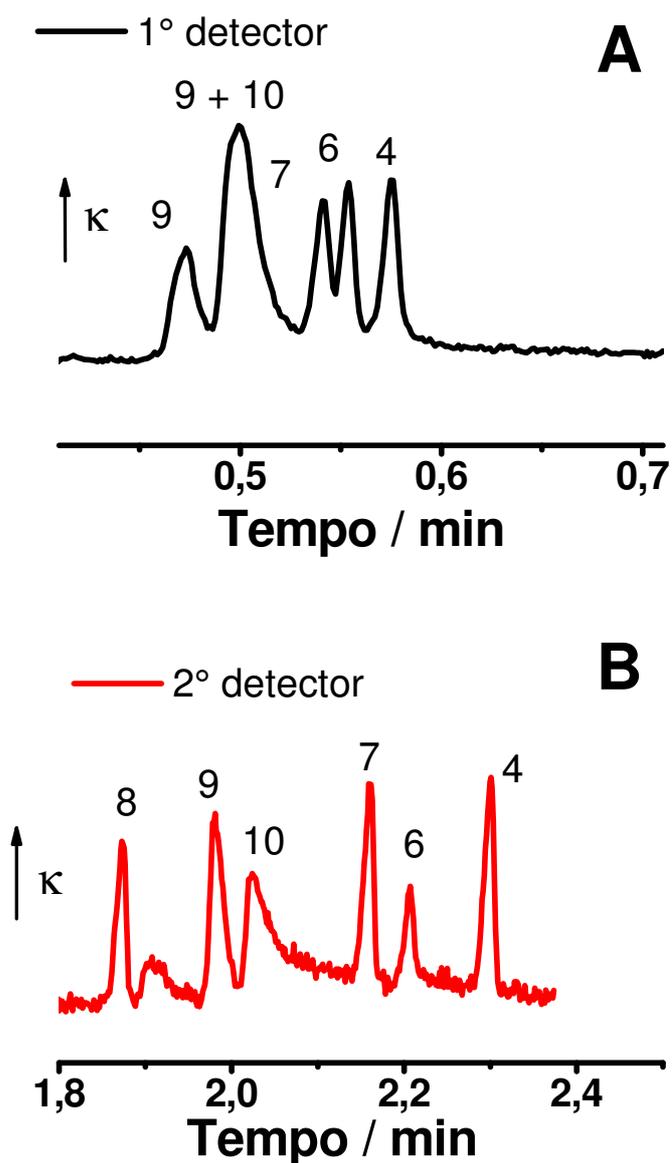


Figura 28: Eletroferogramas obtidos para a solução padrão de: 4-glicerato, 6-glioxilato, 7-glicolato, 8-formiato, 9-tartronato e 10-mesoxalato (todos a 1 mmol L^{-1}). (A) primeiro detector e (B) segundo detector. Tampão de corrida: MES 30 mmol L^{-1} / His 30 mmol L^{-1} / CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,1). Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 26.

Para simular uma amostra real e avaliar a aplicação do método analítico proposto, uma amostra de glicerol $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi eletrooxidada em eletrodo de platina e alíquotas foram coletadas após 0,5, 2, 4, 8, e 16 horas. A alíquota coletada foi diluída 50 vezes em água deionizada e analisada por CE-C⁴D, empregando a estratégia descrita para determinar as espécies neutras e o

procedimento usando CTAB como inversor de EOF para determinar os ácidos carboxílicos.

Os resultados obtidos mostram um decaimento exponencial do pico do glicerol em função do tempo de eletrólise (Figura 29A), com o aparecimento de 4 espécies detectáveis que foram identificadas por ordem de detecção (com base no tempo de migração e fortificação com padrão) como formiato, glicolato, hidroxipiruvato e glicerato, respectivamente, como apresentado na Figura 29B. Nas condições de eletrólise utilizadas, gliceraldeído e dihidroxiacetona não foram encontrados entre os produtos da oxidação do glicerol, provavelmente por não serem formados em extensão significativa (ficando abaixo do limite de detecção) indicando uma eletrooxidação preferencial aos ácidos carboxílicos.

A taxa de conversão do glicerol em função do tempo de eletrólise foi determinada integrando as áreas dos picos (triplicata) obtidos antes do início da reação e após o tempo determinado. Por exemplo, em um experimento a concentração de glicerol reduziu de 200 para aproximadamente 27 mmol L⁻¹ após 16 horas de eletrólise, o que significa uma conversão de 87 %. Ao fim das 16 horas de eletrólise, os íons formiato, glicolato e glicerato alcançaram as concentrações de 51, 78 e 20 mmol L⁻¹, respectivamente, determinada por adição de padrão. Embora com a solução padrão de hidroxipiruvato 1 mmol L⁻¹ não tenha sido observado sinal (Figura 28), presumivelmente devido à interação com o CTAB, um pico correspondente ao hidroxipiruvato foi observado para a amostra da solução de glicerol eletrolisado por 16 h. Provavelmente, a quantidade gerada é tão alta que, mesmo após perda parcial por adsorção (interação com o surfactante) restou o suficiente para produzir um pico com área correspondente a aproximadamente 20 mmol L⁻¹, tomando como referência a curva de calibração do glicerato, que

apresenta a mesma carga e mobilidade semelhante e, conseqüentemente, a mesma sensibilidade no C⁴D.

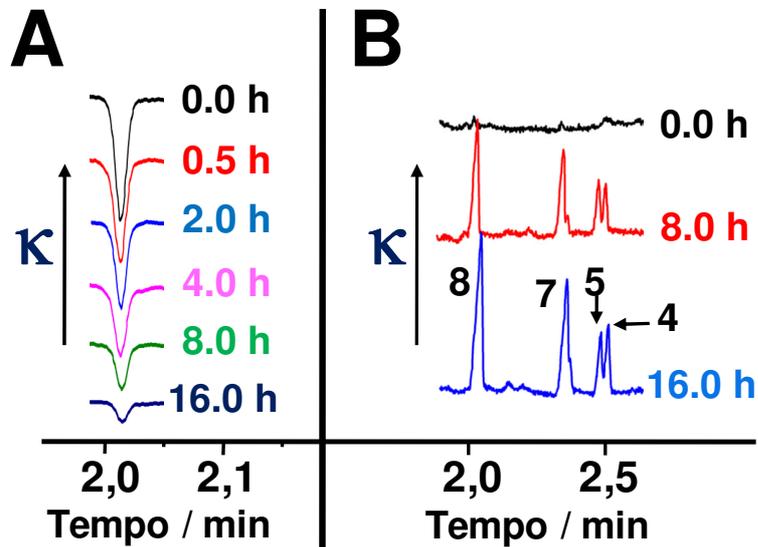


Figura 29: (A) Conjunto de eletroferogramas obtidos (segundo detector) para variação do tempo de eletrólise do glicerol $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$. BGE: $\text{H}_3\text{BO}_3 \text{ } 60 \text{ mmol L}^{-1}$ / $\text{LiOH } 30 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 9,1. (B) Eletroferogramas (segundo detector) obtidos para detecção dos produtos formados durante a eletrólise do glicerol: 4-glicerato, 5-hidroxipiruvato, 7-glicolato e 8-formiato. BGE: $\text{MES } 30 \text{ mmol L}^{-1}$ / $\text{His } 30 \text{ mmol L}^{-1}$ / $\text{CTAB } 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,1).

4.4. ABLAÇÃO EM VIDRO POR LASER DE CO_2

Como mencionado, ablação a laser de CO_2 é um processo versátil que tem sido largamente empregado para fabricação de dispositivos em diversos materiais poliméricos (principalmente PMMA) e recentemente na fabricação de microchip para separações eletroforéticas^[105,107,120,121]. Contudo, esse método, quando aplicado em vidro, causa fraturas e trincas, além de uma razão de aspecto limitada (Figura 30A e C), sendo que na maioria dos casos, as lâminas quebram durante o processo de gravação. Isso pode ser atribuído à alta potência do feixe do laser necessária para fazer os cortes e canais, ao coeficiente de expansão térmica do vidro e a sua alta rigidez mecânica. Em contraste com materiais poliméricos, o vidro possui maior

ponto de fusão (~ 800 °C) e temperatura de decomposição térmica (~ 2000 °C)^[171], exigindo maior potência e/ou tempo de exposição ao laser de CO₂ para produzir ablações com dimensões compatíveis com dispositivos microfluídicos. Considerando esses fatores, foi adicionada uma camada fina de parafina para agir como dissipador de calor visando minimizar o aquecimento local das áreas de ablação e conseqüentemente, a dilatação da peça (que leva à quebra do dispositivo). Durante o processo de ablação a laser, tanto o vidro quanto a parafina fundem e evaporam, sendo removidos (em forma de gás/partículas) por um fluxo de nitrogênio (perpendicular a superfície usinada) e um exaustor. O uso de parafina para dissipar o calor local apresenta algumas vantagens frente a líquidos^[111]: (i) ela é sólida antes e depois da ablação, mantendo o equipamento limpo e evitando riscos associados ao uso de líquidos; (ii) mantém fixos a lâmina de vidro e o substrato (*wafer* de silício); (iii) durante a ablação, ela se funde, aumentando a absorção de calor e o contato físico; e (iv) é de fácil remoção da superfície de vidro usando solventes comumente encontrados em laboratório, por exemplo, isopropanol.

O efeito do uso da camada de parafina na superfície do vidro durante a ablação pode ser observado nos canais apresentados na Figura 30B e D. Os canais obtidos apresentam rugosidade média de $0,24$ μm e perfil semicircular com razão profundidade/largura de $\sim 0,2$ (70 μm de profundidade e 400 μm de largura). Os desvios padrão relativos obtidos para profundidade e largura foram $5,0$ e $3,5$ %, respectivamente ($n= 10$). Embora os canais obtidos apresentem largura superior às usualmente utilizadas em separações eletroforéticas em microchip, por ser o feixe do laser mais largo quando operado fora do plano focal, a estratégia demonstrada por Breadmore e colaboradores^[172], colocando uma placa de aço inox com fendas de 50 μm entre o feixe de laser e a peça a ser usinada, poderia ser empregada para

obter canais de menores dimensões. O formato semicircular pode ser atribuído à mudança do plano focal do laser que produz um feixe mais largo e com menor intensidade, e canais mais rasos e largos que quando o feixe de laser se encontra focado na superfície do substrato (perfil Gaussiano). Embora fraturas ou trincas significativas não tenham sido observadas dentro dos canais, é possível identificar alguns defeitos superficiais nas bordas dos canais, que não trouxeram problemas durante a selagem da superfície de vidro usinada com uma fina manta de PDMS para obter o microdispositivo. Além disso, nenhum vazamento de solução ou fugas de alta tensão foram observadas durante as separações eletroforéticas. A Figura 30E mostra uma imagem 3D de um cruzamento usado para injeção de amostra e o perfil do canal obtido com os valores de largura e profundidade. A maior profundidade observada exatamente na intersecção entre os canais pode ser atribuída ao fato do feixe de laser passar duas vezes nessa região, removendo material, como previamente observado durante ablação em materiais poliméricos^[105,107]. A Figura 30F apresenta uma imagem do cruzamento e dos reservatórios (3 mm de diâmetro) obtidos após ablação da lâmina de vidro realizando 5 passes consecutivos com o laser a 100 % de sua potência (30 W) e 2 % da velocidade ($1,8 \text{ mm s}^{-1}$) máximas. O tempo necessário para gravar o dispositivo (canais e reservatórios) foi de aproximadamente 5 min. A eficiência do processo é de aproximadamente 90 % (~10 % das lâminas são descartadas por sofrerem algum tipo de dano durante o processo) e o aumento da distância entre os furos (reservatórios) e/ou o tempo entre as ablações, podem reduzir (ou evitar) a quebra dos dispositivos. É importante citar que, embora as bordas dos reservatórios produzidos apresentem rugosidade, essa característica não causou nenhuma interferência no desempenho dos dispositivos.

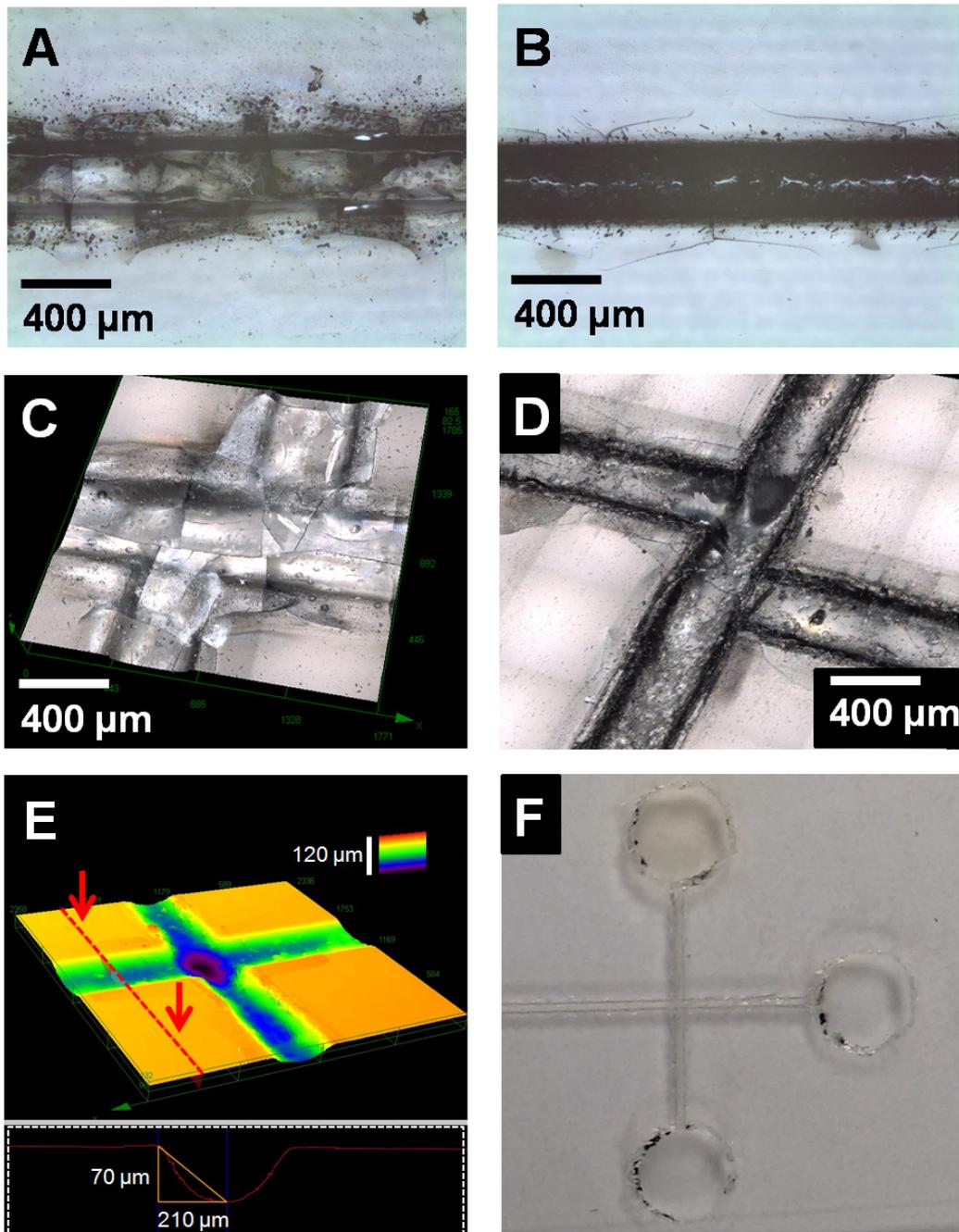


Figura 30: Micrografias dos canais feitos em vidro sem (A) e com (B) o uso de parafina. Imagens 3D dos cruzamentos (T duplo) para injeção da amostra, produzidos sem (C) e com (D) o uso de parafina. Cruzamento (E) selecionado para realizar injeção de amostra (em detalhe, a perfilometria do canal mostrando o formato semicircular e as dimensões correspondentes). A lente objetiva usada foi de 20 x. Imagem ampliada dos reservatórios de tampão, amostra e descarte da amostra (F). Todos os canais foram gravados usando 80 % da potência e 10 % da velocidade máxima e fora do ponto focal do feixe de laser ($\sim 0,5 \text{ mm}$)^[112].

