**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALINE KLASSEN

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS EM
AMOSTRAS TÊXTEIS POR ELETROFORESE CAPILAR**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

09/03/2012

ALINE KLASSEN

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA
DETERMINAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS EM
AMOSTRAS TÊXTEIS POR ELETROFORESE CAPILAR**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Programa Química)

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Marina Franco Maggi Tavares

SÃO PAULO

2012

Dedico esta Tese aos meus queridos pais que sempre se esforçaram pela minha
formação pessoal e profissional

Ao meu companheiro de todas as horas, Roberto, pelo apoio e incentivo
incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força que tem me dado nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química em ter me possibilitado a realização dessa Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares pela orientação nesta tese, bem como, pela oportunidade dada de aprendizado tanto profissional quanto pessoal.

Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, pela ajuda tanto pessoal quanto profissional.

Ao Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago pela atenção dada durante o período de licença sabática da Proa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares.

A todos os professores da USP que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Central Analítica, em especial à Giovana, por contribuir grandemente com o término dessa Tese.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato e seus alunos pelo auxílio.

Ao Prof. Dr. Marcone de Oliveira pela ajuda.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Química, em especial ao colega de trabalho e amigo Daniel Oliveira pela amizade e grande ajuda na realização desse trabalho.

À Empresa Clariant por ter cedido as matrizes têxteis.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas pelo empréstimo dos padrões de aminas empregados no trabalho.

A meu querido Roberto pela paciência, carinho e compreensão nas horas mais difíceis e também pelos momentos de alegria proporcionados. Ainda, tenho muito a agradecer pela pelo auxílio no conserto dos equipamentos.

Aos amigos Aline Lopes, Karina Freitas e Carlos Neves pela amizade, força, paciência e pelos momentos felizes juntos vividos.

Aos amigos do laboratório André, Aline Vitor, Claudinei, Daniel Polesel, Edgar, Gisele, Grazielle, Karina, Laís, Lucas, Luiz Zanolli, Maryane, Simone, Talita, Tatiana, Valéria, Virgínia e Viviane pela amizade, paciência, e troca de experiências.

Quando não há desafio, não se rompem limites e tendemos a permanecer na mesma condição. Para muitos, talvez, não haveria problema permanecer da mesma maneira — pode ser até que esteja bem assim. Porém, não avançar é o mesmo que retroceder. Se continuar fazendo o que sempre fez, continuará obtendo o que sempre obteve. O espírito ensinado no budismo é o de sempre avançar, independentemente das circunstâncias. Viver é avançar, progredir sempre em todas as frentes. Se vocês desistirem de seus esforços para avançarem, significa que estão retrocedendo na própria vida.

(Daisaku Ikeda)

Sumário

Resumo	9
Abstract.....	11
Lista de abreviaturas.....	13
Objetivo.....	15
Capítulo 1	16
Introdução.....	16
1.1. Corantes.....	17
1.1.1. Classificação.....	18
1.1.2. Azo corantes e seus produtos de degradação.....	20
1.2. Materiais têxteis	24
1.3. Processos têxteis	26
1.4. Técnicas de análise aplicadas à determinação de aminas aromáticas	29
1.4.1. Eletroforese capilar	30
1.4.2. Cromatografia líquida.....	33
Capítulo 2.....	36
Determinação das constantes de dissociação ácido-base	36
2.1. Introdução	37
2.2. Parte experimental	42
2.2.1. Instrumentação	42
2.2.2. Materiais, Reagentes e Soluções	43
2.2.3. Padrões empregados.....	43
2.2.4. Preparo dos tampões.....	43
2.3. Resultados e discussão	44
2.4. Conclusão do capítulo.....	57
Capítulo 3.....	58
Otimização de métodos por eletroforese capilar	58
3. Introdução.....	59
3.1. Procedimento experimental.....	59
3.1.1. Materiais, Reagentes e Soluções	59
3.1.2. Padrões empregados	60
3.1.3. Preparo dos eletrólitos empregados na otimização da separação dos analitos	60
3.1.4. Condicionamento do capilar	63
3.1.5. Procedimento experimental para medição do fluxo usando marcas térmicas	63
3.1.6. Procedimento experimental para o condicionamento do capilar com polímero	64
3.1.7. Procedimento experimental adotado com capilar revestido com polivinilálcool (PVA)	65
3.1.8. Procedimento experimental para a avaliação dos produtos de degradação	65

3.1.9. Procedimento experimental para o preparo das amostras	65
3.2. Resultados e discussão	69
3.2.1. Escolha do pH	69
3.2.2. Estudo do método 1	70
3.2.2.1. Estudo da composição do BGE e condicionamento do capilar	70
3.2.2.2. Avaliação da influência da concentração do BGE e tensão aplicada	77
3.2.2.3. Estudo de um condicionamento de início de trabalho	79
3.2.2.4. Estudo do efeito do solvente, adicionado ao BGE, na separação das aminas	84
3.2.3. Otimização da separação do método 2	87
3.2.4. Otimização do método 3	90
3.2.4.1. Estudo da composição do BGE	90
3.2.4.2. Avaliação de outras variáveis eletroforéticas	93
3.2.4.3. Medida do fluxo eletrosmótico..	95
3.2.4.4. Avaliação de outros condicionamentos do capilar usando aditivos ao BGE.	100
3.2.4.5. Avaliação da interferência de produtos de degradação	110
3.2.4.6. Estudo da extração – SPE e CPE	121
3.2.4.7. Aplicação do método de extração SPE com troca catiônica em amostra sintética	135
3.2.4.8. Estudo da extração com ultrassom por meio de planejamento fatorial por superfície de resposta	137
3.2.4.9. Figuras de mérito	149
3.3. Conclusão do capítulo	159
Capítulo 4.....	160
Aplicação do método 3 (CE - UV) na análise de amostras reais e confirmação por LC-MS/MS.....	160
4.1. Introdução	161
4.2. Procedimento experimental.....	161
4.2.1. Eletroforese capilar	161
4.2.2. Método de LC-MS adaptado	162
4.2.3. Procedimento adotado para a extração das amostras reais	163
4.3. Resultados e discussão	164
4.3.1. Avaliação das amostras reais pelo método 3 – CE - UV.....	164
4.3.2. Método de LC-MS/MS adaptado da Diretiva 2002/61/EC e avaliação da presença das aminas proibidas nas amostras 1 e 3.....	174
4.4. Conclusão do capítulo.....	180
Conclusões Finais.....	181
Perspectivas.....	182

Resumo

Klassen, A. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de aminas aromáticas em matrizes têxteis por eletroforese capilar**. 2012. 198p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os corantes que apresentam grupos cromóforos do tipo azo ($N=N$) são amplamente empregados em numerosas aplicações na indústria, para colorir vários bens de consumo, dentre eles os têxteis. Entretanto, pelo fato de formarem aminas aromáticas carcinogênicas, quando a ligação $N=N$ é rompida, seu uso está sujeito à legislação. Levando em consideração o potencial carcinogênico das aminas aromáticas, a quantificação das mesmas em produtos destinados à exportação se faz necessária. A técnica padrão para o monitoramento da presença dessas aminas em bens de consumo como os têxteis é a cromatografia líquida de alta eficiência, entretanto como alternativa tem-se a eletroforese capilar. Assim, neste trabalho 20 aminas aromáticas oriundas de azo corantes, banidas pela Comunidade Européia por meio da Diretiva 2002/61/EC, foram separadas por meio de eletroforese capilar (CE), com detecção no UV-Vis, e, a confirmação da presença dessas aminas em matrizes têxteis foi realizada por um método confirmatório de LC-MS, adaptado da literatura.

Em CE o conhecimento das constantes de dissociação ácido-base se faz necessário para a otimização do pH ideal de corrida, assim estas, bem como mobilidades iônicas para cada uma das aminas aromáticas foram determinadas por meio de curvas de mobilidade efetiva em função do pH. O pH ótimo de separação de 2,50 foi determinado por meio do simulador de separação desenvolvido no grupo (SIMLACE).

Dos métodos de separação estudados, o que apresentou maior número de aminas separadas (16 aminas) em linha de base em menor tempo (12 min) foi empregando um BGE composto apenas de 70 mmol/L de dihidrogenofosfato de sódio ajustado a pH 2,50 com ácido fosfórico, considerando um condicionamento de capilar de início de trabalho de 10 minutos de *flush* com BGE (dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L ajustado a pH 2,50 com ácido fosfórico, contendo trietilamina 12,3 mmol/L) a uma pressão de 950 mbar, seguido da aplicação de uma tensão de +30

kV por 10 minutos; e um condicionamento entre réplicas de corrida eletroforética de 1 minuto de HCl 0,1mol/L (950 mbar) seguidos de 1 minuto de H₂O (950 mbar).

A extração das aminas da matriz têxtil envolve três etapas: a redução da ligação N=N, extração das aminas formadas e um posterior *clean up* e pre-concentração, sendo que para este último o sistema que apresentou melhor resposta em termos de eficiência de extração (da ordem de 100%) foi com o uso de extração em fase sólida com resina de troca catiônica. Por outro lado, a extração das aminas 1, 7 e 8 da matriz têxtil foi obtida por ultrassom após o estudo de um planejamento fatorial de superfície de resposta, a uma temperatura de 52 °C, tempo de ultrassom de 5 minutos e concentração de HCl de 0,77 mol/L, com recuperações de 105 a 115%.

Como figuras de mérito do método otimizado tem-se: linearidade no intervalo de 50,11 – 409,1 mmol/L ($R^2 > 0,98$), LD (2,43 – 6,70 mmol/L) e LQ (8,10 – 22,3 mmol/L), precisão (0,23 – 27,6%), robustez (por planejamento fatorial), seletividade, especificidade (estudos de estresse com extrato da amostra) e recuperação (valores acima).

O método validado foi aplicado a sete amostras adquiridas no mercado local. Dentre elas, duas apresentaram picos com tempos de migração e espectros semelhantes às aminas 5, 7 e 15, sendo que as aminas 7 e 15 foram confirmadas por meio do método de LC-MS/MS adaptado da literatura o qual permitiu a caracterização dessas aminas nas matrizes têxteis analisadas.

Palavras-chave: eletroforese capilar, matrizes têxteis, azo corantes e aminas aromáticas.

Abstract

Klassen, A. **Development of methodology for determination of aromatic amines in textiles matrices by capillary electrophoresis**. 2012. 198p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The dyes which have chromophoric groups like azo ($N = N$) are widely used in numerous applications in industry to color various consumer goods, including textiles. However, because of carcinogenic aromatic amines formed when $N=N$ bond is broken, its use is subject to the legislation. Considering the carcinogenic potential of aromatic amines, to quantify them in products intended for export, is needed. The standard technique for monitoring the presence of these amines in consumer goods such as textiles is a high performance liquid chromatography, however the capillary electrophoresis technique can be a good alternative. In this work 20 aromatic amines derived from azo dyes, banned by the European Community by Directive 2002/61/EC, were separated by capillary electrophoresis (CE) with UV-Vis detection, and confirmation of the presence these amines textile matrix was conducted by a method confirmatory LC-MS, adapted from the literature.

The knowledge of the dissociation constant acid-base (pK_a) in CE technique is necessary to obtain the optimum pH for the separation. In these way the pK_a as well as the ionic mobilities for each aromatic amines were determined by curves of effective mobility as a function of pH. The optimum pH for the separation was 2.50 as determined by the simulator separation developed in the group (SIMLACE).

About the separation methods studied, which had a higher number of separate amines (16 amines) in the baseline in a shorter time (12 min) employing a BGE composed only of 70 mmol/L sodium dihydrogen phosphate adjusted to pH 2.50 with phosphoric acid, with a conditioning capillary either at the beginning of the working day (10 minutes flush with BGE (sodium dihydrogen 70 mmol/L adjusted to pH 2.50 with phosphoric acid, triethylamine containing 12.3 mmol/L) at a pressure 950 mbar followed by applying a voltage of +30 kV for 10 minutes) and among replicas (1 minute of HCl 0.1 mol/L (950 mbar) followed by 1 minute of H_2O (950 mbar)).

The extraction of amines textile matrix involves three steps: reduction of N = N bond, extraction of the amines formed and a subsequent clean up and pre-concentration. About the latter step, the best response in terms of extraction efficiency (about 100%) was obtained using solid phase extraction (SPE) with cationic exchange resin. In addition, the best condition for ultrasound extraction of the amines 1, 7 and 8, was determined by means of a response surface factorial design with three variables and two levels. The optimum condition was: temperature of 52 °C, application of ultrasound for 5 min and HCl concentration of 0.77 mol/L, with recoveries of 105% to 115%.

Figures of merit for optimized method include: linearity in the range from 50.11 to 409.1 mmol/L ($R^2 > 0.98$), LD (limit of detection, 2.43 to 6.70 mmol/L) and LQ (limit of quantification, 8.10 to 22.3 mmol/L), precision (0.23 to 27.6%), robustness (established by a factorial design), selectivity, specificity (stress studies with real sample extracts) and recovery (listed above).

The validated method was applied to seven samples purchased at local markets. Among them, two presented peaks with migration times and spectra similar the amines 5, 7, 12 and 15. But, in only one sample the amines 7 and 15 were confirmed by LC-MS/MS.

Keywords: capillary electrophoresis, textile matrices, azo dyes, and aromatic amines.

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
AOAC	do inglês, Association of Official Agricultural Chemists
BGE	Eletrólito de corrida eletroforética
BisTrisH+/BisTris	2-Bis (hidroximetil) -2,2', 2'' nitrilotriethanol
β -CD	β -ciclodextrina
ca.	Cerca de
CHES/CHES	ácido 2-(ciclohexil-amino) etanosulfônico
CAPS/CAPS	ácido 2-(ciclohexil-amino) 1-propanosulfônico
CE	Eletroforese capilar, do inglês, <i>capillary electrophoresis</i>
CH ₃ COOH/CH ₃ COO-	Tampão acetato
CPE	Extração por ponto nuvem, do inglês <i>cloud point extraction</i>
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CMC	Concentração micelar crítica
CZE	Eletroforese capilar em zona
DAD	Detector de arranjo de diodos, do inglês, <i>diode array detector</i>
DAT	2,4-diaminotolueno
d.i.	Diâmetro interno
DOSS	dioctil sulfosucinato
DMF	dimetilformamida
DS	dextran
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FDA	fenilenodiamina
GC	Cromatografia a gás, do inglês, <i>gas chromatography</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
HEPES/ HEPES	N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
K _a	Constante de dissociação ácido-base
LD	Limite de detecção, do inglês, <i>limit of detection</i>
LQ	Limite de quantificação, do inglês, <i>limit of quantification</i>
L _{tot}	Comprimento total do capilar
L _{det}	Comprimento efetivo do capilar
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid liquid extraction</i>
MeOH	metanol

MES/MES	tampão ácido 2-morfolinoetanosulfônico
MS	Espectrômetro de massas, do inglês mass spectrometry
MT	Marcas térmicas
MPFDA	2-metil-p-fenilenodiamina
NMF	metilformamida
PB	polibreno
PDADMAC	polidialquildimetilamônio
PA	poliarginina
PVS	polivinilsulfônico
R	Resolução entre picos
RSD	Desvio padrão relativo
SPE-TC-CC	Extração em fase sólida com resina de troca catiônica com coluna comercial
SPE-TC-CEM	Extração em fase sólida com resina de troca catiônica com coluna empacotada manualmente
SDS	dodecil sulfato de sódio
TCA	ácido tetracarboxílico
TBS	tetraborato de sódio
ts	Tempo de migração do composto
tf	Tempo de migração do fluxo eletrosmótico
TrisH ⁺ /Tris	tris(hidroximetil)
TEA	Trietilamina
T	temperatura
UV	Ultra violeta
Vis	visível
V	Tensão em volts
μ_{eff}	Mobilidade efetiva
I	Força iônica
λ	Comprimento de onda
ϵ	constante dielétrica
η	viscosidade
μ_{osm}	Mobilidade do fluxo eletrosmótico

OBJETIVOS

Desenvolver uma metodologia, por eletroforese capilar com detecção UV-vis e confirmação por LC-MS/MS, para inspeção de produtos têxteis destinados à exportação quanto à presença de 20 aminas aromáticas (produtos de degradação de azo corantes) proibidos pela Diretiva 2002/61/EC.

Introdução

Capítulo 1

1.1. Corantes

Corantes são compostos orgânicos coloridos que possuem a propriedade de absorver luz na região do visível do espectro eletromagnético. Segundo a teoria de Otto Witt, para um composto ter a função de corante, é necessário que a estrutura molecular possua um grupo cromóforo e um auxocromo ¹. Os cromóforos são responsáveis pela produção da cor, (grupos nitro, benzeno, azo, etc.), e os auxocromos têm a função de intensificar a cor, porém, quando sozinhos não são compostos coloridos. Como exemplo, temos: os grupos hidroxila, alcóxidos e amino². Além disso, os corantes apresentam em sua estrutura grupos sulfônicos, o que lhes confere elevada solubilidade. Por essa razão, eles são diferenciados dos pigmentos, os quais não possuem em sua estrutura qualquer composto que lhes confira solubilidade, portanto, são insolúveis.

Os corantes podem ser aplicados em diferentes substratos tais como: papel, couro, cabelo, alimentos, cosméticos, plásticos e materiais têxteis ³.

A história relata que o povo antigo, como os egípcios, já usavam corantes e pigmentos em pinturas na parede, sarcófagos e papiros manuscritos. Esses corantes eram derivados de plantas, solo, minerais e animais. Corantes derivados dessas fontes são chamados de naturais, citam-se o índigo, extraído de planta homônima (*Indigofera tinctoria*) e a alizarina, um corante extraído da raiz da garança (*Rubia tinctorum*).

Na época do Brasil colônia foi descoberto um corante natural extraído da árvore *Caesalpinia echinata*, popularmente chamada de pau-brasil. Eram empregados em substratos têxteis, com possibilidade de tingimento nas cores marrom, vermelho e rosa⁴.

¹ Chritie, R.M., Colour Chemistry, 2001, The Royal Society of Chemistry, 2001.

² Kimura, I.Y.; Gonçalves Jr., A.C.; Stolberg, J.; Laranjeira, M.C.M.; de Fávère, V.T., Efeito do pH e tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana, Polímeros: Ciência e Tecnologia, 1999, p. 51-57.

³ Venkataraman, K., The Chemistry of Synthetic Dyes, v. 1, AP- Academic Press, New York, 1952.

⁴ <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html>. Acessado em 20/01/2012.

No contexto mundial, até 1856 os corantes naturais eram empregados, quando W.H. Perkin sintetizou a Mauveína, que apresentava a cor da planta malva silvestre. Rapidamente, Perkin converteu a produção do corante Mauveína de pequena para grande escala. Assim, deu-se início a síntese de vários outros corantes em seu laboratório, até mesmo o corante índigo que era obtido naturalmente⁵. E, devido à elevada demanda, procura e exigência dos clientes, a substituição dos corantes naturais pelos sintéticos se fez necessária.

Segundo Zanoni, é possível encontrar mais de 8 mil corantes sintéticos, que podem ser empregados na indústria têxtil. Estes estão compilados no índice Internacional de Corantes (C.I., do inglês *Colour Index*), que é o banco de dados mantido pela Society of Dyers and Colourists e a American Association of Textile Chemists and Colorists⁶.

1.1.1. Classificação

Os corantes são retidos nos substratos por adsorção física, formação de sal, complexação com metais, retenção mecânica, ou por ligação covalente^{7,8}. O modo de aplicação do corante no substrato varia de acordo com o tipo de substrato e a classe do corante.

Com relação à classe temos:

1. Corantes Diretos

Estes constituem uma classe de corantes solúveis em água capazes de tingir celulose por interação de Van der Waals, ou por ligações de

⁵ Meth_Cohn, O.; Smith, M., What did W. H. Perkin actually make when he oxidized aniline to obtain mauveine?, J. Chem. Soc. Perkin Trans. v.1, p. 5-7, 1994.