Para determinar a melhor condição experimental para produzir os canais, o efeito da potência e velocidade do feixe de laser durante a ablação nas dimensões dos canais foram investigados. A Figura 31 mostra a dependência da profundidade e largura dos canais da potência e velocidade (o recíproco da velocidade - $1/v$). Como pode ser observado na Figura 31A, com o aumento da potência do laser, ocorreu aumento significativo nas dimensões dos canais. Apesar das razões de aspecto e da forma dos canais produzidos se manterem proporcional na faixa investigada, as dimensões dos canais apresentaram crescimento assintótico com relação à potência do feixe de laser incidente. Como mostrado na Figura 31B, a velocidade de deslocamento do laser também pode ser usada para controlar as dimensões dos canais. Como reportado para PMMA^[105], uma dependência linear entre as dimensões dos canais (largura e profundidade) e o inverso da velocidade ($1/v$) foi observada. Essa tendência pode ser atribuída à quantidade de energia que atinge cada ponto da superfície do vidro (potência por unidade de tempo e de área). Em outras palavras, quanto mais rápido o feixe de laser se desloca, menos energia é transferida para o substrato (por unidade de área) e menor a quantidade de material removido.

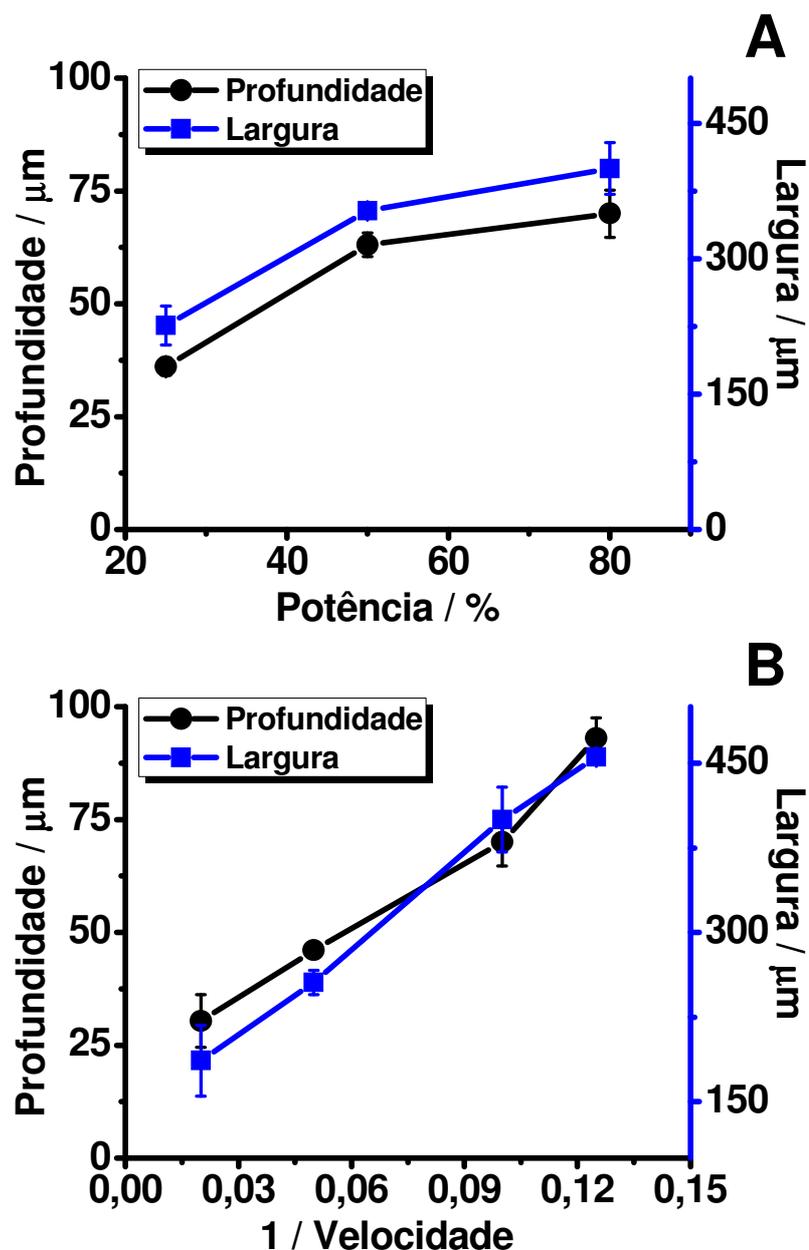


Figura 31: Variação das dimensões dos canais (largura e profundidade) em função da potência (A - 10 % de velocidade) e velocidade (B - 80 % de potência). Outras condições como descritas na sessão de materiais e métodos^[112].

Para demonstrar a capacidade do dispositivo desenvolvido por esse método, a separação de uma solução padrão contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, catecol e ácido úrico, diluídos no BGE, foi realizada. Como apresentado na Figura 32, os tempos de migração obtidos para dopamina, catecol e ácido úrico foram 40, 60 e 85 s, respectivamente, e todos os compostos foram separados em menos de 100 s. As resoluções calculadas entre os picos dopamina/catecol e catecol/ácido úrico

foram 1,2 e 1,1, respectivamente. Os picos obtidos apresentaram largura em torno de $22,5 \pm 1,5$ s, o que pode ser atribuído a contribuição da largura e rugosidade da superfície do canal, da assimetria do EOF ao longo do canal (composto por uma seção semicircular de vidro e uma manta plana de PDMS) e do efeito Joule durante a separação eletroforética.

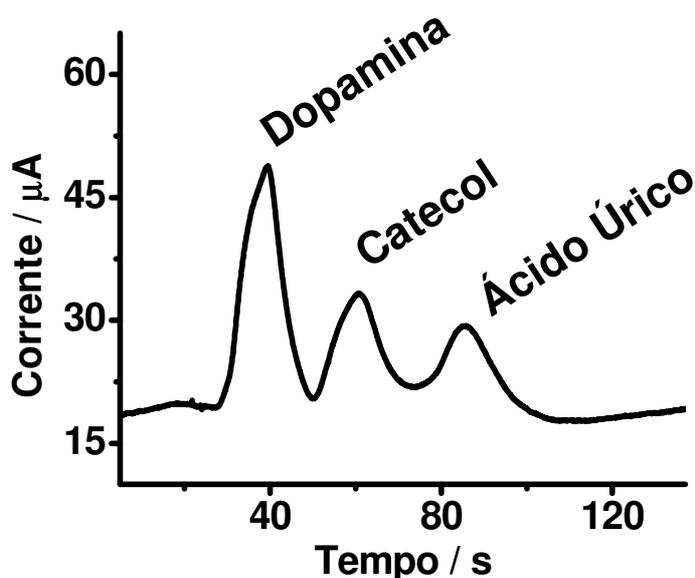


Figura 32: Eletroferograma da separação de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, catecol, e ácido úrico, obtidos no microchip produzido por ablação a laser de CO_2 . BGE: 10 mmol L^{-1} de Na_2HPO_4 + $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ SDS (pH 9,0). Injeção eletrocinética (modo "pull back"): +700 V, +200 V e +800 V aplicado nos reservatórios de tampão, descarte da amostra e amostra, respectivamente, durante 20 s. Separação (modo "pull back"): +1100 V, +850 V e +850 V aplicado nos reservatórios de tampão, descarte da amostra e amostra, respectivamente. O reservatório de descarte permaneceu aterrado durante todo o experimento. Detecção amperométrica: +0,8 V (vs Ag)^[112].

4.5. SISTEMA HÍBRIDO EC-CE-C⁴D

Um dos objetivos do plano de doutoramento foi desenvolver um sistema EC-CE-C⁴D miniaturizado, de preferência, com todas as etapas em um único dispositivo. O sistema híbrido de eletroforese capilar com microchip^[173] é um desenvolvimento recente que visa unir as vantagens e versatilidade dos

microdispositivos com a geometria bem definida do capilar de sílica fundida, canais cilíndricos uniformes e lisos de 50 µm de diâmetro interno, alta eficiência de dissipação de calor em todas as direções e a possibilidade de utilizar detectores condutométricos para equipamentos de bancada. Por essas razões, iniciou-se os estudos nessa parte do trabalho com o desenvolvimento de um sistema híbrido EC-CE-C⁴D.

Em eletroforese capilar, por exemplo, com detecção UV-vis, para alcançar a melhor eficiência de separação (picos simétricos) é necessário utilizar um co-íon com mobilidade próxima à dos analitos de interesse, evitando obter picos triangulados (cauda ou cauda frontal). Por outro lado, uma vez que o mecanismo de detecção do C⁴D é indiretamente baseado na diferença de mobilidade entre o analito e o co-íon presente no BGE, quanto maior essa diferença, maior será a sensibilidade (detectabilidade) para a espécie de interesse^[35,36]. Para possibilitar a detecção dos carboxilatos gerados após a eletrooxidação dos álcoois, um co-íon de alta mobilidade, p. ex. cloreto, pode ser usado, favorecendo as espécies mais lentas^[48,154]. Outro problema que se buscou solucionar nesse trabalho foi a determinação de metanol na presença de alta concentração de etanol, por exemplo, em bebidas alcoólicas e/ou álcool combustível. A quantificação direta (sem recorrer à CE) de misturas de diferentes álcoois por voltametria não é uma tarefa trivial, uma vez que a oxidação de vários álcoois, aldeídos, cetonas e alguns açúcares ocorre em potenciais iguais ou próximos quando submetidos às mesmas condições.

4.5.1. Avaliação do Potencial para Eletrooxidação dos Álcoois e BGE para Separação dos Carboxilatos Gerados

Uma vez que o metanoato possui mobilidade superior à do etanoato, o uso de co-íons de baixa mobilidade (p. ex., MES, CHES, etc.) em CE-C⁴D favorece a determinação do metanol frente ao etanol. Para realizar a separação e quantificação dos carboxilatos (carregados negativamente), o primeiro eletrólito avaliado foi MES/His contendo também CTAB para inverter o EOF, de forma a ter os analitos migrando no mesmo sentido do EOF (para o anodo). Devido ao capilar curto (15 cm, sob campo elétrico de 200 V cm⁻¹ aplicado com fonte de alta tensão projetada para microchip) e à alta mobilidade e concentração do íon nitrato (usado como eletrólito de suporte) presente nos padrões e na amostra, a separação entre formiato e nitrato foi comprometida. Alternativamente, o uso de BGE com valores maiores de pH (pH > 8) se mostrou atraente, pois possibilita realizar separação e quantificação de ânions (com mobilidade inferior a do EOF) no contra-fluxo, que mesmo migrando no sentido contrário, alcançam o detector arrastados pelo EOF. Com o uso de CHES/NaOH (pH 9,2), a separação das bases conjugadas dos respectivos ácidos carboxílicos provenientes da eletrooxidação de metanol, etanol e n-propanol, pode ser realizada contornando a interferência devido à presença do íon nitrato (última espécie a alcançar o detector nessas condições). Adicionalmente, devido à baixa mobilidade do CHES, a determinação do formiato é favorecida.

Para avaliar a melhor condição de separação, uma solução padrão de metanol, etanol e n-propanol 1 mmol L⁻¹, preparada em HNO₃ 2 mmol L⁻¹ foi eletrooxidada aplicando 1,4 V durante 60 s e os carboxilatos gerados foram injetados no capilar (eletrocineticamente) aplicando 3 kV durante 4 s. A separação

foi realizada aplicando 3 kV entre as extremidades do capilar e o BGE foi avaliado nas seguintes concentrações: (i) CHES 10 mmol L⁻¹ + NaOH 5 mmol L⁻¹, (ii) CHES 20 mmol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, e (iii) CHES 30 mmol L⁻¹ + NaOH 15 mmol L⁻¹. O tempo de migração de cada analito em cada BGE avaliado é apresentado na Figura 33A. A separação total de todos os analitos foi alcançada em todas as condições e, conforme esperado, maiores tempos de análise foram observados com aumento da concentração do BGE, devido principalmente à redução do potencial zeta e, conseqüentemente, a velocidade do EOF. O BGE composto por CHES 20 mmol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹ apresentou melhor separação entre analitos, com um pequeno aumento do tempo de migração, quando comparado a CHES 10 mmol L⁻¹ + NaOH 5 mmol L⁻¹. Por outro lado, como apresentado na Figura 33B, maiores alturas de pico dos álcoois foram observadas para o BGE composto por CHES 10 mmol L⁻¹ + NaOH 5 mmol L⁻¹.

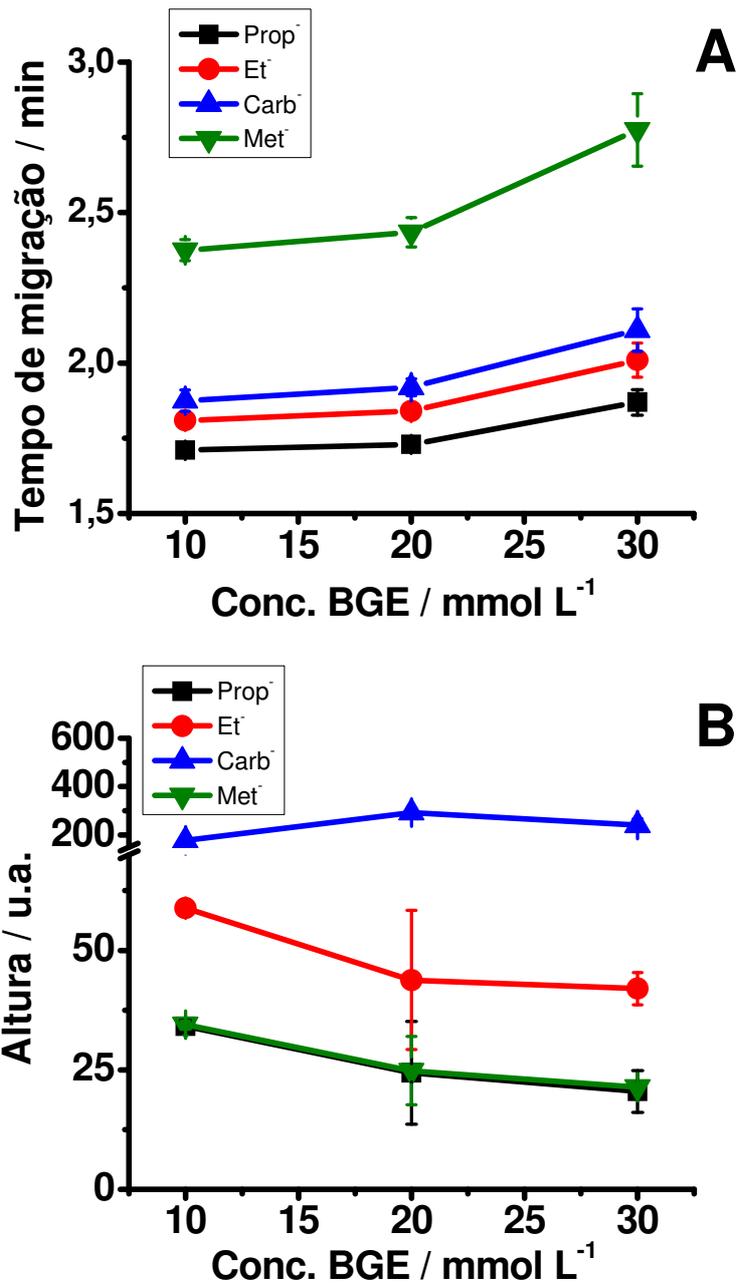


Figura 33: Avaliação da concentração do eletrólito de corrida no (A) tempo de migração e (B) na altura do pico para a separação dos carboxilatos gerados após eletrooxidação de metanol, etanol e *n*-propanol 1 mmol L⁻¹ em HNO₃ 2 mmol L⁻¹. Fios de ouro, prata e platina, de 0,5 mm de diâmetro, foram usados como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. Potencial de oxidação: 1,4 V (vs Ag) durante 60 s. Composição do BGE foi CHES 10 mmol L⁻¹ + NaOH 5 mmol L⁻¹, CHES 20 mmol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, e CHES 30 mmol L⁻¹ + NaOH 15 mmol L⁻¹. Um capilar de sílica fundida de 50 μm d.i. e 15 cm de comprimento (12 cm efetivo) foi usado. A injeção eletrocínética foi realizada aplicando 3 kV durante 4 s e a separação realizada aplicando 3 kV. Prop⁻: propanoato, Et⁻: etanoato, Carb⁻: carbonato e Met⁻: metanoato^[153].