⁶ ZANONI, M. V.; CARNEIRO, P. A. Corantes na indústria têxtil. Ciência Hoje, v. 29, p. 61-71, 2001

⁷ Zollinger, H., Colour Chemistry – Syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments, 3a. rev-ed, HCA- Wiley-VCH, Alemanha, 2003.

⁸ Alcântara, M.R., Daltin, D., A química do processamento têxtil, Química Nova, v. 19, p.20-330, 1996.

hidrogênio (se tiverem grupos OH ou NH₂ na estrutura). Caracterizada pela presença de mais de um grupo azo na estrutura do corante.

2. Corantes ácidos

São corantes específicos para fibras protéicas e poliamídicas por troca iônica envolvendo o par de elétrons do nitrogênio do corante com o grupo carboxilato da fibra.

3. Corantes básicos

São solúveis em solução aquosa acidulada. São capazes de tingir lã, acrílico e seda natural.

4. Corantes azóicos

São corantes sintetizados diretamente na fibra no momento do tingimento, a partir da aplicação de dois compostos: o naftol e uma base insolúvel em água.

5. Corantes reativos

Formam uma ligação covalente com a fibra na presença de uma base. Estes corantes apresentam melhor solidez (dar resistência a um determinado material têxtil colorido contra determinados ataques físicos ou químicos) se comparada aos corantes diretos, por isso são considerados dentre todas as classes de corantes os mais importantes. Podem ser empregados tanto em fibras celulósicas, seda e lã⁸.

6. Corantes dispersos

São corantes insolúveis em água e são utilizados em todas as fibras hidrofóbicas. Para sua aplicação são necessários agentes dispersantes que geralmente estão inclusos na formulação do corante.

7. Corantes à tina ou de redução

São solúveis em água somente na presença de um forte agente redutor (hidrossulfito de sódio) em meio alcalino. São aplicados

basicamente nas fibras celulósicas. Apresentam elevados índices de solidez, ou em outras palavras, elevada fixação.

1.1.2. Azo corantes e seus produtos de degradação

Os azo corantes são compostos caracterizados pela presença da ligação azo ($-N=N-$) com ligantes do tipo fenil e naftil, com grupos substituintes tais como amino, cloro, hidroxila, metil ou nitro⁹.

Dentre as classes de corantes têxteis descritas no item 1.1.1, as que apresentam ligação azo são: diretos, reativos e dispersos.

Os azo corantes vêm sendo amplamente empregados em numerosas aplicações na indústria desde a metade do século 19, por apresentarem excelentes propriedades de fixação, serem facilmente sintetizados com baixo custo e pela durabilidade da cor. Atualmente no mundo, existem cerca de 3000 azo corantes, representando aproximadamente 65% dos corantes comerciais do mercado. Apresentam um vasto espectro de cor e são usados para colorir vários bens de consumo, tais como: couro, alimentos, brinquedos, plásticos, cosméticos e principalmente matriz têxtil (celulose, nylon, poliéster e poliamida)^{10,11}.

A grande demanda dos corantes sintéticos gerou uma preocupação quanto ao potencial risco à saúde humana, principalmente com relação aos azo corantes. Estudos biocinéticos têm demonstrado que os corantes solúveis em água são metabolizados na microflora intestinal mais rapidamente que compostos menos

⁹ Ventura de C. B., investigação da mutagenicidade do Azocorante comercial bdcp (Black Dye commercial product), antes e após Tratamento microbiano, utilizando o Sistema teste de allium cepa Tese de doutorado, Tese de doutorado, Rio Claro, 2009.

¹⁰ Chung, K.T., Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic aminas metabolically produced from azo dyes, J. Environ. Sci. Health – Part C Environm. Carcinog. Ecotox. Rev., v. 18, p. 51-74, 2000.

¹¹ Rafii, F.; Hall, J.D.; Cerniglia, C.E., Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by clostridium species from the human intestinal tract, Food. Chem. Toxicol., v. 35, p. 897-901, 1997.

solúveis¹². Assim, são os metabólitos que podem ser potencialmente carcinogênicos e mutagênicos.

Os subprodutos dos azo corantes são aminas aromáticas, como benzidina e seus derivados. As aminas aromáticas são compostos bem conhecidos por sua elevada toxicidade e suspeita de carcinogenicidade, como mostrado por Weisburger¹³. Freudenthal *et al*, relatam o risco de desenvolvimento de câncer em pessoas que se expõem por longos períodos a certas aminas aromáticas, tais como, benzidina, 4-aminobifenil, e 2-naftilamina, usadas em corantes da indústria têxtil¹⁴.

Alguns exemplos desses corantes estão ilustrados na Tabela 1.1.

¹² Guaratini, C.C.I.; Zanon, M.V.B., Corantes Têxteis, Química Nova, v. 23, p. 71-78, 2000.

¹³ Weisburger, J.H., Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health, Mutat. Res. – Fund. and Mechanisms of Mutagenesis., v. 506-507, p.9-20, 2002.

¹⁴ Freudenthal, R.J., Stephens, E., Anderson, D.P., Determining the potential of aromatic amines to induce cancer of the urinary bladder, Int. J.Toxicol., v. 18, p. 353-359, 1999.

Tabela 1.1: Alguns exemplos de azo corantes.

Nome comercial	C.I.	Estrutura química
Acid red 114	23635	<p>The chemical structure of Acid red 114 is a complex azo dye. It features a central biphenyl core. The left phenyl ring is substituted with a methyl group (H₃C) and a sulfonate group (-SO₃Na). The right phenyl ring is substituted with two methyl groups (CH₃) and an azo group (-N=N-) that connects to a naphthalene ring. The naphthalene ring is substituted with a hydroxyl group (HO-) and a sulfonate group (-SO₃Na).</p>
Congo red	22120	<p>The chemical structure of Congo red is a symmetrical azo dye. It consists of a central biphenyl core. Each phenyl ring is connected via an azo group (-N=N-) to a naphthalene ring. Each naphthalene ring is substituted with an amino group (-NH₂) and a sulfonate group (-SO₃Na).</p>

C.I.: color index

A biotransformação dos corantes azos está relacionada aos processos de redução, que podem ser potencializados por processos catalíticos enzimáticos. Hunger apresenta um esquema de redução anaeróbica desses corantes por enzima, as azoredutases, como segue¹⁵:

As principais vias de exposição dos consumidores a corantes azos (maior fonte de aminas aromáticas) são: ingestão oral, absorção da pele ou pelo trato respiratório. No primeiro caso, como exemplo, estão expostas as crianças que levam brinquedos à boca que contêm corantes têxteis. No caso de absorção pela pele, o favorecimento da eluição do corante (presente em roupa de couro, por exemplo) à pele ocorre por meio do suor, potencializada em regiões de elevada transpiração podendo causar dermatites de contato¹⁶. O contato pelas vias respiratórias pode causar quadros de alergia respiratória, como rinites e asma.

Assim, a União Européia, considerando que corantes azos, após a clivagem da ligação N=N, podem liberar aminas aromáticas (potencialmente carcinogênicas), banuiu o uso desses corantes utilizados na produção de artigos têxteis e couro, por meio de uma Diretriz 2002/61/EC. Estes, não podem liberar mais do que 30 mg/Kg de uma relação de 22 aminas aromáticas¹⁷.

Entretanto, devido a problemas econômicos, países de terceiro mundo como, Índia, México, Argentina, e até mesmo o Brasil, não interromperam completamente a fabricação desses corantes¹².

¹⁵ Hunger, K., *Chimia*, v. 48, p. 520, 1994.

¹⁶ Hausen, B. M.; Contact allergy to Disperse Blue 106 and Blue 124 in black 'velvet' clothes, *Contact Dermatitis*, v. 28, p. 169-173, 1993.

¹⁷ European Community, 2004. Disponível em: <http://www.cbi.nl/acessguide>, acessado em março de 2008.

1.2. Materiais têxteis

Os materiais têxteis, como muitos outros, exercem um papel fundamental na sociedade. São usados como vestuário para proteção ao corpo, promovem o conforto e decoração residencial quando usados nas formas de tapete, lençóis, estofados, cortinas, etc. Nas atividades industriais estão presentes como reforço de pneus, meios filtrantes, correias transportadoras, isolamento, etc.¹⁸.

Os materiais têxteis, tecidos e malhas, são produzidos das fibras (comprimentos finitos) ou filamentos (filamentos contínuos) por uma variedade de processos. Neste caso, fibras e filamentos são transformados em estruturas intermediárias de comprimento contínuo, conhecida como fios. Estes fios são entrelaçados por tecelagem ou tricotagem em estruturas flexíveis, planares, conhecidas como tecidos¹⁸.

Materiais naturais como algodão, lã e outros são referidos como fibras; entretanto, atualmente a mesma referência a fibras é usada para os materiais sintéticos. Assim, são incluídas não somente as fibras celulósicas, como também as polifibras¹⁸.

Em 1900, foram produzidas as primeiras fibras sintéticas incluindo as nitroceluloses. Descoberto por Carothers da Du Pont Co, o náilon foi a primeira fibra inteiramente sintética.¹⁹ Assim, iniciou-se a inclusão das fibras sintéticas no mercado mundial, cuja produção em 1974 ultrapassou os 56,7 bilhões. São produtos da reação de hexametenodiamina com ácido adípico para formar o sal de náilon ou adipato de hexametenodiamônio. A remoção de uma molécula de água desse composto produz a polihexametenoadipamida, uma poliamida linear. A classificação das fibras têxteis está em duas grandes categorias: de ocorrência natural e sintética. A classificação está apresentada na Tabela 1.2²⁰.

¹⁸ Mark, H.F.; Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley, New London, v. 22, 1984.

¹⁹ Bolton, E.K., Chemical Industry Medal: Development of Nylon, Ind. Eng. Chem., v. 34, p. 53-58, 1942.

²⁰ Shreve, R.N.; Brink Jr., J.A., Indústrias de Processos Químicos, trad. Horácio Macedo, 4ª. Ed., Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1980.