Após definir a melhor condição para separação, uma solução padrão de metanol, etanol e n-propanol 1 mmol L^{-1} , preparada em HNO_3 2 mmol L^{-1} , foi eletrooxidada em diferentes potenciais (1,20; 1,30; 1,35; 1,40; 1,45 e 1,50 V vs. Ag) durante 60 s e os carboxilatos gerados foram injetados no capilar (eletrocineticamente) aplicando 3 kV durante 4 s, separados e detectados. Um conjunto de eletroferogramas obtidos para cada valor de potencial é apresentada na Figura 34, juntamente com as triplicatas das áreas dos picos em função do potencial aplicado (em detalhe). Adicionalmente, monitorou-se a corrente gerada durante a eletrooxidação dos alcoóis em cada valor de potencial avaliado e é apresentado na Figura 35. Como esperado, observou-se aumento da corrente de eletrooxidação com o aumento do potencial, indicando maior conversão das espécies em potenciais mais elevados.

Como pode ser observado, tanto a geração do etanoato quanto do propanoato apresentou crescimento aproximadamente linear da área do pico em função do potencial aplicado a partir de 1,30 V, com o etanoato sendo favorecido com o triplo do coeficiente angular. A conversão do metanol em metanoato, por sua vez, mantém-se quase constante entre 1,35 e 1,45 V, cruzando com o do propanoato em 1,4 V. Essa diferença em relação ao encontrado sobre eletrodo de platina^[48], onde a conversão dos álcoois nos respectivos carboxilatos apresentou rendimento similar (do C2 ao C5), mostrara que a escolha de condições experimentais, inclusive, material de eletrodo, pode ressaltar o sinal de uma espécie frente à outra. Como o objetivo desse trabalho é a determinação de metanol na presença de elevada concentração de etanol, o ideal seria 1,30 V, não fosse tão desfavorável a relação sinal/ruído e, conseqüentemente, o limite de detecção. Como demonstrado previamente^[48], variações durante o processo de eletrooxidação e/ou

injeção podem ser compensados com o uso de um padrão interno que, no presente método, analítico, é o n-propanol. Embora 1,35 V represente uma boa condição de compromisso para a determinação de metanol frente a excesso de etanol, a conversão do n-propanol em propanoato ainda é pouco eficiente. Por essa razão, 1,4 V foi escolhido como valor de potencial a ser aplicado nos estudos subsequentes para determinação quantitativa de metanol e etanol em uísque de milho (*moonshine*).

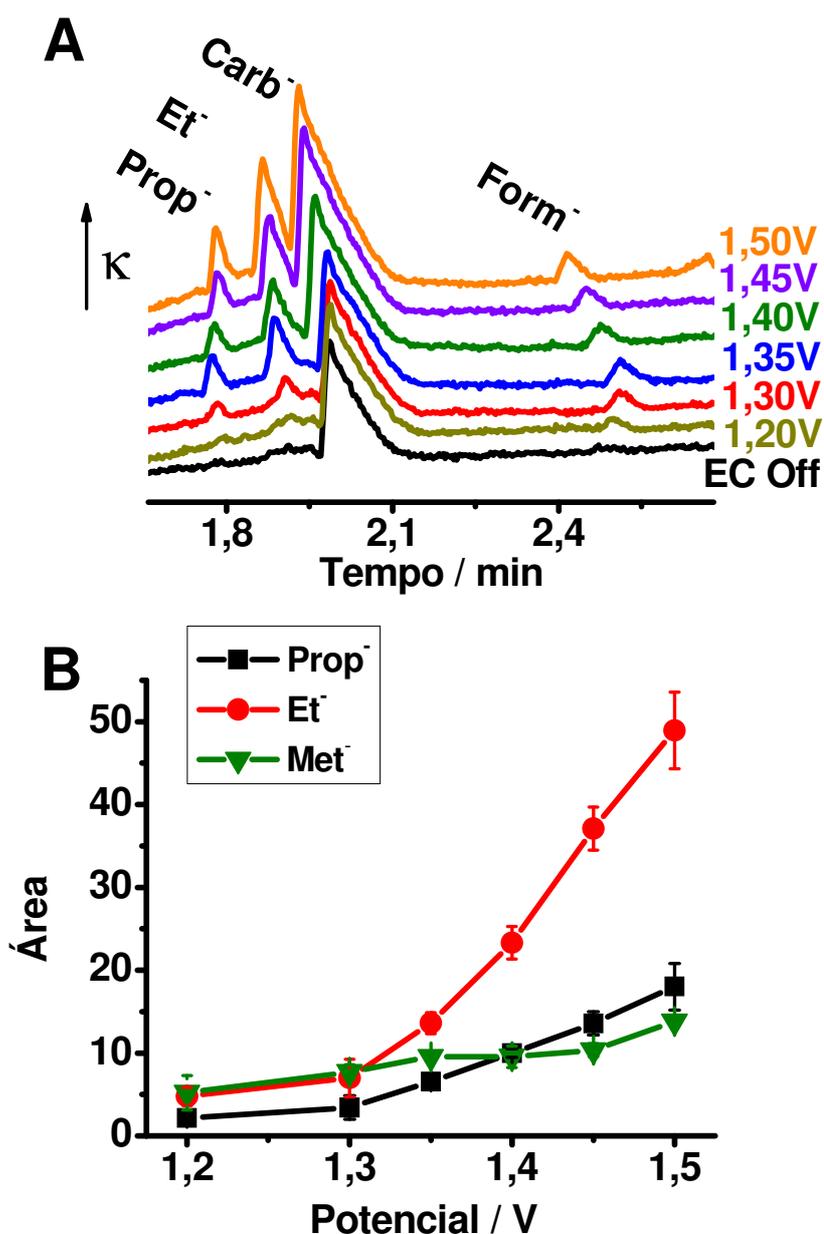


Figura 34: (A) Conjunto de eletroferogramas obtidos em diferentes potenciais após eletrooxidação de metanol, etanol e *n*-propanol, 1 mmol L^{-1} cada, em HNO_3 2 mmol L^{-1} . (B) Área dos picos dos carboxilatos em função do potencial aplicado para eletrooxidação dos álcoois. Tempo de oxidação: 60 s. Composição do BGE: CHES 10 mmol L^{-1} + NaOH 5 mmol L^{-1} . Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 33^[153].

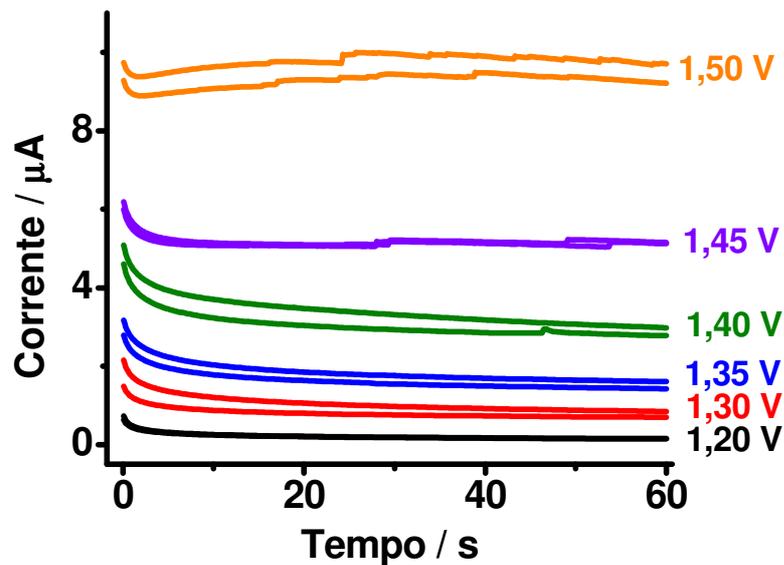


Figura 35: Sinais de corrente obtidos durante a eletrooxidação dos alcoóis em cada valor de potencial durante os experimentos reportados na Figura 34.

No sistema híbrido EC-CE-C⁴D desenvolvido, a injeção da amostra derivatizada foi realizada eletrocineticamente. No eletrólito utilizado para realizar a conversão eletroquímica (HNO_3 2 mmol L⁻¹, pH 2,7), os ácidos carboxílicos gerados encontram-se protonados (neutros), sendo injetados no capilar pela ação do EOF. Após a injeção, a amostra contida no reservatório SR/BR é substituída por BGE e a fonte de alta tensão é ligada. Nessas condições, a zona de amostra está localizada entre duas regiões contendo BGE (pH 9,2), com pH superior ao pKa dos ácidos carboxílicos de interesse (pKa ~4,7), de modo que durante a movimentação do EOF rumo ao detector, os ácidos carboxílicos se desprotonam, viabilizando a separação dos ânions resultantes. Um eletroferograma da separação dos ácidos carboxílicos gerados durante eletrooxidação de 1 mmol L⁻¹ da solução padrão de metanol, etanol e n-propanol em HNO_3 2 mmol L⁻¹, realizada no sistema híbrido EC-CE-C⁴D é apresentada na Figura 36. Nessas condições, a separação de metanoato, etanoato e propanoato foi alcançada em menos de 2,7 min. Como se vê na Figura 34, um pico correspondente a carbonato (identificado por fortificação com padrão) está

presente em todos os eletroferogramas, notando-se significativo aumento de área a partir de 1,4 V. Provavelmente o CO_2 dissolvido na amostra e no BGE vem se somar ao produzido durante eletrooxidação parcial dos álcoois. Os picos de carbonato não chegam a comprometer a separação (com linha de base) dos analitos de interesse.

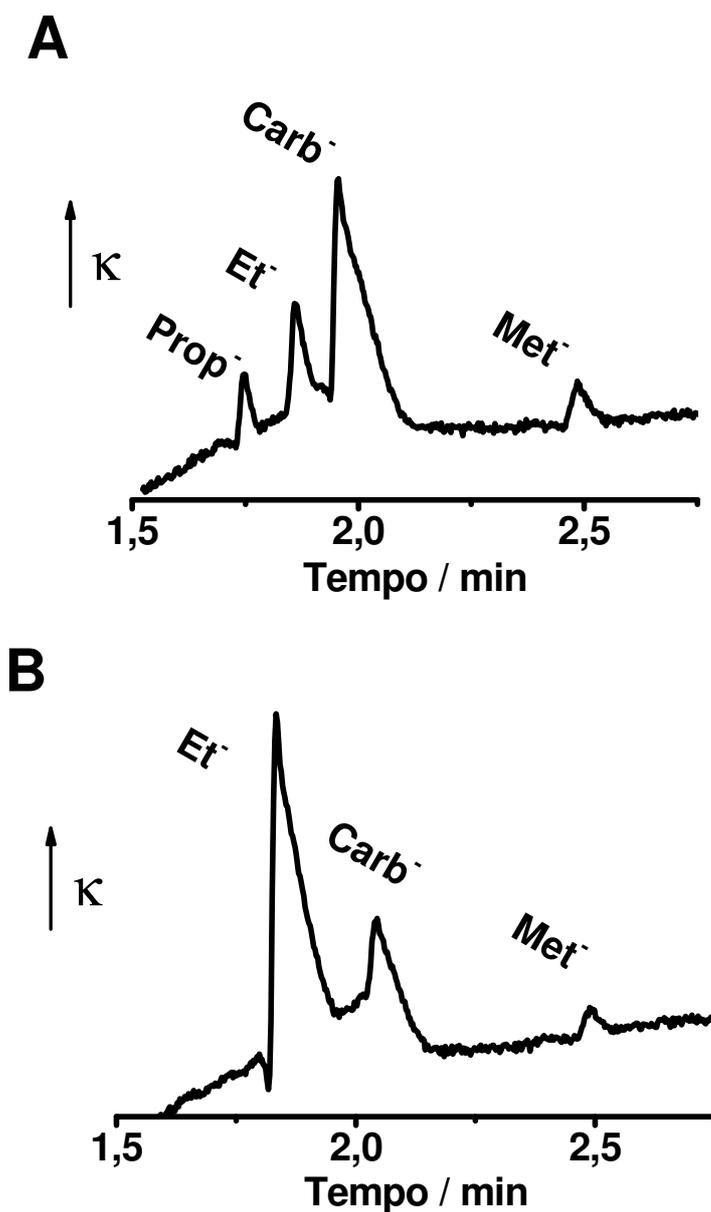


Figura 36: Separação dos carboxilatos gerados (A) a partir da eletrooxidação de 1 mmol L^{-1} de metanol, etanol e *n*-propanol em HNO_3 2 mmol L^{-1} e (B) primeira fração coletada da destilação da labmade moonshine diluída 50 vezes em HNO_3 2 mmol L^{-1} . Potencial de oxidação: 1,40 V (vs Ag). Tempo de oxidação: 60 s. Outros parâmetros semelhantes aos da Figura 29^[153].

4.5.2. Aplicação do Sistema Híbrido EC-CE-C⁴D

As soluções padrão de metanol, etanol e n-propanol, nas concentrações 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mmol L⁻¹, preparadas em HNO₃ 2 mmol L⁻¹, foram analisadas em triplicata usando o sistema híbrido EC-CE-C⁴D e os valores obtidos para equação da reta, coeficiente de correlação e limites de detecção (LD), encontram-se sumarizados na Tabela 2. Os coeficientes de correlação e LDs alcançados foram semelhantes aos obtidos anteriormente utilizando o equipamento de bancada^[48], ambos sem correções pelo padrão interno.

Tabela 2: Equação da reta, coeficiente de correlação (R) e limite de detecção (LD) obtido das curvas analíticas para metanol, etanol e n-propanol (de 0,1 a 5,0 mmol L⁻¹).^[153]

	Equação	Coeficiente de Correlação (R)	LOD (mmol L⁻¹) (3 x S) / a
n-Propanol	Y = 4,98 X + 1,77	0,999	0,040
Ethanol	Y = 10,1 X + 5,35	0,997	0,020
Methanol	Y = 3,47 X + 3,54	0,992	0,050

A fim de demonstrar o uso do sistema desenvolvido, uísque de milho (*moonshine*) foi escolhido como matriz real e complexa para determinação de metanol na presença de etanol. Como conhecido, durante o processo de fermentação de carboidratos, além de CO₂ e etanol (principais produtos), outras espécies orgânicas também são produzidas em menores quantidades, p. ex., outros álcoois (metanol e propanol), ésteres e cetonas. Usualmente, durante o processo de destilação, esses compostos são separados, total ou parcialmente, do etanol. Devido à elevada concentração de etanol presente em bebidas, especialmente nas destiladas, a quantificação de outras espécies, como metanol, se torna um desafio.

Uma batelada de *moonshine* foi produzida em escala laboratorial e consecutivas alíquotas foram coletadas durante o processo de destilação fracionada, correspondendo a 1^o, 2^o, 3^o, 4^o, 5^o e 10^o mL do destilado (10 mL) obtido de 150 mL de fermentado. Cada fração foi diluída 100 vezes no eletrólito de oxidação e analisada, em triplicata, usando o sistema híbrido EC-CE-C⁴D. A variação da porcentagem (vol./vol.) de etanol e metanol presente em cada fração em função da média da correspondente fração é apresentada na Figura 37. Como esperado, a quantidade de etanol aumentou em função da fração destilada, variando de aproximadamente 80 % (1^a fração) a 100 % (10^a fração), alcançando um teor alcoólico médio de 95 % (*proof of 190*) no volume total destilado (valor considerado como excelente para os fabricantes desse tipo de bebida - *moonshine homemade distillers*). Nas mesmas análises, aproximadamente 4 % de metanol foi encontrado na primeira fração, decrescendo a valores em torno de 0,1 % na décima fração.