Tabela 1.2: Classificação das fibras têxteis:

De ocorrência natural	
Vegetal (baseadas em celulose), algodão, linho, cânhamo, juta e rami.	
Animal (baseada em proteína), lã, vicunha, pêlos de outros animais e seda	
	Mineral, Amianto
Fibras sintéticas	
• Baseadas em polímeros orgânicos naturais	Ryon (celulose regenerada)
	Acetato (derivados da celulose parcialmente acetilada)
	Triacetato (derivados da celulose completamente acetilada)
	Azlon (proteínas regenerada)
• Baseadas em polímeros orgânicos sintéticos	Acrílico (baseada em poliácridonitrila)
	Aramida (baseada em poliamidas aromáticas)
	Nylon (baseada em poliamidas alifáticas)
	Olefinas (baseadas em poliolefinas)
• Poliéster (baseada em poliéster de ácido carboxílico aromático)	Spandex (baseada em poliuretano segmentado)
	Vinyon (baseado em cloreto de polivinil)
• Baseadas em substâncias inorgânicas	
	Vidro
	Metal
	Cerâmica

1.3. Processos têxteis

Um processo têxtil engloba várias etapas, como: fiação, tecelagem e beneficiamento.

O processo por fiação é a transformação das fibras naturais ou sintéticas em fios. A tecelagem é o processo de transformação dos fios em tecidos propriamente dito.

O beneficiamento compreende a totalidade de processos que visam melhorar ou alterar materiais têxteis, tornando-os aptos para confecção ou uso em geral. As etapas do processo são: pré-tratamento, tingimento e acabamento final, sendo os dois últimos os mais importantes^{3,8}.

O pré-tratamento visa preparar o tecido para as demais etapas do processo de beneficiamento, como tingimento e acabamento final. Em alguns tipos de tecido, cerca de 10 % da matriz têxtil são consideradas impurezas, as quais acabam impedindo um tingimento eficiente.

Durante a etapa de pré-tratamento são eliminadas todas as impurezas agregadas ao substrato têxtil. Essa etapa envolve a chamuscagem, desengomagem, purga, alveamento, mercerização e secagem.

Na chamuscagem ocorre uma queima da penugem do pano por meio do contato direto com uma chama. Já a desengomagem visa remover a goma para tornar o substrato têxtil mais absorvente.

A purga, em processos têxteis, tem a finalidade de remover da matriz têxtil ceras naturais e os óleos lubrificantes.

No alveamento, ocorre a remoção de possíveis corantes naturais encontrados, por exemplo, na celulose. Esse tipo de procedimento é empregado especificamente quando se deseja obter um produto acabado branco. Para isso, são empregados peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio. O peróxido de hidrogênio é o mais empregado devido aos produtos de degradação do hipoclorito, que são prejudiciais ao meio ambiente, bem como a possibilidade de degradação da celulose.

A mercerização tem como objetivo conferir brilho, aumentar a afinidade do corante com a matriz têxtil e obter resistência. É empregada especificamente em

matriz 100% celulose. Esse processo é realizado por meio de um banho de soda cáustica concentrada, seguida de uma acidificação.

Na etapa de tingimento, um substrato têxtil tingido é definido como uma transformação física ou química desse substrato, para que a luz refletida apresente cores. O processo de tingimento pode ser realizado por esgotamento, processo contínuo ou semi-contínuo, estampagem e tingimento na massa de extrusão.

No ramo de beneficiamento têxtil, o processo por esgotamento (estacionário) se refere à proporção do corante que foi transferida do banho para o substrato têxtil. No processo contínuo, o corante é impregnado no material têxtil por meio de maquinaria em fluxo constante, para isso, o fim da peça (substrato têxtil) é emendado ao início da outra. O processo semi-contínuo é uma combinação do contínuo com o estacionário. O início do tingimento é dado pelo processo contínuo, mas a fase de difusão e fixação é realizada por meio do sistema estacionário.

A estampagem é definida como a aplicação parcial de pigmentos ou corantes em forma de desenhos, por exemplo, sobre substratos têxteis planos como tecidos ou malhas. Por outro lado, tingimento na massa, se entende como o processo de tingimento de fibras sintéticas antes da extrusão do fio, permitindo a fabricação direta dos fios tintos. Neste procedimento, se dá preferência ao uso de pigmentos, a fim de se obter tingimentos com elevada solidez. A limitação desse procedimento é a baixa flexibilidade a variedade de cores.

Variações nas técnicas de fixação do corante no substrato têxtil, podem ocorrer dependendo das características do corante, tipo de fibra têxtil e da técnica de aplicação. Essas interações podem se dar basicamente de duas formas, ou por forças de van der Waals, ou por ligações de hidrogênio.⁷

Devido à difusão, as partículas do corante migram para o interior da fibra por meio de interações dipolares de van der Waals, resultando na retenção do corante pela fibra têxtil, ou seja, a molécula de uma substância deve conter dipolo permanente. Assim, o lado positivo de uma molécula atrai o lado negativo do dipolo da outra molécula. Quando o material fibroso é imerso na solução do corante, as partículas são adsorvidas na superfície externa da fibra e difundem-se por canais capilares formados pelo espaçamento das fibras. Esse processo de adsorção continua até o momento que o equilíbrio é atingindo entre o corante em solução e ao

adsorvido na fibra, resultando em uma completa penetração do corante no material fibroso.

Por outro lado, as ligações de hidrogênio ocorrem basicamente entre as fibras de algodão (celulósicas) e os corantes diretos, pois os grupos hidroxilas das fibras celulósicas facilmente formam ligações de hidrogênio com os grupos amino e/ou hidroxila presentes nesta classe de corantes. Por exemplo, tem-se o congo red, cuja estrutura está ilustrada na Tabela 1.1.

O nylon e acrílicos, por sua vez, interagem com os corantes ácidos por meio de troca iônica entre o par de elétrons do nitrogênio do corante com o carboxilato da fibra I. Como exemplo de corante ácido, tem-se o Acid red 114, cuja estrutura está ilustrada na Tabela 1.1.

A literatura também destaca a formação de ligações covalentes como é o caso dos corantes reativos (descritos acima). Neste caso, o sítio cromofórico (sulfato-etilsulfônico) em meio alcalino é transformado em um grupo vinilsulfônico. Este grupo é responsável pelo aumento da afinidade do corante com a fibra, ou seja, os grupamentos vinilsulfônicos reagem com as hidroxilas da celulose, formando uma ligação éter, a qual proporciona uma alta estabilidade da cor do tecido tingido.

Durante a etapa de fixação do corante ao substrato, alguns processos que ocorrem devem ser levados em consideração, como: adsorção, difusão e afinidade. Por adsorção entende-se a propriedade de uma substância aglomerar-se na superfície de outra molécula, que no caso seria o substrato. Por outro lado, a difusão, é a transferência de uma molécula pela própria mobilidade. Por exemplo, um corante em uma solução aquosa, migra para locais de concentração divergente até ser alcançado o equilíbrio. Tratando-se de tingimento, a difusão significa a penetração e migração do corante na fibra têxtil. Por fim, a afinidade se refere à afinidade que um corante tem em se ligar ao substrato.

Com relação à última etapa do beneficiamento, ou seja, o acabamento final, sua finalidade é conferir aos materiais têxteis um aspecto que atenda às necessidades e anseios dos consumidores, e garantir melhor resistência ao uso. Dentre os objetivos a serem alcançados com esta etapa temos:

- Aumento da solidez a determinados ataques físicos ou químicos (solidez à fricção, à lavagem e ao suor) por meio da adição de fibras

poliméricas (acrilatos) que não são solúveis e tem a função de unir as fibras;

- Aumentar o brilho, por meio da adição de ácidos graxos;
- Evitar ataque microbiológico com adição de antibactericida;
- Aplicação de amaciantes, geralmente sais quaternários de amônio, silicones, entre outros;
- Aplicação de anti-mofo.

1.4. Técnicas de análise aplicadas à determinação de aminas aromáticas

Devido à grande importância em identificar e/ou quantificar as aminas aromáticas, muitos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para determiná-las. Para as aminas, tem-se usado a injeção em fluxo acoplada à voltametria com reação de bromação e diazotação ²¹, HPLC ²², HPLC-MS ²³, GC-MS ²⁴, espectrofotometria ^{25,26,5}, bem como a eletroforese capilar ^{27,28,29}.

²¹ Fogg, A.G.; Bsebsu, N.K.; Abdulla, M.A., Indirect flow injection voltammetric of aromatic amines by monitoring at a glassy carbon electrode the excess of nitrite remaining after their diazotization, *Analyst*, v. 107, p.1462-1465, 1982.

²² Narang, A.S., Choudhury, D.R., Richards, A., Separation of aromatic amines by thin-layer and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatographic Scie.*, 1982, v.20, p. 235-237.

²³ Sakai, T.; Morita, Y.; Kim, Y.; Tao, Y.X., LC-MS determination of urinary toluenediamine in workers exposed to toluenediisocyanate, *Toxicol. Letters*, v. 134, p. 259-264, 2002.

²⁴ Moldovan, Z.; Bayona, J.M.; Determination of novel aromatic amines in environmental samples by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 14, p.379-389, 2000.

²⁵ Okada, Y.; Sugane, A.; Watanabe, A.; Morita, Z., Color variations of anthraquinone and azo reactive dyes on cellulose caused by nitrogen oxides under wet conditions, *Dyes and Pigments*, v.76, p. 53-63, 2008.

²⁶ Laszlo, J.A., Regeneration of dye-saturated quaternized cellulose by bisulfite- mediated borohydride reduction of dye azo groups: An improved process for decolorization of textile wastewaters, *Environ. Sci. Technol.*, v. 31, p. 3647-3653, 1997.

²⁷ Cavallaro, A.; Piangerelli, V.; Nerini, F.; Avalli, S.; Reschiotto, C., Selective determination of aromatic amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction, *J.Chromatogr. A*, v. 709, p. 361-366, 1995.

²⁸ Asthana, A.; Bose, D.; Durgabanshi, A.; Sanghi, S.K.; Kok, W.Th., Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with electrochemical and fluorescence detection, *J.Chromatogr. A*, v. 895, p. 197-203, 2000.

1.4.1. Eletroforese capilar

Esta técnica foi introduzida na década de 80. O avanço da eletroforese capilar decorre da simplicidade instrumental, da variedade dos modos de separação que podem ser implementados com uma única coluna e pela diversidade de compostos que podem ser analisados.