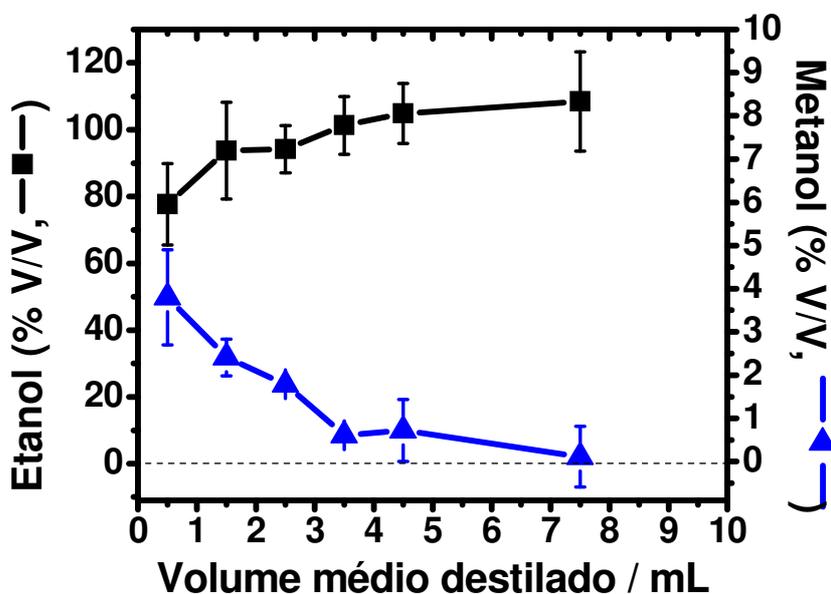


Figura 37: Variação da quantidade (vol./vol.) de etanol e metanol presente em cada fração da destilação da "labmade moonshine"^[153].

5. CONCLUSÃO

Empregando o sistema EC-CE-C⁴D foi possível, pela primeira vez, realizar simultaneamente, por CE, a separação e detecção de cátions, ânions e espécies neutras derivatizadas *in situ* (Figura 7). Devido ao desenho da célula eletroquímica em fluxo utilizada e à interface com o capilar do CE, não é necessário um tempo de eletrólise superior a 60 segundos para derivatização dos analitos neutros, podendo a determinação das espécies presentes no antisséptico bucal Listerine[®] ser realizada em menos de 3 minutos. A seleção do potencial aplicado para derivatização auxilia na escolha da sensibilidade e seletividade das espécies eletrooxidadas em relação a outras também presentes na amostra. A origem de duas espécies detectadas que não compõem o produto analisado, salicilato e formiato, foi elucidada como sendo provenientes da eletrooxidação do ácido benzóico (Figura 13). O sistema EC-CE-C⁴D também se apresenta como uma alternativa para avaliação de reações eletroquímicas e estudos de vias de oxidação ou redução. Apesar de não comparável à espectrometria de massa na capacidade de identificação dos picos e nos baixos limites de detecção, esse sistema é mais simples e barato e pode auxiliar em análises qualitativas e quantitativas de produtos de reação de eletrodo, especificamente os iônicos ou ionizáveis.

Em eletrodo de platina, voltamogramas cíclicos apresentam em meio alcalino uma densidade de corrente muito superior à obtida no meio ácido para a eletrooxidação de álcoois, porém com o sistema EC-CE-C⁴D mostrou-se que em meio ácido (Figura 14) uma concentração muito maior dos carboxilatos é encontrada quando comparada à obtida em meio alcalino (Figura 18). O mesmo rendimento superior de carboxilatos em meio ácido foi observado para eletrooxidações sobre

eletrodo de ouro (Figura 19 *versus* Figura 23), porém, em meio alcalino observa-se a oxidação dos álcoois em valores mais baixos de potencial (a partir de 0,85 V). Comparando os eletrodos de ouro e platina em meio ácido, observou-se que o eletrodo de ouro apresenta alguma seletividade favorecendo a oxidação dos álcoois de cadeia menor. Para o mesmo sinal de pentanoato, o etanoato apresentou sinal aproximadamente 4 vezes maior que o obtido em eletrodo de platina em certas condições (Figura 24).

Na colaboração prestada ao estudo da eletrólise de glicerol visando à produção de gliceraldeído e/ou dihidroxiacetona, o método proposto para análise desses polióis neutros por CE-C⁴D apresentou resultados satisfatórios, permitindo a separação dos picos de glicerol, gliceraldeído e dihidroxiacetona após formação de complexos com borato. A separação e detecção dos padrões deu-se em menos de 3 minutos. Nas condições estudadas, a eletrooxidação *ex-situ* do glicerol não ensejou a formação intermediária de concentração detectável de gliceraldeído e dihidroxiacetona, visto que apenas ácidos carboxílicos foram observados.

O equipamento de CE com dois detectores C⁴D mostrou-se valioso para monitorar a interação dos ácidos carboxílicos com CTAB e Polybrene[®], modificadores de superfície geralmente empregados para inverter o EOF. O glioxilato e mesoxalato foram às espécies que apresentaram maior interação, visto a maior redução do sinal correspondente a essas espécies do primeiro detector para o segundo.

No que se refere às contribuições da tese voltadas à miniaturização de dispositivos, o simples recobrimento prévio de lâminas de vidro com parafina viabilizou o processo de gravação e corte de vidro por ablação a laser de CO₂ sem ocorrência de fraturas ou de trincas significativas. O perfil dos canais obtidos tem o

favorável aspecto semicircular, com raio controlável pela potência e pela velocidade de deslocamento do feixe de radiação. O microdispositivo construído permitiu realizar a separação de dopamina, catecol e ácido úrico em menos de 100 s. Apesar dos canais apresentarem resolução e aspecto inferiores aos obtidos pelos métodos fotolitográficos, poderão, assim mesmo, ser apropriados para a construção de microdispositivos funcionais, unindo baixo custo, rapidez, eficiência e versatilidade de prototipagem por ablação a laser, já reconhecida e utilizada em materiais poliméricos, com a qualidade e características do vidro, especialmente para aplicação em eletroforese em microchip.

A derivatização eletroquímica para eletroforese capilar em microchip é, pela primeira vez, apresentada. O sistema híbrido desenvolvido, de fácil montagem, permitiu realizar a quantificação de álcoois primários por CE-C⁴D, após conversão eletroquímica aos respectivos carboxilatos. Etanol e n-propanol apresentaram uma dependência linear do potencial aplicado durante a eletrooxidação, para valores superiores a 1,30 V (vs. Ag), enquanto que a conversão do metanol em metanoato não apresentou variações significativas (de 1,30 V a 1,45 V). A separação dos analitos de interesse foi realizada em menos de 2,7 min e os LDs estimados para os álcoois, com base na região de 0,10 a 5,0 mmol L⁻¹, variaram de 20 µmol L⁻¹ para o etanol e 40 e 50 µmol L⁻¹ para o n-propanol e o metanol. A análise do destilado alcoólico de milho fermentado no laboratório, *moonshine*, apresentou um aumento na concentração de etanol (variando de ~80 % a ~100 %) e simultâneo decréscimo da concentração de metanol (variando de 4 % a ~0,1 %) em função das frações destiladas, justificando o procedimento usual de desprezar a “cabeça” (e a “cauda”) do destilado. Nesse contexto, esse sistema se mostrou favorável para monitorar álcoois alifáticos durante, p. ex., processos de fermentação/destilação.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Até o momento, o sistema automatizado em fluxo EC-CE-C⁴D possibilitou: (i) determinar alguns metais tóxicos em nível traço após pré-concentração eletroquímica do metal sobre eletrodo de trabalho, seguido de redissolução eletroquímica, separação eletroforética e detecção por C⁴D^[27,28]; (ii) estudar processos eletrocatalíticos sobre diferentes materiais de eletrodos, como demonstrado na determinação dos produtos da eletrooxidação do glicerol^[47]; (iii) realizar determinação quantitativa de espécies neutras por CE, após derivatização eletroquímica, exemplificado na determinação de álcoois alifáticos primários, separando e detectando os carboxilatos gerados^[48]; e (iv) realizar a determinação simultânea de cátions, ânions (no contra fluxo) e espécies neutras (após derivatização eletroquímica) por CE^[17]. Esses trabalhos pioneiros indicam a potencialidade da hifenação de célula eletroquímica com eletroforese capilar no sistema EC-CE-C⁴D que, por ser ainda recente, carece de estudos mais aprofundados para investigar e ampliar suas aplicações, tais como:

a) Verificar a possibilidade de diferenciar álcoois de aldeídos durante o processo de eletrooxidação, por exemplo, em condições que favoreçam a oxidação de uma função frente à outra, permitindo a determinação consecutiva de aldeídos e álcoois na mesma amostra por EC-CE-C⁴D;

b) Investigar a derivatização eletroquímica de açúcares visando sua separação e determinação quantitativa por EC-CE-C⁴D ou mesmo de açúcares e álcoois, por exemplo, em bebidas.

Quanto à miniaturização da instrumentação para EC-CE-C⁴D, o aperfeiçoamento do sistema híbrido elaborado passa pela busca da melhora na eficiência da conversão dos álcoois nos carboxilatos e da sua transferência para o canal de separação (injeção). A nova tecnologia de gravação de canais em vidro por ablação a laser de CO₂ abre perspectivas de construção rápida e acessível de microdispositivos e poderá ser útil para investigar a possibilidade de evoluir do sistema EC-CE-C⁴D híbrido para outro em que, preferencialmente, todas as etapas (derivatização eletroquímica, separação eletroforética e detecção condutométrica sem contato) sejam implementadas num único dispositivo predominantemente de vidro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Tiselius, A., **A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures.** *Trans. Faraday Soc.* **1937**, *33* (0), 524-531.
- [2] Tavares, M. F. M., **Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.** *Quim. Nova* **1996**, *19* (2), 9.
- [3] Hjertén, S., **Free Zone Electrophoresis.** *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9* (2), 122-219.
- [4] Pretorius, V.; Hopkins, B. J.; Schieke, J. D., **Electro-Osmosis.** *J. Chromatogr. A* **1974**, *99*, 23-30.
- [5] Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D., **Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries.** *Anal. Chem.* **1981**, *53* (8), 1298-1302.
- [6] Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T., **Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries.** *Anal. Chem.* **1984**, *56* (1), 111-113.
- [7] Timerbaev, A. R., **Recent Advances and Trends in Capillary Electrophoresis of Inorganic Ions.** *Electrophoresis* **2002**, *23* (22-23), 3884-3906.
- [8] Johns, C.; Breadmore, M. C.; Macka, M.; Ryvolová, M.; Haddad, P. R., **Recent Significant Developments in Detection and Method Development for the Determination of Inorganic Ions by CE.** *Electrophoresis* **2009**, *30* (S1), S53-S67.
- [9] Kartsova, L. A.; Bessonova, E. A.; Kolobova, E. A., **Ionic Liquids as Modifiers of Chromatographic and Electrophoretic Systems.** *J. Anal. Chem.* **2016**, *71* (2), 141-152.
- [10] Sánchez-López, E.; Marina, M. L.; Crego, A. L., **Improving the Sensitivity in Chiral Capillary Electrophoresis.** *Electrophoresis* **2016**, *37* (1), 19-34.
- [11] Stavrou, I. J.; Mavroudi, M. C.; Kapnissi-Christodoulou, C. P., **Chiral Selectors in CE: Recent Developments and Applications (2012-mid 2014).** *Electrophoresis* **2015**, *36* (1), 101-123.
- [12] Zhu, Z.; Lu, J. J.; Liu, S., **Protein Separation by Capillary Gel Electrophoresis: A Review.** *Anal. Chim. Acta* **2012**, *709*, 21-31.
- [13] Dolník, V., **Capillary Gel Electrophoresis.** *J. Microcolumn Sep.* **1994**, *6* (4), 315-330.

- [14] Mikšík, I.; Sedláková, P.; Mikulíková, K.; Eckhardt, A.; Cserhati, T.; Horváth, T., **Matrices for Capillary Gel Electrophoresis - A Brief Overview of Uncommon Gels.** *Biomedical Chromatography* **2006**, *20* (6-7), 458-465.
- [15] Riekkola, M.-L., **Recent Advances in Nonaqueous Capillary Electrophoresis.** *Electrophoresis* **2002**, *23* (22-23), 3865-3883.
- [16] Teng, H.; Yuan, B.-Q.; You, T.-Y., **Recent Advances in Application of Nonaqueous Capillary Electrophoresis.** *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, *38* (11), 1670-1677.
- [17] Santos, M. S. F.; Lopes, F. S.; Gutz, I. G. R., **Electrochemical Derivatization-Capillary Electrophoresis-Contactless Conductivity Detection: A Versatile Strategy for Simultaneous Determination of Cationic, Anionic, and Neutral Analytes.** *Electrophoresis* **2014**, *35* (6), 864-869.
- [18] Holler, J. F.; Skoog, D. A., **Princípios de Análise Instrumental.** Bookman Companhia Ed: Brasil, 2009; p 1056.
- [19] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, J. F.; Crouch, S. R., **Fundamentos da Química Analítica.** Cengage Learning: Brasil, 2014; p 950.
- [20] Tavares, M. F. M., **Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar.** *Quim. Nova* **1997**, *20* (5), 19.
- [21] Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O., **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications.** Oxford University Press: Oxford, 1993; p 464.
- [22] Wen, Y.; Li, J.; Ma, J.; Chen, L., **Recent Advances in Enrichment Techniques for Trace Analysis in Capillary Electrophoresis.** *Electrophoresis* **2012**, *33* (19-20), 2933-2952.
- [23] Breadmore, M. C.; Tubaon, R. M.; Shallan, A. I.; Phung, S. C.; Abdul Keyon, A. S.; Gstoettenmayr, D.; Prapatpong, P.; Alhusban, A. A.; Ranjbar, L.; See, H. H.; Dawod, M.; Quirino, J. P., **Recent Advances in Enhancing the Sensitivity of Electrophoresis and Electrochromatography in Capillaries and Microchips (2012–2014).** *Electrophoresis* **2015**, *36* (1), 36-61.
- [24] de Moraes, M. L. L.; de Moraes, S. L.; Pereira, E. A.; Tavares, M. F. M., **Estratégias de Pré-Concentração em Eletroforese Capilar (CE). Parte 1: Manipulação da Velocidade Eletroforética do Analito.** *Quim. Nova* **2009**, *32* (4), 6.

- [25] Puig, P.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C., **Sorbent Preconcentration Procedures Coupled to Capillary Electrophoresis for Environmental and Biological Applications.** *Anal. Chim. Acta* **2008**, *616* (1), 1-18.
- [26] Puig, P.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C., **Recent Advances in Coupling Solid-Phase Extraction and Capillary Electrophoresis (SPE–CE).** *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26* (7), 664-678.
- [27] Lopes, F. S.; Junior, O. A.; Gutz, I. G. R., **Fully Electrochemical Hyphenated Flow System for Preconcentration, Cleanup, Stripping, Capillary Electrophoresis with Stacking and Contactless Conductivity Detection of Trace Heavy Metals.** *Electrochem. Commun.* **2010**, *12* (10), 1387-1390.
- [28] Lopes, F. S.; Coelho, L. H. G.; Gutz, I. G. R., **Automated Two-Dimensional Separation Flow System with Electrochemical Preconcentration, Stripping, Capillary Electrophoresis and Contactless Conductivity Detection for Trace Metal Ion Analysis.** *Electrophoresis* **2011**, *32* (8), 939-946.
- [29] van der Steen, C.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M.; Poulis, J. A., **A.C. Conductivity Measurements in Isotachophoresis.** *Anal. Chim. Acta* **1972**, *59* (2), 298-301.
- [30] Huang, X.; Pang, T. K. J.; Gordon, M. J.; Zare, R. N., **On-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis.** *Anal. Chem.* **1987**, *59* (23), 2747-2749.
- [31] Katzmayr, M. U.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W., **Optimization of Conductivity Detection of Low-Molecular-Mass Anions in Capillary Zone Electrophoresis.** *J. Chromatogr. A* **1999**, *850* (1–2), 355-362.
- [32] Fracassi da Silva, J. A.; do Lago, C. L., **An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis.** *Anal. Chem.* **1998**, *70* (20), 4339-4343.
- [33] Zemmann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K., **Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis.** *Anal. Chem.* **1998**, *70* (3), 563-567.
- [34] Kubáň, P.; Hauser, P. C., **Contactless Conductivity Detection for Analytical Techniques - Developments From 2012 to 2014.** *Electrophoresis* **2015**, *36* (1), 195-211.
- [35] Brito-Neto, J. G. A.; Fracassi da Silva, J. A.; Blanes, L.; do Lago, C. L., **Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 2. Peak Shape, Stray Capacitance, Noise, and Actual Electronics.** *Electroanalysis* **2005**, *17* (13), 1207-1214.