O princípio da eletroforese é o movimento de partículas eletricamente carregadas sob a influência de um campo elétrico³⁰ (rever referencia).

Na técnica de eletroforese capilar, o fenômeno de eletroforese ocorre em um capilar de sílica fundida com diâmetro interno de 25 a 75 μm e comprimentos que variam de 50 a 100 cm, preenchido com tampão ou eletrólito de corrida. Os capilares são conectados a recipientes com o mesmo tampão, os quais contêm eletrodos que são conectados a uma fonte de alimentação. Quando uma tensão é aplicada, as espécies carregadas migram em direção ao eletrodo com carga contrária à das espécies no meio³¹. A Figura 1.1 mostra um esquema de eletroforese capilar.

Figura 1.1: Esquema de eletroforese capilar. Adaptado de Tavares³²

Diferentes estratégias têm sido estudadas para melhorar a eficiência da CE para determinação de aminas aromáticas, as quais estão compiladas na Tabela 1.3.

²⁹ Leung, S.A.; de Mello, A.J., Electrophoretic analysis of amines using reversed-phase, reversed-polarity, head-column field-amplified sample stacking and laser-induced fluorescence detection, J.Chromatogr. A, v. 979, p. 171-178, 2002.

³⁰ Baker, D.R., Capillary Electrophoresis. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

³¹ Landers

³² Tavares, M.F.M., Eletroforese capilar: conceitos básicos, Quimica Nova, v.19, p. 173-171, 1996.

Tabela 1.3: Trabalhos da literatura empregando eletroforese capilar.

Aminas	Modo CE	Matriz	Eletrólito	Deteção
6 aminas aromáticas em 12 min	CZE	Solução padrão	0,5 mol/L de ácido acético (pH 2,5)	condutométrica ³³
8 aminas primárias em 17 min	CZE	Solução padrão	10 mmol/L de tampão fosfato, 30% (v/v) de etanol, 0,3 mmol/L de Brij 35, 10 mmol/L de sulfato de sódio, pH 7,8	DAD ³⁴
2 aromáticas em 13 min	CZE	Solução padrão	0,05 mol/L de tampão fosfato, (pH 9,0)	LIF 488 nm ²⁹
9 aminas biogênicas Em 31 min	CZE	Vinho tinto	40 mmol/L de TBS, 25% (v/v) de 2-propanol, (pH 10,5)	UV-DAD, 230, 305, 360 e 480 nm ³⁵
6 Aminas heterocíclicas em 10 min	CZE	Vinho, cerveja, queijo e salame	15 mmol/L de His, 5 mmol/L de ácido adípico, 1,5 mmol/L de ácido sulfúrico, 0,1 mmol/L de EDTA, 0,1% de hidroxietilcelulose, 50% de MeOH, (pH 5,8)	Deteção condutométrica ³⁶
2 Aminas primárias em 25 min	CZE	Farmacêutica	50 mmol/L de tampão fosfato, 30 mmol/L de 18,6-éter coroa TCA, (pH 2.2)	UV 210 nm ³⁷

³³ Gong, X.Y.; Hauser, P.C., Determination of different classes of amines with capillary zone electrophoresis and contactless conductivity detection, *Electrophoresis*, v.27, p.468-473, 2006.

³⁴ Driouch, R.; Takayanagi, T.; Oshima, M.; Motomizo, S., Synthesis of water-soluble phenylazosalicylaldehyde analogues and their application to capillary electrophoretic determination of primary amines, *Electrophoresis*, v.27, p.3460-3466, 2006.

³⁵ García-Villar, N.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S., Capillary electrophoresis determination of biogenic amines by field-amplified sample stacking and in-capillary derivatization, *Electrophoresis*, 27, 2006, 474-483.

³⁶ Kvasnička, F.; Voldřich, M., Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection, *J. Chromatogr. A*, v.1103, p.145-149, 2006.

³⁷ Walbroehl, Y.; Wagner, J., Enantiomeric resolution of primary amines by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using chiral crown ethers, *J. Chromatogr. A*, 680, 1994, 253-261.

Tabela 1.3: Continuação

4 Aminas aromáticas	CZE	Urina e sangue	5 mmol/L de formato de amônio, (pH 2,0)	nESI-MS ³⁸
15 aminas heterocíclicas em 25 min	CZE	urina	40 mmol/L de tampão ácido fórmico/formato de amônio, (pH 4,5), 60% (v/v) de MeOH.	UV 213 nm ESI-MS ³⁹
8 aminas aromáticas em 35 min	CZE	água	60 mmol/L de ácido fosfórico, 65 mmol/L de tampão fosfato, 7 mmol/L de etilenodiamino, 12% (v/v) de MeOH, (pH 12)	DAD 210 nm ⁴⁰
5 aminas aromáticas em 3 min	CZE	água de rio	30 mmol/L de tampão acetato, (pH 4,5)	amperométrica ⁴¹
21 aminas aromáticas em 25 min	CZE	água e solo	50 mmol/L de tampão fosfato, 7 mmol/L de 1,3-diaminopropano (pH 2,35)	UV 280 nm ²⁷
15 aminas aromáticas em 50 min	MEKC	Resíduo de água	50 mmol/L de fosfato – (pH 8,5) 300 mmol/L de SDS, 10 mmol/L de ácido cítrico, 10 mmol/L de Tween 80	DAD 214 nm ⁴²
3 aminas aromáticas em 19 min	MEKC	Água de lago	35 mmol L ⁻¹ de DOSS, 8 mmol L ⁻¹ de borato de sódio e 40% de ACN (pH 8,5)	UV 214 nm LIF, 266 nm ⁴³

³⁸ Viberg, P.; Nilsson, S.; Skog, K., In-capillary micro solid-phase extraction and capillary electrophoresis separation of heterocyclic aromatic amines with nanospray mass spectrometric detection, Anal. Bional. Chem., v.378, p.1729-1734, 2004.

³⁹ Sentelhas, S.; Moyanos, E.; Puignou, L.; Galceran, M.T., J. Chromatogr. A, 1032, 2004, 193-201.

⁴⁰ Zho, Q.; Jiang, G.; Liu, J.; Cai, Y., Anal. Chim. Acta., v.509, p.55-62, 2004.

⁴¹ Shin, D.; Tryk, D.; Fujishima, A.; Muck Jr., A.; Chen, G.; Wang, J., Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrochemical detector for analysis of aromatic amines, Electrophoresis, v.25, p.3017-3023, 2004.

⁴² Jeevan, R.J.G.; Bhaskar, M.; Chandrasekar, R.; Rashakrishan, G., Analysis of arylamine isomers by micellar electrokinetic chromatography, Electrophoreis, v.23, p.584-590, 2002.

⁴³ Wall, W.; Chan, K.; Rassi, Z. El., Electrically driven microseparation methods for pesticides and metabolites: VI. Surfactant-mediated electrokinetic capillary chromatography of aniline pesticidic metabolites derivatized with 9-fluoroenylmethyl chloroformate and their detection by laser-induced fluorescence, Electrophoresis, v.22, p.2320-2326, 2001.

Tabela 1.3: continuação

13 aminas aromáticas em 20 min	MEKC	água	501 mmol/L de SDS, 50 mmol/L de ácido fosfórico 50 mmol/L de trietanolamina, 50 mmol/L de uréia, 20% de acetonitrila, (pH 2,0)	DAD 214 nm ⁴⁴
13 aminas aromáticas em 7,2min	EKC	Solução padrão	20 mmol/L de citrato, 5 mmol/L de β -CD, 0,9% de ácido polivinilsulfônico (PVS), pH 3,5	UV 211 nm ⁴⁵

β -CD- β -ciclodextrina; SDS – dodecil sulfato de sódio; TCA – ácido tetracarboxílico; EDTA - ácido etilenodiaminotetracético; TBS – tetraborato de sódio; DOSS – dioctil sulfosucinato; ACN – Acetonitrila; DAD – Detector de arranjo de diodos; LIF - detector de fluorescência induzida por laser.

1.4.2. Cromatografia líquida

A técnica de HPLC é considerada como técnica oficial para análise de muitos compostos dentre eles as aminas aromáticas. Na literatura são encontrados muitos trabalhos com o emprego da HPLC, com diferentes sistemas de detecção, para a análise de aminas aromáticas em diferentes matrizes, como ilustrado na Tabela 1.4.

⁴⁴ Quirino, J.P.; Iwai, Y.; Otsuka, K.; Terabe, S., Determination of environmentally relevant aromatic amines in the ppt levels by cation selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography, Electrophoresis, v.21, p.2899-2903, 2000.

⁴⁵ Zakaria, P.; Macka, M.; Haddad, P.R., Mixed-mode electrokinetic chromatography of aromatic bases with two pseudo-stationary phases and pH control, J. Chromatogr. A, v.997, p.207-218, 2003.

Tabela 1.4: Trabalhos da literatura empregando cromatografia líquida

Aminas	matriz	Fase móvel	Fase estacionária	deteção
Aminas aromáticas	Água de descarte	40% de metanol e 60% de acetate de amônio aquoso, 0.1 M, pH 3,5-4,0	Fase reversa C ₁₈ (25 cm x 3 mm)	Voltamétrica UV 280 nm ⁴⁶
16 aminas (em 32 min)	Água industrial de extrato de lama	Gradiente de água e metanol (40-100 %)	C18 – Regis Chemical Co. Morton Grove, IL, (25 x 0,46 cm)	PB-MS quadrupolo ⁴⁷
3 Aminas aromáticas em ca. 25 min	Águas de superfície e efluentes industriais	Gradiente de ACN e tampão fosfato (5 mmol/L), (pH 7,0), 25% - 80% de ACN	Octadecilsilica Bakerbond ENV (30 x 4,6 mm)	DAD 244, 287 e 367 nm ⁴⁸
7 aminas aromáticas em 50 min	Couro	Gradiente de ACN e 3 mmol/L de tampão fosfato (pH 7) 15 - 60%	Fase reversa C18 (250 x 3 mm)	PDA (photodiode array detector) ⁴⁹
20 aminas aromáticas em	Plásticos laminados	Gradiente de: A: 4,7 mmol/L de PFPA-H ₂ O B: 4,7 mmol/L de PFPA-MeOH A (20 % - 80%)	Fase reversa C-18	MS ⁵⁰

⁴⁶ Barek, J.; Pacáková, V.; Štulík, K.; Zima, J., Monitoring of aromatic amines by HPLC with electrochemical detection. Comparison of methods for destruction of carcinogenic aromatic amines in laboratory wastes Talanta, v.32, p.279-283, 1985.