- [36] Brito-Neto, J. G. A.; Fracassi da Silva, J. A.; Blanes, L.; do Lago, C. L., **Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals.** *Electroanalysis* **2005**, *17* (13), 1198-1206.
- [37] Kubáň, P.; Hauser, P. C., **Ten Years of Axial Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection for CZE – A Review.** *Electrophoresis* **2009**, *30* (1), 176-188.
- [38] Schieffer, G. W., **Pre-Column Electrochemical Cell for High-Performance Liquid Chromatography.** *Anal. Chem.* **1979**, *51* (9), 1573-1575.
- [39] Chen, Y.; Edwards, B. L.; Dasgupta, P. K.; Srinivasan, K., **pH- and Concentration-Programmable Electrolytic Buffer Generator.** *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 59-66.
- [40] Chen, Y.; Srinivasan, K.; Dasgupta, P. K., **Electrolytic Membrane Suppressors for Ion Chromatography Make Programmable Buffer Generators.** *Anal. Chem.* **2012**, *84* (1), 67-75.
- [41] Bulska, E.; Wałcerz, M.; Jędral, W.; Hulanicki, A., **On-Line Preconcentration of Lead and Cadmium for Flame Atomic Absorption Spectrometry Using a Flow-Through Electrochemical Microcell.** *Anal. Chim. Acta* **1997**, *357* (1–2), 133-140.
- [42] Esaka, Y.; Okumura, N.; Uno, B.; Goto, M., **Electrophoretic Analysis of Quinone Anion Radicals in Acetonitrile Solutions Using an On-Line Radical Generator.** *Electrophoresis* **2003**, *24* (10), 1635-1640.
- [43] Matysik, F.-M., **Electrochemically Assisted Injection – A New Approach for Hyphenation of Electrochemistry with Capillary-Based Separation Systems.** *Electrochem. Commun.* **2003**, *5* (12), 1021-1024.
- [44] Scholz, R.; Matysik, F.-M., **A Novel Approach for the Separation of Neutral Analytes by Means of Electrochemically Assisted Injection Coupled to Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry.** *Analyst* **2011**, *136* (8), 1562-1565.
- [45] Palatzky, P.; Matysik, F.-M., **Development and Characterization of a Novel Semiautomated Arrangement for Electrochemically Assisted Injection in Combination with Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry.** *Electrophoresis* **2012**, *33* (17), 2689-2694.
- [46] Antunes Junior, O. **Novos Dispositivos de Microextração e Pré-Concentração para Eletroforese Capilar Utilizando Membranas Microporosas ou Processos**

Eletroquímicos e Sua Potencialidade na Análise de Aminas e Metais. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

[47] Lopes, F. S.; Nogueira, T.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., **Capillary Electrophoresis Assisted Flow System for In Situ Analysis of Products of Heterogeneous Electrocatalytic and Catalytic Processes: Application to the Oxidation of Glycerol.** *Electroanalysis* **2011**, *23* (11), 2516-2519.

[48] Santos, M. S. F.; Lopes, F. S.; Vidal, D. T. R.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., **From Sample Processing to Quantification: A Full Electrochemical Approach for Neutral Analyte Derivatization, Capillary Electrophoresis Separation, and Contactless Conductivity Detection.** *Anal. Chem.* **2012**, *84* (18), 7599-7602.

[49] Terabe, S., **Micellar Electrokinetic Chromatography.** *Anal. Chem.* **2004**, *76* (13), 240 A-246 A.

[50] Terabe, S., **Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography.** *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2* (1), 99-120.

[51] Tůma, P.; Málková, K.; Wedellová, Z.; Samcová, E.; Štulík, K., **The Use of Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection for Monitoring of Glycerol in Adipose Tissues During a Sporting Performance.** *Electrophoresis* **2010**, *31* (12), 2037-2043.

[52] Underberg, W. J. M.; Waterval, J. C. M., **Derivatization Trends in Capillary Electrophoresis: An Update.** *Electrophoresis* **2002**, *23* (22-23), 3922-3933.

[53] Terabe, S., **Selectivity Manipulation in Micellar Electrokinetic Chromatography.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, *10* (10), 705-715.

[54] Silva, M., **Mekc: An Update Focusing on Practical Aspects.** *Electrophoresis* **2007**, *28* (1-2), 174-192.

[55] Terabe, S.; Miyashita, Y.; Shibata, O.; Barnhart, E. R.; Alexander, L. R.; Patterson, D. G.; Karger, B. L.; Hosoya, K.; Tanaka, N., **Separation of Highly Hydrophobic Compounds by Cyclodextrin-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography.** *J. Chromatogr. A* **1990**, *516* (1), 23-31.

[56] Terabe, S.; Miyashita, Y.; Ishihama, Y.; Shibata, O., **Cyclodextrin-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography: Separation of Hydrophobic and Enantiomeric Compounds.** *J. Chromatogr. A* **1993**, *636* (1), 47-55.

- [57] Furmaniak, P.; Kubalczyk, P.; Głowacki, R., **Determination of Homocysteine Thiolactone in Urine by Field Amplified Sample Injection and Sweeping MEKC Method with UV Detection.** *J. Chromatogr. B* **2014**, *961*, 36-41.
- [58] Furmaniak, P.; Kubalczyk, P.; Stachniuk, J.; Głowacki, R., **Novel MEKC Method for Determination of Sodium 2-Mercaptoethanesulfonate in Human Plasma with In-Capillary Derivatization and UV Detection.** *J. Chromatogr. B* **2016**, *1027*, 88-95.
- [59] Herrero, M.; Ibáñez, E.; Fanali, S.; Cifuentes, A., **Quantitation of Chiral Amino Acids from Microalgae by MEKC and LIF Detection.** *Electrophoresis* **2007**, *28* (15), 2701-2709.
- [60] Brensinger, K.; Rollman, C.; Copper, C.; Genzman, A.; Rine, J.; Lurie, I.; Moini, M., **Novel CE-MS Technique for Detection of High Explosives Using Perfluorooctanoic Acid as a MEKC and Mass Spectrometric Complexation Reagent.** *Forensic Sci. Int.* **2016**, *258*, 74-79.
- [61] Fracassi da Silva, J. A.; do Lago, C. L., **Conductivity Detection of Aliphatic Alcohols in Micellar Electrokinetic Chromatography Using an Oscillometric Detector.** *Electrophoresis* **2000**, *21* (7), 1405-1408.
- [62] Vochyánová, B.; Opekar, F.; Tůma, P., **Simultaneous and Rapid Determination of Caffeine and Taurine in Energy Drinks by MEKC in a Short Capillary with Dual Contactless Conductivity/Photometry Detection.** *Electrophoresis* **2014**, *35* (11), 1660-1665.
- [63] Wu, T.; Wang, W. Y.; Jiang, L. M.; Chu, Q. C.; Delaire, J.; Ye, J. N., **Determination of Natural and Synthetic Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) in Sewage Based on SPE and MEKC with Amperometric Detection.** *Chromatographia* **2008**, *68* (5), 339.
- [64] Escrig-Doménech, A.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-Martínez, J. M.; Ramis-Ramos, G., **Derivatization of Hydroxyl Functional Groups for Liquid Chromatography and Capillary Electroseparation.** *J. Chromatogr. A* **2013**, *1296*, 140-156.
- [65] Adegoke, O. A., **An Overview of Applications of Pre-Column Derivatization Reactions for the Liquid Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals and Other Compounds.** *Afr. J. Pure Appl. Chem.* **2012**, *12* (14), 12.
- [66] Wuethrich, A.; Quirino, J. P., **Derivatisation for Separation and Detection in Capillary Electrophoresis (2012–2015).** *Electrophoresis* **2016**, *37* (1), 45-55.

- [67] Waterval, J. C. M.; Lingeman, H.; Bult, A.; Underberg, W. J. M., **Derivatization Trends in Capillary Electrophoresis**. *Electrophoresis* **2000**, *21* (18), 4029-4045.
- [68] Lee, A. W. M.; Liu, L.; Lau, D.; Chan, R., **Capillary Zone Electrophoresis Determination of Aliphatic Alcohols Derivatized to Their Dithiocarbonates Using Phase Transfer Catalysis**. *Anal. Lett.* **1999**, *32* (6), 1235-1243.
- [69] Nogueira, T.; Lago, C. L. d., **Determination of Ca, K, Mg, Na, Sulfate, Phosphate, Formate, Acetate, Propionate, and Glycerol in Biodiesel by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection**. *Microchem. J.* **2011**, *99* (2), 267-272.
- [70] Gonçalves Filho, L. C.; Micke, G. A., **Development and Validation of a Fast Method for Determination of Free Glycerol in Biodiesel by Capillary Electrophoresis**. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1154* (1-2), 477-480.
- [71] Koike, R.; Kitagawa, F.; Otsuka, K., **Separation of Fatty Alcohol Ethoxylates by Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography**. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (3), 399-407.
- [72] Mainka, A.; Bächmann, K., **UV Detection of Derivatized Carbonyl Compounds in Rain Samples in Capillary Electrophoresis Using Sample Stacking and a Z-Shaped Flow Cell**. *J. Chromatogr. A* **1997**, *767* (1), 241-247.
- [73] He, J.-B.; Cui, T.; Zhang, W.-W.; Deng, N., **A Chip-Type Thin-Layer Electrochemical Cell Coupled with Capillary Electrophoresis for Online Separation of Electrode Reaction Products**. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *786*, 159-165.
- [74] Drozd, J., **Chemical Derivatization in Gas Chromatography**. *J. Chromatogr. A* **1975**, *113* (3), 303-356.
- [75] Meng, H.-B.; Wang, T.-R.; Guo, B.-Y.; Hashi, Y.; Guo, C.-X.; Lin, J.-M., **Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Cations in Explosive Residues by Ion Chromatography**. *Talanta* **2008**, *76* (2), 241-245.
- [76] Morganti, A.; Becagli, S.; Castellano, E.; Severi, M.; Traversi, R.; Udusti, R., **An Improved Flow Analysis-Ion Chromatography Method for Determination of Cationic and Anionic Species at Trace Levels in Antarctic Ice Cores**. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *603* (2), 190-198.
- [77] Sáiz, J.; Koenka, I. J.; Mai, T. D.; Hauser, P. C.; García-Ruiz, C., **Simultaneous Separation of Cations and Anions in Capillary Electrophoresis**. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *62*, 162-172.

- [78] Koenka, I. J.; Mai, T. D.; Hauser, P. C.; Saiz, J., **Simultaneous Separation of Cations and Anions in Capillary Electrophoresis - Recent Applications**. *Anal. Methods* **2016**, *8* (7), 1452-1456.
- [79] Johns, C.; Yang, W.; Macka, M.; Haddad, P. R., **Simultaneous Separation of Anions and Cations by Capillary Electrophoresis with High Magnitude, Reversed Electroosmotic Flow**. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1050* (2), 217-222.
- [80] da Silva, I. S.; Vidal, D. T. R.; do Lago, C. L.; Angnes, L., **Fast Simultaneous Determination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole by Capillary Zone Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection**. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36* (8), 1405-1409.
- [81] Mai, T. D.; Hauser, P. C., **Simultaneous Separations of Cations and Anions by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection Employing a Sequential Injection Analysis Manifold for Flexible Manipulation of Sample Plugs**. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1267*, 266-272.
- [82] Kubáň, P.; Kubáň, P.; Kubáň, V., **Simultaneous Determination of Inorganic and Organic Anions, Alkali, Alkaline Earth and Transition Metal Cations by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductometric Detection**. *Electrophoresis* **2002**, *23* (21), 3725-3734.
- [83] Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.-A.; Manz, A., **Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology**. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (12), 2623-2636.
- [84] Terry, S. C.; Jerman, J. H.; Angell, J. B., **A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer**. *IEEE Trans. Electron Devices* **1979**, *26* (12), 1880-1886.
- [85] Manz, A.; Miyahara, Y.; Miura, J.; Watanabe, Y.; Miyagi, H.; Sato, K., **Design of an Open-Tubular Column Liquid Chromatograph Using Silicon Chip Technology**. *Sens. Actuat. B Chem.* **1990**, *1* (1-6), 249-255.
- [86] Harrison, D. J.; Manz, A.; Fan, Z.; Luedi, H.; Widmer, H. M., **Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip**. *Anal. Chem.* **1992**, *64* (17), 1926-1932.
- [87] Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E.; Widmer, H. M., **Planar Chips Technology for Miniaturization of Separation Systems - A Developing Perspective in Chemical Monitoring**. *Adv. Chromatogr.* **1993**, *33*, 1-66.

- [88] Kopp, M. U.; Crabtree, H. J.; Manz, A., **Developments in Technology and Applications of Microsystems**. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1* (3), 410-419.
- [89] Dolník, V.; Liu, S.; Jovanovich, S., **Capillary Electrophoresis on Microchip**. *Electrophoresis* **2000**, *21* (1), 41-54.
- [90] McCreedy, T., **Fabrication Techniques and Materials Commonly Used for the Production of Microreactors and Micro Total Analytical Systems**. *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19* (6), 396-401.
- [91] Lacher, N. A.; Garrison, K. E.; Martin, R. S.; Lunte, S. M., **Microchip Capillary Electrophoresis/ Electrochemistry**. *Electrophoresis* **2001**, *22* (12), 2526-2536.
- [92] Vandaveer, W. R.; Pasas, S. A.; Martin, R. S.; Lunte, S. M., **Recent Developments in Amperometric Detection for Microchip Capillary Electrophoresis**. *Electrophoresis* **2002**, *23* (21), 3667-3677.
- [93] Vandaveer, W. R.; Pasas-Farmer, S. A.; Fischer, D. J.; Frankenfeld, C. N.; Lunte, S. M., **Recent Developments in Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis**. *Electrophoresis* **2004**, *25* (21-22), 3528-3549.
- [94] Auroux, P.-A.; Iossifidis, D.; Reyes, D. R.; Manz, A., **Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications**. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (12), 2637-2652.
- [95] Chen, Y.; Pépin, A., **Nanofabrication: Conventional and Nonconventional Methods**. *Electrophoresis* **2001**, *22* (2), 187-207.
- [96] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M., **Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)**. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (23), 4974-4984.
- [97] McDonald, J. C.; Duffy, D. C.; Anderson, J. R.; Chiu, D. T.; Wu, H.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M., **Fabrication of Microfluidic Systems in Poly(Dimethylsiloxane)**. *Electrophoresis* **2000**, *21* (1), 27-40.
- [98] Liu, Y.; Ganser, D.; Schneider, A.; Liu, R.; Grodzinski, P.; Kroutchinina, N., **Microfabricated Polycarbonate CE Devices for DNA Analysis**. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (17), 4196-4201.
- [99] Shadpour, H.; Hupert, M. L.; Patterson, D.; Liu, C.; Galloway, M.; Stryjewski, W.; Goettert, J.; Soper, S. A., **Multichannel Microchip Electrophoresis Device Fabricated in Polycarbonate with an Integrated Contact Conductivity Sensor Array**. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (3), 870-878.

- [100] do Lago, C. L.; da Silva, H. D. T.; Neves, C. A.; Brito-Neto, J. G. A.; Fracassi da Silva, J. A., **A Dry Process for Production of Microfluidic Devices Based on the Lamination of Laser-Printed Polyester Films.** *Anal. Chem.* **2003**, *75*(15), 3853-3858.
- [101] Coltro, W. K. C.; Fracassi da Silva, J. A.; da Silva, H. D. T.; Richter, E. M.; Furlan, R.; Angnes, L.; do Lago, C. L.; Mazo, L. H.; Carrilho, E., **Electrophoresis Microchip Fabricated by A Direct-Printing Process with End-Channel Amperometric Detection.** *Electrophoresis* **2004**, *25*(21-22), 3832-3839.
- [102] Martynova, L.; Locascio, L. E.; Gaitan, M.; Kramer, G. W.; Christensen, R. G.; MacCrehan, W. A., **Fabrication of Plastic Microfluid Channels by Imprinting Methods.** *Anal. Chem.* **1997**, *69*(23), 4783-4789.
- [103] Galloway, M.; Stryjewski, W.; Henry, A.; Ford, S. M.; Llopis, S.; McCarley, R. L.; Soper, S. A., **Contact Conductivity Detection in Poly(methyl methacrylate)-Based Microfluidic Devices for Analysis of Mono- and Polyanionic Molecules.** *Anal. Chem.* **2002**, *74*(10), 2407-2415.
- [104] Hong, T.-F.; Ju, W.-J.; Wu, M.-C.; Tai, C.-H.; Tsai, C.-H.; Fu, L.-M., **Rapid Prototyping of PMMA Microfluidic Chips Utilizing a CO₂ Laser.** *Microfluid. Nanofluid.* **2010**, *9*(6), 1125-1133.
- [105] Gabriel, E. F. M.; Coltro, W. K. T.; Garcia, C. D., **Fast and Versatile Fabrication of PMMA Microchip Electrophoretic Devices by Laser Engraving.** *Electrophoresis* **2014**, *35*(16), 2325-2332.
- [106] Shadpour, H.; Musyimi, H.; Chen, J.; Soper, S. A., **Physicochemical Properties of Various Polymer Substrates and Their Effects on Microchip Electrophoresis Performance.** *J. Chromatogr. A* **2006**, *1111*(2), 238-251.
- [107] Fogarty, B. A.; Heppert, K. E.; Cory, T. J.; Hulbutta, K. R.; Martin, R. S.; Lunte, S. M., **Rapid Fabrication of Poly(Dimethylsiloxane)-Based Microchip Capillary Electrophoresis Devices Using CO₂ Laser Ablation.** *Analyst* **2005**, *130*(6), 924-930.
- [108] Nisar, S.; Li, L.; Sheikh, M. A., **Laser Glass Cutting Techniques - A Review.** *J. Laser Appl.* **2013**, *25*(4), 042010.
- [109] Prakash, S.; Kumar, S., **Fabrication of Microchannels on Transparent PMMA Using CO₂ Laser (10.6 μm) For Microfluidic Applications: An Experimental Investigation.** *Int. J. Precis. Eng. Man.* **2015**, *16*(2), 361-366.

- [110] Yen, M.-H.; Cheng, J.-Y.; Wei, C.-W.; Chuang, Y.-C.; Young, T.-H., **Rapid Cell-Patterning and Microfluidic Chip Fabrication by Crack-Free CO₂ Laser Ablation on Glass**. *J. Micromech. Microeng.* **2006**, *16*(7), 1143.
- [111] Chung, C. K.; Lin, S. L., **CO₂ Laser Micromachined Crackless Through Holes of Pyrex 7740 Glass**. *Int. J. Mach. Tool Manuf.* **2010**, *50*(11), 961-968.
- [112] da Costa, E. T.; Santos, M. S. F.; Jiao, H.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R.; Garcia, C. D., **Fast Production of Microfluidic Devices by CO₂ Laser Engraving of Wax-Coated Glass Slides**. *Electrophoresis* **2016**, *37*(12), 1691-1695.
- [113] Kubáň, P.; Hauser, P. C., **Fundamentals of Electrochemical Detection Techniques for CE and MCE**. *Electrophoresis* **2009**, *30*(19), 3305-3314.
- [114] Coltro, W. K. T.; Piccin, E.; de Jesus, D. P.; Fracassi da Silva, J. A.; da Silva, H. D. T.; do Lago, C. L.; Carrilho, E., **Microsistemas de Análises Químicas. Introdução, Tecnologias de Fabricação, Instrumentação e Aplicações**. *Quim. Nova* **2007**, *30*(8), 15.
- [115] Matysik, F.-M., **Advances in Amperometric and Conductometric Detection in Capillary and Chip-Based Electrophoresis**. *Microchim. Acta* **2008**, *160*(1), 1-14.
- [116] Wang, J.; Chatrathi, M. P.; Tian, B.; Polsky, R., **Capillary Electrophoresis Chips with Thick-Film Amperometric Detectors: Separation and Detection of Hydrazine Compounds**. *Electroanalysis* **2000**, *12*(9), 691-694.
- [117] Ding, Y.; Ayon, A.; García, C. D., **Electrochemical Detection of Phenolic Compounds Using Cylindrical Carbon-Ink Electrodes and Microchip Capillary Electrophoresis**. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*(2), 244-251.
- [118] Garcia, C. D.; Henry, C. S., **Comparison of Pulsed Electrochemical Detection Modes Coupled with Microchip Capillary Electrophoresis**. *Electroanalysis* **2005**, *17*(3), 223-230.
- [119] Garcia, C. D.; Henry, C. S., **Direct Detection of Renal Function Markers Using Microchip CE with Pulsed Electrochemical Detection**. *Analyst* **2004**, *129*(7), 579-584.
- [120] Garcia, C. D.; Henry, C. S., **Direct Determination of Carbohydrates, Amino Acids, and Antibiotics by Microchip Electrophoresis with Pulsed Amperometric Detection**. *Anal. Chem.* **2003**, *75*(18), 4778-4783.
- [121] Saylor, R. A.; Reid, E. A.; Lunte, S. M., **Microchip Electrophoresis with Electrochemical Detection for the Determination of Analytes in the Dopamine Metabolic Pathway**. *Electrophoresis* **2015**, *36*(16), 1912-1919.

- [122] Pumera, M.; Wang, J.; Opekar, F.; Jelínek, I.; Feldman, J.; Löwe, H.; Hardt, S., **Contactless Conductivity Detector for Microchip Capillary Electrophoresis.** *Anal. Chem.* **2002**, *74* (9), 1968-1971.
- [123] Ding, Y.; Garcia, C. D.; Rogers, K. R., **Poly(dimethylsiloxane) Microchip Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection for Measurement of Chemical Warfare Agent Degradation Products.** *Anal. Lett.* **2008**, *41* (2), 335-350.
- [124] Wang, J.; Chen, G.; Muck, A., **Wall-Jet Conductivity Detector for Microchip Capillary Electrophoresis.** *Talanta* **2009**, *78* (1), 207-211.
- [125] Liu, B.; Zhang, Y.; Mayer, D.; Krause, H.-J.; Jin, Q.; Zhao, J.; Offenhäusser, A.; Xu, Y., **Determination of Heavy Metal Ions by Microchip Capillary Electrophoresis Coupled with Contactless Conductivity Detection.** *Electrophoresis* **2012**, *33* (8), 1247-1250.
- [126] Mark, J. J. P.; Kumar, A.; Demattio, H.; Hoffmann, W.; Malik, A.; Matysik, F.-M., **Combination of Headspace Single-Drop Microextraction, Microchip Electrophoresis and Contactless Conductivity Detection for the Determination of Aliphatic Amines in the Biodegradation Process of Seafood Samples.** *Electroanalysis* **2011**, *23* (1), 161-168.
- [127] Kuban, P.; Hauser, P. C., **Evaluation of Microchip Capillary Electrophoresis with External Contactless Conductivity Detection for the Determination of Major Inorganic Ions and Lithium in Serum and Urine Samples.** *Lab Chip* **2008**, *8* (11), 1829-1836.
- [128] Chen, Z.; Li, Q.; Li, O.; Zhou, X.; Lan, Y.; Wei, Y.; Mo, J., **A Thin Cover Glass Chip for Contactless Conductivity Detection in Microchip Capillary Electrophoresis.** *Talanta* **2007**, *71* (5), 1944-1950.
- [129] Šolínová, V.; Kašička, V., **Recent Applications of Conductivity Detection in Capillary and Chip Electrophoresis.** *J. Sep. Sci.* **2006**, *29* (12), 1743-1762.
- [130] Almeida, M. A. M. *Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis*; Ministério de Minas e Energia: Rio de Janeiro, 2015; p 70. www.epe.gov.br
- [131] Korhonen, I. O. O., **Gas-Liquid Chromatographic Analyses.** *J. Chromatogr. A* **1983**, *268*, 437-446.
- [132] Smith, J. R. L.; Waddington, D. J., **Gas Chromatographic Analysis of Aliphatic Alcohols, Diols and Ethers Using Aromatic Polymers.** *J. Chromatogr. A* **1968**, *36*, 145-151.

- [133] Lerma-García, M. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M.; Gimeno-Adelantado, J. V.; Simó-Alfonso, E. F., **Characterization of the Alcoholic Fraction of Vegetable Oils by Derivatization with Diphenic Anhydride Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Spectrophotometric and Mass Spectrometric Detection.** *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (2), 230-236.
- [134] Quigley, W. W. C.; Ecker, S. T.; Vahey, P. G.; Synovec, R. E., **Reversed Phase Liquid Chromatography with UV Absorbance and Flame Ionization Detection Using a Water Mobile Phase and a Cyano Propyl Stationary Phase: Analysis of Alcohols and Chlorinated Hydrocarbons.** *Talanta* **1999**, *50* (3), 569-576.
- [135] Haj-Yehia, A. I.; Benet, L. Z., **Determination of Alcohols by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection After Precolumn Derivatization with 2-(4-Carboxyphenyl)-6-Methoxybenzofuran.** *J. Chromatogr. A* **1996**, *724* (1), 107-115.
- [136] Amankwa, L. N.; Kuhr, W. G., **Indirect Fluorescence Detection in Micellar Electrokinetic Chromatography.** *Anal. Chem.* **1991**, *63* (17), 1733-1737.
- [137] Chen, M.-C.; Huang, H.-J., **Application of a Nickel-Microelectrode-Incorporated End-Column Detector for Capillary Electrophoretic Determination of Alditols and Alcohols.** *Anal. Chim. Acta* **1997**, *341* (1), 83-90.
- [138] Benedetti, L. P. d. S.; dos Santos, V. B.; Silva, T. A.; Filho, E. B.; Martins, V. L.; Fatibello-Filho, O., **A Digital Image-Based Method Employing a Spot-Test for Quantification of Ethanol in Drinks.** *Anal. Methods* **2015**, *7* (10), 4138-4144.
- [139] Camara, G. A.; Iwasita, T., **Parallel Pathways of Ethanol Oxidation: The Effect of Ethanol Concentration.** *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *578* (2), 315-321.
- [140] Yu, E. H.; Krewer, U.; Scott, K., **Principles and Materials Aspects of Direct Alkaline Alcohol Fuel Cells.** *Energies* **2010**, *3* (8), 1499-1528.
- [141] Santasalo-Aarnio, A.; Kwon, Y.; Ahlberg, E.; Kontturi, K.; Kallio, T.; Koper, M. T. M., **Comparison of Methanol, Ethanol and Iso-Propanol Oxidation on Pt and Pd Electrodes in Alkaline Media Studied by HPLC.** *Electrochem. Commun.* **2011**, *13* (5), 466-469.
- [142] Lai, S. C. S.; Kleijn, S. E. F.; Öztürk, F. T. Z.; van Rees Vellinga, V. C.; Koning, J.; Rodriguez, P.; Koper, M. T. M., **Effects of Electrolyte pH and Composition on the Ethanol Electro-Oxidation Reaction.** *Catal. Today* **2010**, *154* (1-2), 92-104.

- [143] Tan, H. W.; Abdul Aziz, A. R.; Aroua, M. K., **Glycerol Production and its Applications as a Raw Material: A Review**. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2013**, *27*, 118-127.
- [144] Schnaidt, J.; Heinen, M.; Denot, D.; Jusys, Z.; Jürgen Behm, R., **Electrooxidation of Glycerol Studied by Combined in Situ IR Spectroscopy and Online Mass Spectrometry Under Continuous Flow Conditions**. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *661* (1), 250-264.
- [145] Roquet, L.; Belgsir, E. M.; Léger, J. M.; Lamy, C., **Kinetics and Mechanisms of the Electrocatalytic Oxidation of Glycerol as Investigated by Chromatographic Analysis of the Reaction Products: Potential and pH Effects**. *Electrochim. Acta* **1994**, *39* (16), 2387-2394.
- [146] Simões, M.; Baranton, S.; Coutanceau, C., **Electro-Oxidation of Glycerol at Pd Based Nano-Catalysts for an Application in Alkaline Fuel Cells for Chemicals and Energy Cogeneration**. *Appl. Catal. B* **2010**, *93* (3-4), 354-362.
- [147] Kwon, Y.; Koper, M. T. M., **Combining Voltammetry with HPLC: Application to Electro-Oxidation of Glycerol**. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5420-5424.
- [148] Saito, R. M.; Brito-Neto, J. G. A.; Lopes, F. S.; Blanes, L.; da Costa, E. T.; Vidal, D. T. R.; Hotta, G. M.; do Lago, C. L., **Ionic Mobility of the Solvated Proton and Acid-Base Titration in a Four-Compartment Capillary Electrophoresis System**. *Anal. Methods* **2010**, *2* (2), 164-170.
- [149] Francisco, K. J. M.; do Lago, C. L., **A Compact and High-Resolution Version of a Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector**. *Electrophoresis* **2009**, *30* (19), 3458-3464.
- [150] Lopes, F. S. **Hifenização da Eletroforese Capilar com Sistema Eletroquímico em Fluxo: Desenvolvimento de Instrumentação para a Determinação de Íons Metálicos com Pré-Concentração Eletroquímica e Para o Estudo da Oxidação de Alcoóis**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- [151] Vidal, D. T. R.; Augelli, M. A.; Hotta, G. M.; Lopes, F. S.; do Lago, C. L., **Determination of Fluoroacetate and Fluoride in Blood Serum by Capillary Zone Electrophoresis Using Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection**. *Electrophoresis* **2011**, *32* (8), 896-899.

- [152] do Lago, C. L.; Vidal, D. T. R.; Rossi, M. R.; Hotta, G. M.; da Costa, E. T., **On the Formation of Carbonate Adducts of Fatty Alcohols, Sterols, and Sugars in Biological Conditions.** *Electrophoresis* **2012**, *33* (14), 2102-2111.
- [153] Santos, M. S. F.; Da Costa, E.; Gutz, I. G. R.; Garcia, C. D., **Analysis of Methanol in the Presence of Ethanol Using a Hybrid Capillary Electrophoresis Device with Electrochemical Derivatization and Conductivity Detection.** *Anal. Chem.* **2017**, *89* (2), 1362-1368.
- [154] Santos, M. S. F. **Derivatização Eletroquímica de Álcoois num Sistema em Fluxo para Determinação Quantitativa por Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica Sem Contato.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- [155] Ding, Y.; Mora, M. F.; Merrill, G. N.; Garcia, C. D., **The Effects of Alkyl Sulfates on the Analysis of Phenolic Compounds by Microchip Capillary Electrophoresis with Pulsed Amperometric Detection.** *Analyst* **2007**, *132* (10), 997-1004.
- [156] Kumar, L. D.; Nair, M. K.; Pan, P. C. 2000.
- [157] Bruce, W. D.; Perona, J. J., **Kinetics of the Hydrolysis of Methyl Salicylate by Sodium Hydroxide.** *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1985**, *24* (1), 62-65.
- [158] Davison, C.; Smith, P. K.; Zimmerman, E. F., **On the Metabolism and Toxicity of Methyl Salicylate.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1961**, *132* (2), 207-211.
- [159] Lin, H.; Wu, J.; Oturan, N.; Zhang, H.; Oturan, M. A., **Degradation of Artificial Sweetener Saccharin in Aqueous Medium by Electrochemically Generated Hydroxyl Radicals.** *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (5), 4442-4453.
- [160] Montilla, F.; Michaud, P. A.; Morallón, E.; Vázquez, J. L.; Comninellis, C., **Electrochemical Oxidation of Benzoic Acid at Boron-Doped Diamond Electrodes.** *Electrochim. Acta* **2002**, *47* (21), 3509-3513.
- [161] Souto, R. M.; Rodríguez, J. L.; Fernández-Mérida, L.; Pastor, E., **Electrochemical Reactions of Benzoic Acid on Platinum and Palladium Studied by DEMS. Comparison with Benzyl Alcohol.** *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *494* (2), 127-135.
- [162] Xia, X. H.; Liess, H. D.; Iwasita, T., **Early Stages in the Oxidation of Ethanol at Low Index Single Crystal Platinum Electrodes.** *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *437* (1-2), 233-240.