⁴⁷ Voyksner, R.D.; Rolf, S.; Keever, J.T.; Freeman, H.S.; Hsu, W.N., Determination of aromatic amines originating from azo dyes by chemical reduction combined with liquid chromatography/mass spectrometry, Environ. Sci. Technol., v.27, p.1665-1672, 1993.

⁴⁸ Bouzige, M.; Legeay, P.; Pichon, V.; Hennion, M.C., Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congeners and related azo dyes in surface water and industrial effluents, J. Chromatogr. A, v.846, p.317-329,1999.

⁴⁹ Sparr, E. C.; Davidsson, R.; Mathiasson, L., A., Harmful azo colorants in leather - Determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic aromatic amines using modern extraction techniques J. Chromatogr. A, v.955, p.215, 2002.

⁵⁰ Mortensen, S.K.M., Trier, X.T., Foreverskov, A., Petersen, J.H., Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food stimulants liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A., v. 1091, p. 40-50, 2005.

Tabela 1.4: continuação				
Toluene diamina e metileno dianilina	Extratos de poliuretano	Gradiente de ACN/H ₂ O/ácido fórmico (70/30/0,01 a 50/50/0,01)	Coluna com interação hidrofílica - HILIC	MS ⁵¹

PFPa: ácido pentafluoropropioni

⁵¹ Johnson, J.R., Karlsson, D., Dalene, M., Skarping, G., Determination of aromatic amines in aqueous extracts of polyurethane foam using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry., Anal. Chim. Acta., v. 678, p.117-123, 2010.

Capítulo 2

Determinação das constantes de dissociação ácido-base das 20 aminas aromáticas

2.1. Introdução

A constante de dissociação ácida-base é uma propriedade fundamental de ácidos e bases fracos, e é expressa como pK_a (logaritmo negativo de K_a); para compostos que apresentem um grupo ionizável, o pK_a é definido como sendo o pH no qual um composto está 50 % ionizado ¹. Uma vez sendo estabelecido o valor de pK_a de um composto é possível ser calculada a extensão de ionização deste em qualquer pH¹.

A extensão da ionização de um composto é uma das propriedades fundamentais para estimar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de compostos em sistemas biológicos e ambientais, informações de extrema relevância, como por exemplo, para o desenvolvimento de novos fármacos de uso humano e veterinário¹.

Dessa forma, muitos métodos tem sido usados para a determinação de pK_a 's de substâncias. A técnica padrão para a medida dessas constantes sempre foi a titulação potenciométrica. Nesta, a amostra é titulada com ácido ou base usando um eletrodo de pH para monitorar o curso da titulação. O valor de pK é calculado por meio da metade do volume necessário para se atingir o ponto de equivalência (ponto onde a reação se completa totalmente) e comparado com a titulação de um branco (solução sem amostra)^{2,3,4}. Como desvantagens desta técnica destacam-se a necessidade de grande quantidade de amostra (vários mililitros, ca. 5 mL) ou solvente, o tempo de titulação para cada composto, que varia de 20 a 40 min¹.

A literatura também reporta o uso da titulação potenciométrica em duas fases (orgânica e aquosa), entretanto neste caso, se determina não somente o pK_a como também o $\log P$ onde P é o coeficiente de partição solvente-água⁵. O $\log P$ é usado

¹ Polle, S.K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C.F. , Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A, v. 1037, p. 445-454, 2004.

² Avdeef, A.,. pH-metric solubility. 1. Solubility-pH profiles from Bjerrum plots. Gibbs buffer and $pK(a)$ in the solid state, Pharm. Pharmacol. Commun., v.4, p.165-178, 1998.

³ Avdeef, A.,. PH-Metric $\log P$. Part 1. Difference plots for determining ion-pair octanol-water partition coefficients of multiprotic substances, Quant. Struct. Act. Relat., v.11, p.510-517,1992.

⁴ Albert, A., Serjeant, E.P.,. The Determination of Ionization Constants. London: Chapman and Hall, 1984.

• ⁵ Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y.,. PH-metric $\log P$ 11. $pK(a)$ determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures, J. Pharm. Biomed. Anal. V.20, p.631,1999.

juntamente com o pK_a em modelos de lipofilicidade para estimar propriedades biofísicas e ambientais.

Uma alternativa a essas técnicas para a determinação de valores de pK_a dos compostos é a titulação espectrofotométrica, desde que estes compostos sejam solúveis em água e de elevada pureza, ou que apresentem impurezas que não interfiram nas medidas espectroscópicas¹. A vantagem desta metodologia é a elevada sensibilidade (ca. $> 10^{-6}$ mol/L) para compostos com relativa absorvidade molar, ou seja, a molécula precisa ter grupo cromóforo próximo dos grupos ionizáveis, bem como exibir diferenças espectrais entre as formas neutras e ionizadas. A titulação espectrofotométrica é considerada seletiva quando se emprega espectrômetro com arranjo de diodos. Portanto, a alteração do espectro revela a quantidade de espécies neutras e ionizadas presentes. Uma grande mudança de absorbância ocorre no pH correspondente ao pK_a da espécie¹.

Ainda, outra técnica que pode ser empregada com sucesso para a determinação das constantes de dissociação ácido-base é a eletroforese capilar, pois a mesma apresenta como vantagem, a possibilidade do emprego de amostras impuras, os instrumentos são automatizados, e ainda requerem pouca ou nenhuma modificação para um máximo de aplicações. Ainda, detectores de UV são geralmente empregados, e é desnecessário o conhecimento da concentração da amostra, bem como um mínimo consumo desta é empregado¹. Neste caso, os valores de pK_a são determinados a partir das mobilidades efetivas dos compostos ionizados em uma série de soluções de eletrólitos de força iônica constante a diferentes pHs.

Para descrever a relação que se tem entre pK_a e a mobilidade efetiva dos compostos ionizados, precisa-se considerar o equilíbrio termodinâmico de dissociação ácido-base, como por exemplo de um ácido fraco HA:

$$K_a = \gamma_{A^-} \gamma_{H^+} [H^+][A^-] / \gamma_{HA} [HA] \quad (2)$$

onde K_a é a constante termodinâmica de dissociação ácida, γ é o coeficiente de atividade, e os termos entre colchetes são a concentração molar. Considerando que a atividade dos compostos neutros é a unidade e que o pH é igual $-\log \gamma_{H^+} [H^+]$, a equação 2 pode ser rearranjada, como demonstrado na equação 3¹.

$$pK_a = pH - \log \gamma_{A^-} - \log [A^-]/[HA] \quad (3)$$

Estimando o coeficiente de atividade dos íons em eletrólito diluído a uma temperatura de 25 °C, a partir da teoria da Debye-Hückel, temos

$$-\log \gamma = 0,5z^2\sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) \quad (4)$$

onde z é a carga do íon, I é a força iônica do meio e a o diâmetro do íon hidratado em angstroms¹. A equação 4 é denominada de equação estendida de Debye-Hückel (EDHE)⁶.

Por substituição da equação 4 na 3 temos:

$$pK_a = pH - \log [A^-] / [HA] + [0,5085z^2\sqrt{I} / 1 + 0,3281a\sqrt{I}] \quad (5)$$

Assim, para se determinar o valor do pK_a , é necessário obter a razão $[A^-] / [HA]$ em um eletrólito de composição e pH conhecidos.

Em eletroforese capilar, a mobilidade efetiva (μ_{ef}) é usada para descrever as mobilidades eletroforéticas das formas iônicas das espécies em equilíbrio, em função do pH da solução¹.

Assim, para um ácido monoprótico, por exemplo, a μ_{ef} pode ser dada por:

$$\mu_{ef} = \alpha\mu_{ep},$$

onde α é a fração molar da forma aniônica e μ_{ep} é a mobilidade eletroforética do ânion.

A fração do ácido monoprótico é dada pela equação 6.

$$\alpha = K_a / [H^+] + K_a \quad (6)$$

ou

$$\alpha = 1 / [1 + 10^{(pK_a - pH)}] \quad (7)$$

Assim, escrevendo a relação $[A^-] / [HA]$ em função de μ_{ef} temos:

⁶Laitinen, H.A.; Harris, W.E., Chemical Analysis, 2ª ed, McGraw-Hill, United States of América, 1975.

$$\mu_{ef} = \left[10^{-pK_a} / \left[10^{-pK_a} + 10^{-pH} \right] \right] \mu_{ep} \quad (8)$$

Para um caso geral, a μ_{ef} é dada por:

$$\mu_{ef} = \sum \alpha_i \mu_{epi} \quad (9)$$

onde, α_i são as frações molares das espécies i.

Para uma base fraca com dois centros de ionização, BH_2^{++} por exemplo, a mobilidade efetiva pode ser descrita pelas equações de 10 a 12¹.

$$\mu_{ef} = \mu_{BH_2^{++}} \alpha_{BH_2^{++}} + \mu_{BH^+} \alpha_{BH^+} \quad (12)$$

Entretanto, a mobilidade efetiva pode ser calculada por meio de dados experimentais, como descrito pela equação 13, onde, L_{tot} e L_{det} que são os comprimentos do capilar, total e até o detector, respectivamente; V é a tensão aplicada e t_s e t_f são os tempos de migração do composto e tempo de migração do fluxo eletrosmótico, respectivamente.

$$\mu_{ef} = L_{tot} \cdot L_{det} / V \left[1 / (t_s - 1 / t_f) \right] \quad (13)$$

Assim, com os dados experimentais pode-se construir uma curva μ_{ef} x pH, onde a partir do ponto de inflexão se obtém a constante ácido-base dos compostos.