- [163] Tremiliosi-Filho, G.; Gonzalez, E. R.; Motheo, A. J.; Belgsir, E. M.; Léger, J. M.; Lamy, C., **Electro-Oxidation of Ethanol on Gold: Analysis of the Reaction Products and Mechanism**. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *444* (1), 31-39.
- [164] Kutz, R. B.; Braunschweig, B.; Mukherjee, P.; Dlott, D. D.; Wieckowski, A., **Study of Ethanol Electrooxidation in Alkaline Electrolytes with Isotope Labels and Sum-Frequency Generation**. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (17), 2236-2240.
- [165] Camara, G. A.; de Lima, R. B.; Iwasita, T., **The Influence of PtRu Atomic Composition on the Yields of Ethanol Oxidation: A Study by In Situ FTIR Spectroscopy**. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *585* (1), 128-131.
- [166] Kutz, R. B.; Braunschweig, B.; Mukherjee, P.; Behrens, R. L.; Dlott, D. D.; Wieckowski, A., **Reaction Pathways of Ethanol Electrooxidation on Polycrystalline Platinum Catalysts in Acidic Electrolytes**. *J. Catal.* **2011**, *278* (2), 181-188.
- [167] Qian, Q.-Y.; Yang, C.; Zhou, Y.-G.; Yang, S.; Xia, X.-H., **Efficient C–C Bond Cleavage in Ethanol Electrooxidation on Porous Pt Catalysts**. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *660* (1), 57-63.
- [168] Gomes, J. F.; Bergamaski, K.; Pinto, M. F. S.; Miranda, P. B., **Reaction Intermediates of Ethanol Electro-Oxidation on Platinum Investigated by SFG Spectroscopy**. *J. Catal.* **2013**, *302*, 67-82.
- [169] Katayama, H.; Ishihama, Y.; Asakawa, N., **Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers**. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (11), 2254-2260.
- [170] Katayama, H.; Ishihama, Y.; Asakawa, N., **Stable Cationic Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers for Capillary Electrophoresis**. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (24), 5272-5277.
- [171] Fogarassy, E.; Geohegan, D.; Stuke, M., **Laser Ablation**. Elsevier: Amsterdam, **1996**; p 543.
- [172] Yap, Y. C.; Guijt, R. M.; Dickson, T. C.; King, A. E.; Breadmore, M. C., **Stainless Steel Pinholes for Fast Fabrication of High-Performance Microchip Electrophoresis Devices by CO₂ Laser Ablation**. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10051-10056.
- [173] Segato, T. P.; Bhakta, S. A.; Gordon, M. T.; Carrilho, E.; Willis, P. A.; Jiao, H.; Garcia, C. D., **Microfab-Less Microfluidic Capillary Electrophoresis Devices**. *Anal. Methods* **2013**, *5* (7), 1652-1657.

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Imagens das etapas de fabricação do uísque de milho (*moonshine*)
fabricado no laboratório

Anexo II – Imagens das etapas de ablação da lâmina de vidro usando a cortadora a
laser de CO₂

Anexo III – Imagem do microchip de vidro durante separações eletroforéticas

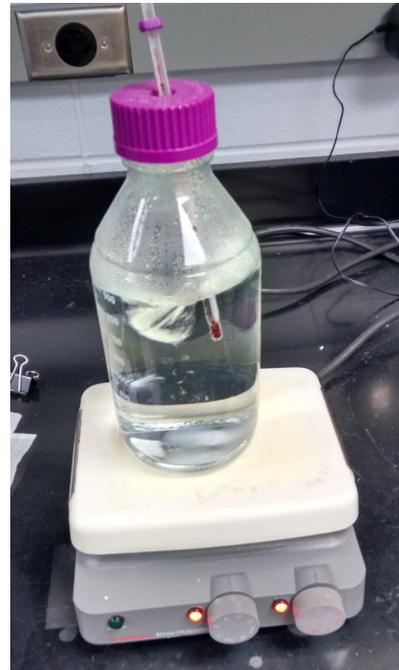
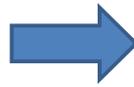
Anexo IV – Imagens do sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D

Anexo I: Imagens das etapas de fabricação do uísque de milho (*moonshine*) fabricado no laboratório

Pesagem e adição dos flocos de milho açúcar na água aquecida a 70°C



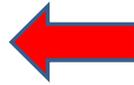
flocos de milho



água aquecida (70°C)



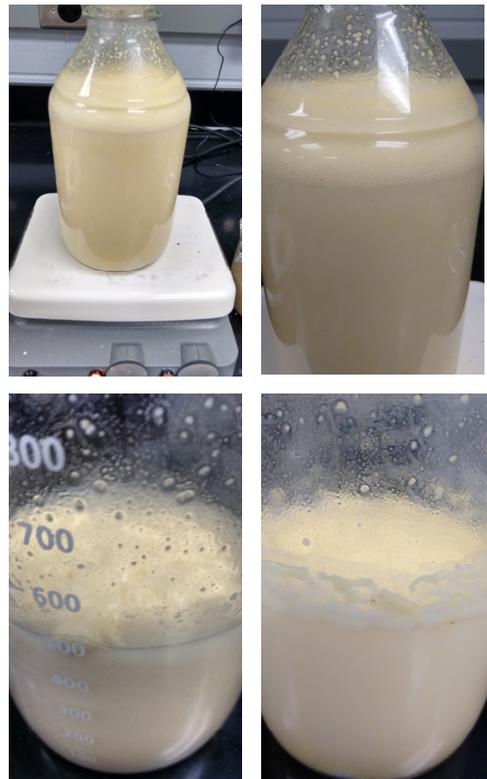
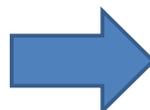
adição dos flocos de milho e açúcar



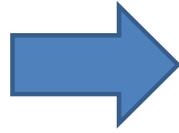
Adição da levedura e enzimas e descanso durante 7 dias para fermentação



Adição da levedura e enzima



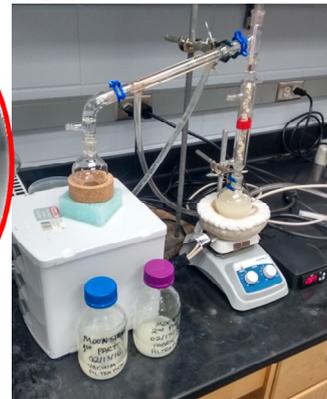
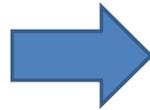
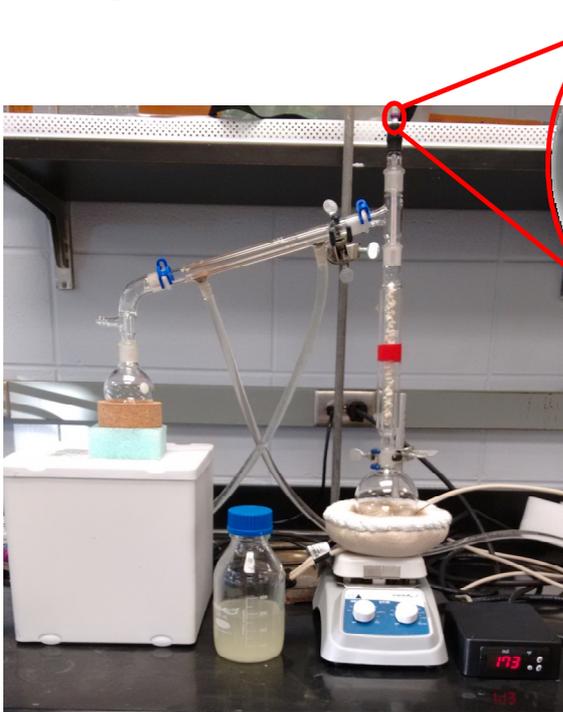
Filtração do fermentado



Filtração



Destilação fracionada do fermentado e coleta das frações destiladas



destilação fracionada do fermentado

Anexo II: Imagens das etapas de ablação da lâmina de vidro usando a cortadora a laser de CO₂

Imagem da lâmina de vidro recoberta com parafina



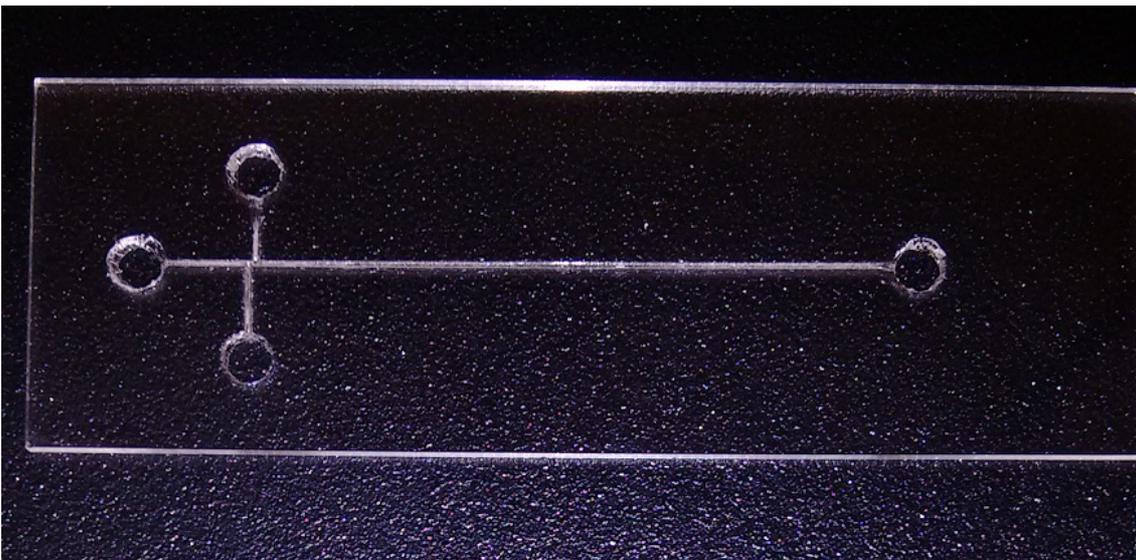
Imagem da lâmina de vidro recoberta com parafina após corte dos círculos (reservatórios) usando a cortadora a laser de CO₂



Imagem da lâmina de vidro recoberta com parafina após corte dos círculos (reservatórios) e canais usando a cortadora a laser de CO₂

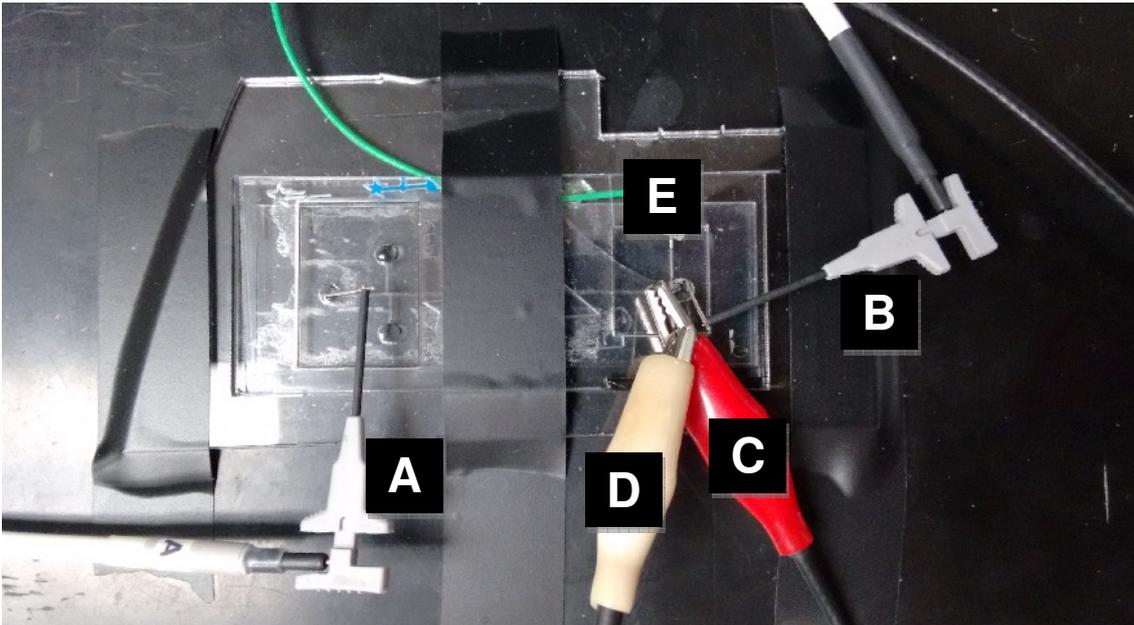


Imagem da lâmina de vidro após corte dos círculos (reservatórios) e canais usando a cortadora a laser de CO₂



Anexo III: Imagem do microchip de vidro durante separações eletroforéticas

Imagem do microchip de vidro produzido por ablação a laser em funcionamento, mostrando o posicionamento dos eletrodos de separação (A= alta tensão e B= terra) e de detecção (C= auxiliar, D= pseudo referência e E= trabalho)



Anexo IV: Imagens do sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D

Imagem da célula eletroquímica do sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D, durante a etapa de eletrooxidação dos álcoois, mostrando o posicionamento dos eletrodos (A= auxiliar, B= pseudo-referência e C= trabalho) e do C⁴D

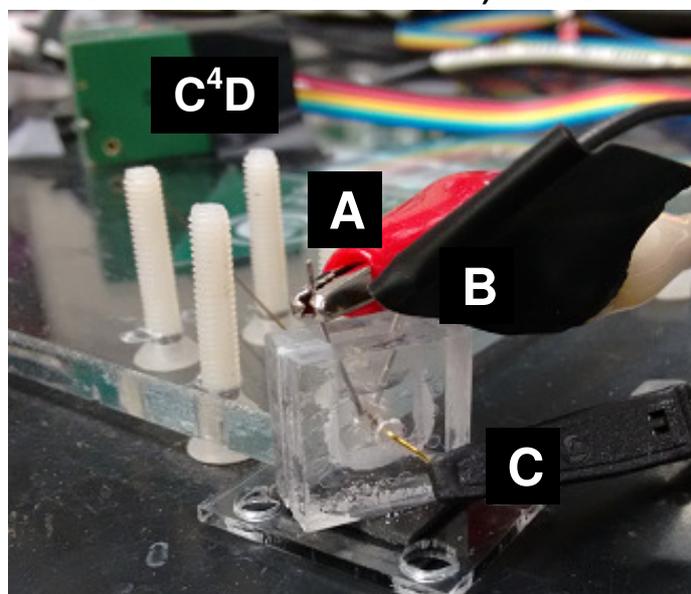
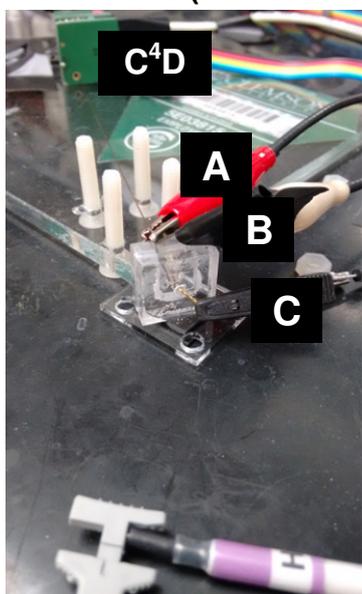


Imagem do sistema híbrido miniaturizado EC-CE-C⁴D, durante a etapa de separação, mostrando o posicionamento dos eletrodos (A= auxiliar, B= pseudo-referência e C= trabalho, desconectados) e (D= alta tensão e E= terra, conectados)

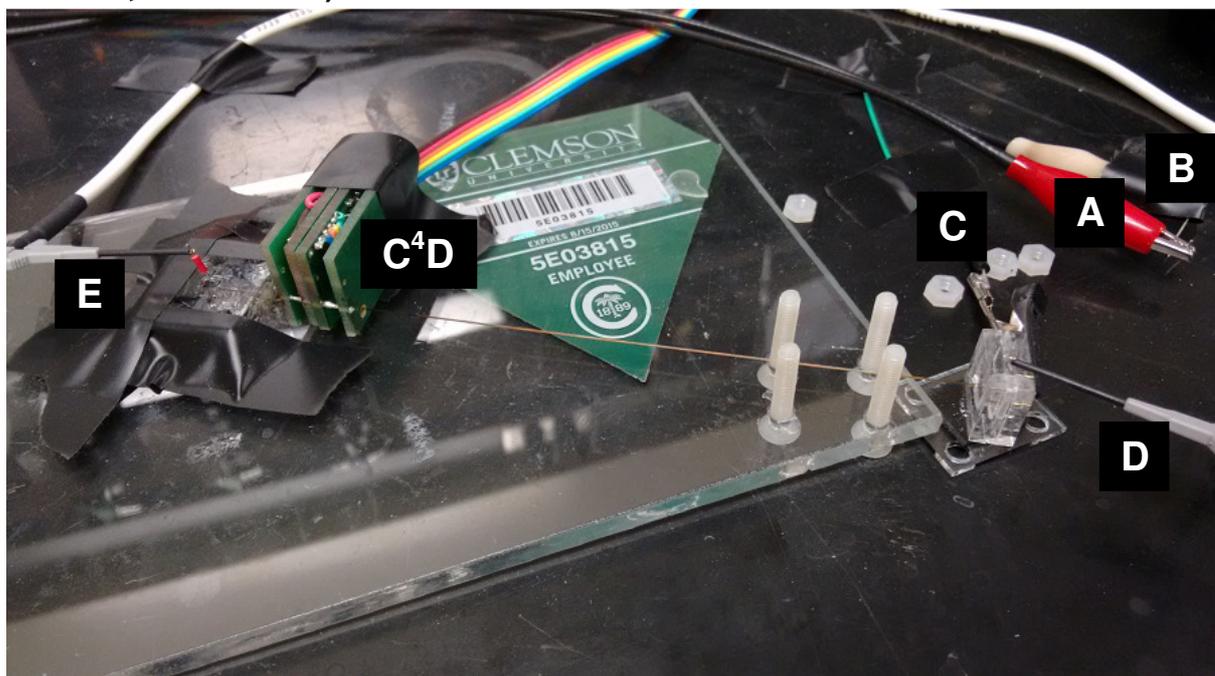
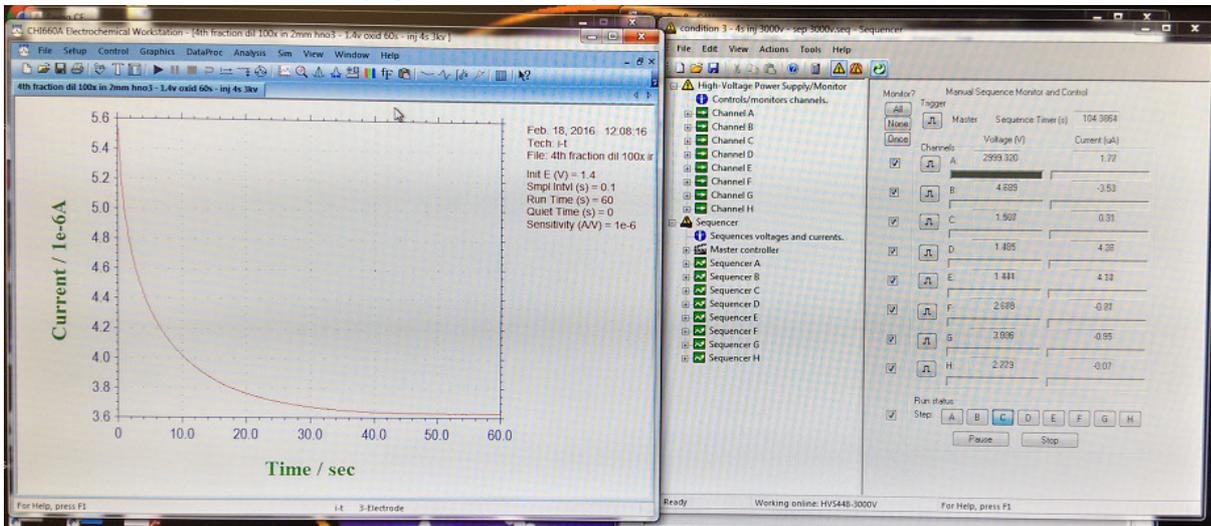


Imagem da interface dos *softwares* usados para controle do potenciostado durante a eletrooxidação dos álcoois (à esquerda) e para controle da fonte de alta tensão durante a injeção e separação (à direita)



CURRICULUM VITAE

Nome: Mauro Sérgio Ferreira Santos

Data de nascimento: 30/06/1986

Local: Jequié – BA

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP

Período: 11/2012 – 11/2016

Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Química (Química Analítica)

Título da Tese: ***Eletroforese Capilar com Derivatização Eletroquímica de Compostos Neutros: Novas Aplicações, Otimização e Miniaturização do Sistema em Fluxo EC-CE-C⁴D***

Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

University of Texas at San Antonio (Texas - USA) / Clemson University (South Carolina - USA)

Período: 04/2015 – 03/2016

Doutorado Sanduíche

Título do Projeto: ***Miniaturização de Sistema em Fluxo para Derivatização Eletroquímica, Separação por Eletroforese Capilar e Detecção Condutométrica sem Contato***

Supervisor: Prof. Dr. Carlos Diego Garcia

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP

Período: 07/2010 – 10/2012

Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Química (Química Analítica)

Título da Dissertação: ***Derivatização Eletroquímica de Álcoois num Sistema em Fluxo para Determinação Quantitativa por Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato***

Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

Centro Universitário FIEO – UNIFIEO, Osasco – SP

Período: 02/2009 – 06/2010

Especialização em Tecnologia em Química

Título da Monografia: ***Estudo das Concentrações de Nutrientes e Especiação de Fósforo nos Sedimentos da Região Próxima ao Emissário Submarino de Esgoto de Praia Grande I***

Orientador: Prof. Dr. Silvio Miranda Prada

Centro Universitário FIEO – UNIFIEO, Osasco – SP

Período: 02/2005 – 12/2008

Bacharelado em Química

Centro Universitário FIEO – UNIFIEO, Osasco – SP

Período: 02/2005 – 12/2008

Licenciatura em Química

Colégio Estadual Dr. Edvaldo Machado Boaventura.
Período: 01/2001 – 12/2003
Ensino Médio (Formação Geral)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado do CNPq

PRÊMIOS E TÍTULOS

- ✓ 2013: Menção Honrosa - *3º Prêmio Qualidade em Publicação 2012*, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).
- ✓ 2012: Professor Homenageado - *Formandos do Curso Técnico em Química*, ETEC Osasco II - Vila dos Remédios.
- ✓ 2009: Prêmio Lavoisier - *Melhor Aluno do Curso de Licenciatura em Química 2005 - 2008*, CRQ IV Região.

REVISOR DE PERIÓDICO

- ✓ 2016 – Atual: Periódico: *Electrophoresis* (Weinheim. Print).

ARTIGOS

- ✓ **Santos, M. S. F.**; Costa, E. T.; Gutz, I. G. R. ; Garcia, C. D., *Analysis of Methanol in the Presence of Ethanol Using a Hybrid Capillary Electrophoresis Device with Electrochemical Derivatization and Conductivity Detection*. Analytical Chemistry (Washington), v. 89, p. 1362-1368, 2017.
- ✓ Lopes, F. S.; Baccaro, A. L. B.; **Santos, M. S. F.**; Gutz, I. G. R., *Oxygen Bleach under the Microscope: Microchemical Investigation and Gas-Volumetric Analysis of a Powdered Household Product*. Journal of Chemical Education, v. 93, p. 158-161, 2016.
- ✓ Costa, E. T.; **Santos, M. S. F.**; Jiao, H.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R.; Garcia, C. D., *Fast Production of Microfluidic Devices by CO₂ Laser Engraving of Wax-Coated Glass Slides*. Electrophoresis (Weinheim. Print), v. 37, p. 1691-1695, 2016.
- ✓ Cerqueira, M. R. F.; **Santos, M. S. F.**; Matos, R. C.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L., *Use of Polymethyl Methacrylate/Polyethyleneimine Flow Microreactors for Enzymes Immobilization*. Microchemical Journal (Print), v. 118, p. 231-237, 2015.

- ✓ Ferreira, L. M. C.; Grasseschi, D.; **Santos, M. S. F.**; Martins, P. R.; Gutz, I. G. R.; Ferreira, A. M. C.; Araki, K.; Toma, H. E.; Angnes, L., *Unveiling the Structure of Poly-Tetraruthenated Nickel Porphyrin by Raman Spectroelectrochemistry*. *Langmuir*, v. 31, p. 4351-4360, 2015.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Lopes, F. S.; Gutz, I. G. R., *Electrochemical Derivatization - Capillary Electrophoresis - Contactless Conductivity Detection: A Versatile Strategy for Simultaneous Determination of Cationic, Anionic and Neutral Analytes*. *Electrophoresis* (Weinheim. Print), v. 35, p. 864-869, 2014.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Lopes, F. S.; Vidal, D. T. R.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *From Sample Processing to Quantification: A Full Electrochemical Strategy for Neutral Analyte Derivatization, Capillary Electrophoresis Separation and Contactless Conductivity Detection*. *Analytical Chemistry* (Washington), v. 84, p. 7599-7602, 2012.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- ✓ **Santos, M. S. F.**; Costa, E. T.; Garcia, C. D.; Gutz, I. G. R., *Simple Hybrid Microchip Assembly for Capillary Electrophoresis with Electrochemical Derivatization and Contactless Conductivity Detection*. **18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ Teixeira, W. S. R.; **Santos, M. S. F.**; Gruber, J. ; Gutz, I. G. R.; Lopes, F. S., *Carboxylic Acids from Glycerol Electrooxidation: Interaction with the EOF Modifier During Separation by Capillary Electrophoresis with Dual C⁴D*. **18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2016, Florianópolis - SC.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Lopes, F. S.; Gutz, I. G. R., *Study of Electrooxidation Products of Primary Alcohols by EC-CE-C4D: Assessment of the Conversion Efficiency of Alcohols into Their Carboxylates on Gold and Platinum Electrodes in Different Media*. **Pittcon Conference & Expo**, 2016, Atlanta, GA - USA.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Costa, E. T.; Jiao, H.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R.; Garcia, C. D., *Quick Production of Microfluidic Devices by Laser Engraving of Wax-Coated Glass Slides*. **Pittcon Conference & Expo**, 2016, Atlanta, GA - USA.
- ✓ Ferreira, L. M. C.; **Santos, M. S. F.**; Angnes, L., *Amperometric Folic Acid Quantification Using a Supramolecular Tetraruthenated Nickel Porphyrin μ -oxo Matrix Modified Electrode Associated to Batch Injection Analysis*. **Pittcon Conference & Expo**, 2014, Chicago - USA.
- ✓ Cerqueira, M. R. F.; **Santos, M. S. F.**; Matos, R. C.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L., *Use of Polymethyl Methacrylate (PMMA) / Polyethyleneimine (PEI) Microreactors for Multiple enzymes Immobilization*. **XXIII International Materials Research Congress**, 2014, Cancun - Mexico.

- ✓ **Santos, M. S. F.**; Teixeira, W. S. R.; Lopes, F. S.; Gruber, J. ; Gutz, I. G. R., *Developed of a Capillary Electrophoresis Method for the Separation of Neutral Species: An Assay for the Separation of Glycerol, Glyceraldehyde and Dihydroxyacetone*. **21st International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques (ITP) and 20th Latin-America Symposium on Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis (LACE)**, 2014, Natal - RN.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Lopes, F. S.; Gutz, I. G. R., *Derivatização Eletroquímica para Eletroforese Capilar: Estratégia para Determinação Simultânea de Cátions, Ânions e Compostos Neutros*. **17º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2013, Belo Horizonte - MG.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Lopes, F. S.; Vidal, D. T. R.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Derivatização Eletroquímica de Álcoois para Eletroforese Capilar: Aplicação da Metodologia para a Análise Quantitativa de Etanol em Bebidas*. **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)**, 2012, Montevideo – Uruguay.
- ✓ Lopes, F. S.; **Santos, M. S. F.**; Bacarro, A. L. B.; Gutz, I. G. R., *Análise de Alvejantes Domésticos Baseados em Peróxido de Hidrogênio: Uma Aula de Química Analítica*. **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)**, 2012, Montevideo – Uruguay.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Prada, S. M., *Variação das Concentrações de Nutrientes nos Sedimentos da Região Próxima ao Emissário Submarino de Esgoto de Praia Grande I, São Paulo, Brasil*. **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)**, 2012, Montevideo – Uruguay.
- ✓ Lopes, F. S.; **Santos, M. S. F.**; Vidal, D. T. R.; Nogueira, T.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Probing Reaction Products on Catalyst and Electrodes by Capillary Electrophoresis Automated Electrochemical Flow System*. **2º Congresso Analítica Latin América**, 2011, São Paulo – SP.
- ✓ Lopes, F. S.; **Santos, M. S. F.**; Vidal, D. T. R.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Derivatização de Álcoois por Oxidação Eletroquímica: Uma Nova Estratégia para Viabilização de Análise de Espécies Neutras por Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato*. **16º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2011, Campos do Jordão – SP.
- ✓ **Santos, M. S. F.**; Prada, S. M.; Duleba, W.; Teodoro, A. C., *Variação das Diferentes Espécies de Fósforo em Sedimentos da Região Próxima ao Emissário Submarino de Esgotos de Praia Grande I, SP, Brasil, Entre os Anos de 2004 e 2008*. **4º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 10º Encuentro de Química Analítica y Ambiental (ENQAA)**, 2010, Viña Del Mar – Chile.

- ✓ **Santos, M. S. F.;** Prada, S. M.; Teodoro, A. C.; Duleba, W., *Estudo Geoquímico dos Sedimentos da Região Próxima ao Emissário Submarino de Esgoto de Praia Grande I, SP. 15º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA)*, 2009, Salvador – BA.
- ✓ **Santos, M. S. F.;** Prada, S. M.; Reis, M. S.; Oliveira, C. E. S.; Oliveira, E., *Varição das Diferentes Espécies de Fósforo nos Sedimentos do Reservatório de Guarapiranga, SP, no Período de 1998 a 2007. 1º Encontro Brasileiro de Especiação Química (EspeqBrasil)*, 2008, Águas de São Pedro – SP.
- ✓ Reis, M. S.; **Santos, M. S. F.;** Prada, S. M.; Teodoro, A. C.; Duleba, W.; Oliveira, E., *Especiação de Fósforo nos Sedimentos da Região dos Emissários Submarinos de Esgoto do Saco da Capela e Cigarras, São Sebastião - SP. 1º Encontro Brasileiro de Especiação Química (EspeqBrasil)*, 2008, Águas de São Pedro – SP.