Cleveland e Cluck, em 1994, determinaram os valores de pK_a para 18 solutos, via eletroforese capilar. Estes valores foram comparados com os apresentados na base de dados da IUPAC e apresentaram uma variação de 0,07 unidades apenas, a exceção dos pK_a s acima de 9, os quais apresentaram uma diferença de até 0,44 unidades. Entretanto, os autores destacaram que a adsorção e o efeito da

concentração não representaram contribuições potenciais para essas diferenças constatadas ⁷.

Em 2004, Včeláková *et al.* determinaram as mobilidades catiônicas e os valores de pK_a de 22 amino ácidos por eletroforese capilar, por meio de curvas de mobilidade em função do pH. Estas foram construídas por meio da determinação das mobilidades efetivas em função de diferentes pHs (2 a 3,2) do eletrólito de corrida que neste caso foi o ácido cloroacético ($pK_a=2,87$) ⁸.

Os autores Šlampová e Boček demonstraram a utilidade de uma ferramenta estatística de tratamento de dados para construção de curvas de mobilidade para bases fracas univalentes, sendo possível estimar com precisão os parâmetros da curva de mobilidade, tais como, constante de dissociação (K) e mobilidade iônica das bases protonadas⁹.

A literatura também revela a adequação ou não de um ou outro eletrólito de corrida para na determinação de valores das constantes ácido base. Ràfols e colaboradores utilizaram diferentes soluções tampões para a determinação de pK_a de piridina, aminas e fenóis, por eletroforese capilar, e verificaram que tampões como fosfato, amônio, butilamônio, etilamônio, dietilamônio não são recomendados pois eles interagem com os compostos promovendo valores de pK_a errôneos¹⁰. Assim, dentre os tampões estudados, na Tabela 2.1 estão relacionados os tampões sugeridos pelos autores para a determinação principalmente de aminas e piridina¹⁰.

⁷ Gluck, S.J., Cleveland Jr, J.A., Investigation of experimental approaches to the determination of pK_a values by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A, v. 680, p. 43-48, 1994.

⁸ Včeláková, K., Zusková, I., Kenndler, E., Gaš, B., Determination of cationic mobilities and pK_a values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis, Electrophoresis, v. 25, p. 309-317, 2004.

⁹ Šlampová, A.; Boček, P., Statistical data processing of mobility curves of univalent weak bases, Electrophoresis, v. 29, p. 538-541, 2008.

Tabela 2.1: Tampões sugeridos para o preparo dos eletrólitos para a determinação das constantes ácido-base de aminas e piridina⁹.

Tampão	pK _a	Faixa de tamponamento
CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ (a)	4,76	3.70 – 5.80
MES/MES ⁻ (b)	6.15	5.00 – 7.20
BisTrisH ⁺ /BisTris ^(c)	6.48	5.50-7.50
HEPES/HEPES ⁻ (d)	7.51	6.50-8.70
TrisH ⁺ /Tris(e)	8.08	7.00-9.00
CHES/CHES ⁻ (f)	9.50	8.40-10.10
CAPS/CAPS ⁻ (g)	10.40	8.50-10.800

(a) tampão acetato

(b) tampão ácido 2-morfolinoetanosulfônico

(c) 2-Bis (hidroximetil) -2,2', 2'' nitrilotriethanol

(d) N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

(e) tris(hidroximetil)

(f) ácido 2-(ciclohexil-amino) etanosulfônico

(g) ácido 2-(ciclohexil-amino) 1-propanosulfônico

2.2. Parte experimental

2.2.1. Instrumentação

Foi empregado um sistema para eletroforese capilar da marca Agilent (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado com um detector UV – DAD, operado a um comprimento de onda fixo de 200 nm com fonte de alta tensão (0-30 kV), sistema de refrigeração a ar, sob uma temperatura de 25 °C e uma injeção de 50 mBar por 5 s. E, um programa de aquisição de dados (HP Chemstation, ver A.06.01) também foi empregado.

Os capilares empregados foram de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA), revestidos externamente com poliimida com dimensões que variaram de 60 cm, 50 cm e 40 cm de L_{tot} x 50 µm d.i. .

¹⁰ Fuguet, E., Reta, M., Gibert, C., Rosés, M., Bosch, E., Ràfols, C., Critical evaluation of buffering solutions for pKa determination by capillary electrophoresis, Electrophoresis, V. 29, p. 2841-2851, 2008.

2.2.2. Materiais, Reagentes e Soluções

Toda vidraria e frascos do equipamento (*vials*) foram limpos primeiramente por imersão dos mesmos em um banho de álcool comercial submetido ao ultrassom por 10 min, seguida de um banho com Extran, (um detergente não iônico) por 2 h sob aquecimento (c.a. 80 °C), posteriormente lavados com água de torneira até completa remoção deste detergente seguidos de 3 lavagens sucessivas de água destilada com posterior lavagem com água deionizada ultrapura (Milli-Q - 18,2 MΩ.cm a 25 °C).

Os reagentes, bem como os padrões empregados até então foram todos de grau analítico, e, as soluções foram todas preparadas em água deionizada e purificada (Milli-Q), à exceção das soluções estoque (1000 mg L⁻¹), as quais foram todas preparadas em MeOH (grau HPLC J.T.Baker, Xalostoc, México). Preparo da TEA (triethylamina, pa J.T.Baker, Xalostoc, México): solução estoque foi preparada por meio de pesagem da solução e avolumadas com água.

2.2.3. Padrões empregados

Aminas: 5-nitro-o-toluidina, sulfato de 4-metoxi-1,3-fenilenodiamina, 3,3-dimetil-4,4-diaminodifenilmetano, 2,4,5-trimetilanilina, 4,4-metilenodianilina, 4,4-oxidianilina, 4,4-tiodianilina, 4-aminobifenil, 3,3-dimetoxibenzidina, b- naftilamina, benzidina, 4—cloro-o-toluidina, o-aminoazotolueno, 4-cloroanilina, 3,3-diclorobenzidina, o-tolidina (3,3-dimetilbenzidina), 6-metoxi-m-toluidina, 4,4-metileno-bis-(2-cloro-anilina), 2-metoxi-anilina e 4-aminoazobenzeno.

2.2.4. Preparo dos tampões

Tampões formato e acetato de sódio: ambos foram empregados para os pHs menores que 5,5 e foram preparados por meio de diluições das soluções estoque dos respectivos sais, e, o pH desejado foi acertado com ácido fórmico e acético 0,1 mol/L, respectivamente para o tampão formato e acetato.

Tampões Tris e MES: estes também foram preparados por diluição das soluções estoque dos mesmos e os pHs 6,00 e 7,02 foram acertados com solução de HCl (12 mol/L) e Trietilamina (100%, (v/v)), respectivamente para Tris e MES.

2.3. Resultados e discussão

Em eletroforese capilar é de extrema importância o conhecimento do valor das constantes ácido-base dos compostos, pois a mobilidade dos compostos está diretamente ligada ao grau de ionização dos mesmos, como já mencionado anteriormente. Neste sentido estas constantes, bem como a mobilidade das 20 aminas aromáticas de interesse nesse trabalho foram determinadas por meio de curvas de mobilidade. Os respectivos valores foram obtidos por meio do programa Maccurvefit (comprado).

A relação das aminas aromáticas, proibidas pela Diretiva, estão ilustradas na Tabela 2.2. As suas estruturas químicas, bem como seus espectros UV-vis estão apresentados nas Figuras 2.1 e 2.2, respectivamente. Vale ressaltar que das 22 aminas aromáticas listadas pela Diretiva apenas 20 serão consideradas nesta Tese, pois duas delas são consideradas pela própria Diretiva como produtos de degradação de outras duas.

Tabela 2.2: Relação das amins proibidas pela Diretiva juntamente com o nome IUPAC, CAS e massa molar (MM).

Amina	Número das amins	Cas number	(MM) *
Benzidina	1	92-87-5	184,24
4,4'-oxidianilina	2	101-80-4	200,24
4,4'-metilenondianilina	3	101-77-9	198,22
4-metoxi-m-fenilenodiamina	4	615-05-4	138,17
4,4'-tiodianilina	5	139-65-1	216,3
3,3'-dimetil-4,4'-diaminodifenilmetano	6	838-88-0	226,32
o-tolidina (3,3'-dimetilbenzidina)	7	119-93-7	212,29
3,3'-dimethoxybenzidina	8	119-90-4	244,29
2-metoxi-anilina	9	90-04-0	123,15
4-cloroanilina	10	106-47-8	127,57
6-metoxi-m-toluidina	11	120-71-8	137,18
2-naftilamina	12	91-59-8	143,19
4-cloro-o-toluidina	13	95-69-2	141,60
2,4,5-trimetilanilina	14	137-17-7	135,21
4-aminobifenil	15	92-67-1	169,22
4,4'-metileno-bis-(2-cloro-anilina)	16	101-14-4	267,15
3,3'-diclorobenzidina	17	91-94-1	253,13
4-aminoazobenzeno	18	60-09-3	197,24
o-aminoazotolueno	19	97-56-3	225,29
5-nitro-o-toluidina	20	99-55-8	152,15

* Dados do Scifinder (Advanced Chemistry Development (ACD/ Labs) Software V8.14 for Solaris (© 1994-2009/ Labs)

Benzidina
[1]

4,4'-metilenodianilina
[3]

4,4'-tiodianilina
[5]

o-tolidina (3,3-dimetilbenzidina)
[7]

4,4'-oxidianilina
[2]

4-metoxi-metafenilenodiamina
[4]

3,3-dimetil-4,4'-diaminodifenilmetano
[6]

3,3-dimetoxibenzidina
[8]

Figura 2.1: Estrutura química de 20 aminas proibidas pela Diretiva 2002/61/EC.

Figura 2.1: (continuação).

2-metoxi-anilina
[9]

4-cloroanilina
[10]

6-metoxi-m-toluidina
[11]

2-naftilamina
[12]

4-cloroanilina
[13]

2,4,5-trimetilanilina
[14]

4-aminobifenil
[15]

4,4'-metileno-bis-(2-cloro-anilina)
[16]

3,3'-diclorobenzidina
[17]

4-aminoazobenzeno
[18]

o-aminoazotolueno
[19]

5-nitro-toluidina
[20]

Figura 2.2: Espectros de absorção das 20 aminas aromáticas obtidos com dectector UV-vis com DAD na faixa de 190-600 nm. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 50 mmol/L, pH=2,50 acertado com ácido fosfórico.

Figura 2.2. (continuação)

Determinação das constantes de dissociação ácido-base das 20 aminas aromáticas

Pelo fato de a literatura não apresentar todos os valores de constantes ácido-base (pK_a) de cada uma das 20 aminas aromáticas, estas foram determinadas via eletroforese capilar por meio de curvas de mobilidade com tampões sugeridos pela literatura, ou seja, para cada pH, um tampão específico foi empregado. Os tampões empregados foram os descritos na Tabela 2.1, bem como o tampão MES, o qual interage com os analitos somente quando empregado um pH maior que seu pK_a ¹⁰. Portanto, neste caso como o pH usado para o MES foi de 6,00 e o respectivo valor de pK_a é de 6,1, o problema descrito foi desconsiderado.

Para todos os pHs empregados, a força iônica foi mantida fixa em 0,0105 mol/L^{7,10}. Para manter a força iônica em 0,0105 mol/L foi considerada a seguinte relação:

$$I = \frac{1}{2} \sum (Z^2 C) \dots\dots\dots 14$$

onde, I é a força iônica do meio, C é a concentração das espécies iônicas do meio e Z a carga de cada íon¹¹.

A Figura 2.3 ilustra a força iônica constante em todos os sistemas de eletrólitos empregados.

¹¹ Laitinen, H.A., Harris, W.E., Chemical Analysis an Advanced text and reference. USA, McGraw-Hill, Inc., 1975.

Figura 2.3: Gráfico da força iônica versus pH para sistema de eletrólito empregado

As mobilidades efetivas para cada amina aromática foram determinadas em todos os pHs estudados por meio da equação 13, e esses pontos experimentais foram ajustados por meio da equação 12.

A Figura 2.4 ilustra os pontos experimentais (mobilidades efetivas) ajustados para cada uma das aminas estudadas em função do $[H^+]$. Não foi possível ilustrar as mobilidades efetivas em função do pH para cada uma das aminas devido a problemas de configuração do software. E, na Figura 2.5 estão ilustradas as curvas de mobilidade ajustadas sem as mobilidades efetivas experimentais, de todas as aminas.

Figura 2.4: Mobilidade efetiva em função de $[H^+]$ para cada uma das 20 aminas. Curvas ajustadas em função de $\log[H^+]$. (A) amina 1; (B) amina 2; (C) amina 3; (D) amina 4; (E) amina 5; (F) amina 6; (G) amina 7; (H) amina 8; (I) amina 9; (J) amina 10; (K) amina 11; (L) amina 12; (M) amina 13; (N) amina 14; (O) amina 15; (P) amina 16; (Q) amina 17; (R) amina 18; (S) amina 19 e (T) amina 20. A curva de regressão com melhor ajuste foi calculada por meio da equação 12. Programa empregado: MacCurveFit 1.5 (PPC). R^2 : coeficiente de correlação; SSE: soma dos quadrados dos erros.

Figura 2.4: continuação

Figura 2.4: continuação

Por meio das curvas de mobilidade construídas, tanto as mobilidade iônicas quanto os valores de pK_a foram obtidos, os quais estão discriminados na Tabela 2.3.

Com os valores de pK_a e mobilidade iônica de cada uma das aminas, é possível obter o pH ideal para a separação das 20 aminas aromáticas, ou seja, pH no qual se tem a separação do maior número possível de aminas aromáticas. A sigmóide para as aminas 1,13,16,17,18,19 e 20 não está bem definida devido ao baixo número de pontos experimentais obtidos.

Ao avaliar a Figura 2.5 observa-se que tanto no pH onde a mobilidade iônica é menor (maior que 3,0) quanto máxima (menor que 3,0) nenhuma condição é satisfatória, em termos de separação das aminas. Portanto, conclui-se que será praticamente impossível obter uma separação em linha de base de todas as aminas. Vale ressaltar que as curvas individuais estão em posição inversa, também por motivos de configuração do software.

Figura 2.5: Mobilidade efetiva versus pH das 20 aminas aromáticas obtidas por meio do simulador SIMLACE.

Tabela 2.3: Relação das mobilidades iônicas e constante de dissociação ácido-base das aminas proibidas pela Diretiva.

Amina	$\mu_{i2} / 10^{-5}$ (cm ² . V ⁻¹ . s ⁻¹)	$\mu_{i1} / 10^{-5}$ (cm ² . V ⁻¹ . s ⁻¹)	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _a *
1	50,0	35,0	3,49 ± 0,34	4,80 ± 0,12	4,26
2	45,1	30,0	4,15 ± 0,13	5,30 ± 0,10	5,48
3	45,0	25,0	4,30 ± 0,22	5,40 ± 0,23	5,32
4	46,3	25,6	4,18 ± 0,12	5,40 ± 0,10	5,27
5	45,1	26,3	4,12 ± 0,07	5,70 ± 1,16	4,55
6	40,6	24,3	3,33 ± 0,39	5,00 ± 0,08	5,18
7	40,0	22,0	3,35 ± 0,01	4,40 ± 0,03	4,59
8	43,2	25,8	4,16 ± 0,15	5,20 ± 0,47	4,70
9	-	35,0	4,40 ± 0,05	-	4,54
10	-	28,0	3,96 ± 0,11	-	3,97
11	-	31,0	4,91 ± 0,75	-	4,66
12	-	30,0	4,22 ± 0,03	-	4,20
13	-	25,0	3,79 ± 0,05	-	3,81
14	-	27,1	5,14 ± 0,04	-	5,10
15	-	26,0	4,11 ± 0,07	-	4,26
16	-	16,0	2,76 ± 0,14	-	3,33
17	11,1	0,60	3,19 ± 0,09	5,3 ± 0,77	2,70
18	-	12,0	3,92 ± 0,10	-	3,20
19	-	8,60	2,82 ± 0,15	-	3,01
20	-	6,00	2,47 ± 0,23	-	2,34

* Dados do Scifinder (Advanced Chemistry Development (ACD/ Labs) Software V8.14 for Solaris (© 1994-2009/ Labs)

2.4. Conclusão do capítulo

Por meio dos resultados apresentados, conclui-se que tanto as mobilidades iônicas quanto as constantes ácido-base podem ser determinadas por meio de eletroforese capilar em zona. Ainda, os valores de pKa obtidos foram compatíveis com os calculados apresentados pelo Scifinder. Portanto, o pH ideal de separação das 20 aminas pode ser obtido por meio do simulador SIMLACE (desenvolvido no laboratório). A busca por um pH no qual se obtém a separação do maior número de aminas aromáticas realizada de forma univariada pode não ser satisfatória, ou seja, o pH ideal pode não ser encontrado.

Capítulo 3

Otimização de métodos por eletroforese capilar

3. Introdução

Neste capítulo será abordado o estudo de três métodos para a separação das 20 aminas aromáticas, considerando melhor pH, força iônica, tensão aplicada e condicionamento do capilar. Ainda, foram avaliadas a formação e interferência de produtos de degradação de algumas aminas, bem como um estudo de extração das aminas aromáticas primeiramente por meio de padrões e posteriormente com matriz têxtil sintética. Por fim, algumas figuras de mérito foram obtidas com intuito de promover a validação do método 3 proposto.

3.1. Procedimento experimental

3.1.1 Materiais, Reagentes e Soluções

Toda vidraria e frascos do equipamento (vials) foram limpos primeiramente por imersão dos mesmos em um banho de álcool comercial submetido ao ultrassom por 10 min, seguida de um banho com Extran, (detergente não iônico) por 2 h sob aquecimento (ca. 80 °C), posteriormente lavados com água de torneira até completa remoção deste detergente seguidos de 3 lavagens sucessivas de água destilada com posterior lavagem com água deionizada ultrapura (Milli-Q - 18,2 MΩ.cm a 25 °C).

Os reagentes, bem como os padrões empregados até então foram todos de grau analítico, e, as soluções foram todas preparadas em água deionizada e purificada (Milli-Q), à exceção das soluções estoque (1000 mg/L), as quais foram todas preparadas em MeOH (grau HPLC, J.T.Baker, Xalostoc, México). Também foi empregado o solvente acetonitrila (grau HPLC, J.T.Baker, Xalostoc, México). As soluções de trabalho foram todas preparadas diariamente e avolumadas com água ultra pura.

Soluções estoque de TEA (triethylamina, p.a J.T.Baker, Xalostoc, México): foram preparadas em meio aquoso e através da pesagem do soluto.

Como solventes, foi empregado neste trabalho, o metanol, acetonitrila, n-butanol, n-propanol, e n-octanol (p.a J.T.Baker, Xalostoc, México). As soluções de trabalho, bem como o eletrólito usado na otimização do sistema ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$), foram todos de grau analítico (Merck, 99%), preparadas diariamente e avolumadas com água ultra pura.

A solução aquosa de CTAB 10 mmol/L (Sigma Aldrich, 99%) foi preparada por solubilização em ultra-som por 15 minutos.

As soluções de polibreno (Sigma Aldrich, 98%), sulfato de dextran (sigma aldrich, 98%) foram preparadas por solubilização em água ultra-pura.

3.1.2. Padrões empregados

Aminas: 5-nitro-o-toluidina, sulfato de 4-metoxi-1,3-fenilenodiamina, 3,3-dimetil-4,4-diaminodifenilmetano, 2,4,5-trimetilanilina, 4,4-metilenodianilina, 4,4-oxidianilina, 4,4-tiodianilina, 4-aminobifenil, 3,3-dimetoxibenzidina, b- naftilamina, benzidina, 4-cloro-o-toluidina, o-aminoazotolueno, 4-cloroanilina, 3,3-diclorobenzidina, o-tolidina (3,3-dimetilbenzidina), 6-metoxi-m-toluidina, 4,4-metileno-bis-(2-cloro-anilina), 2-metoxi-anilina e 4-aminoazobenzeno.

Corantes azo: Congo red (Sigma Aldrich, 89%), direct red 7 (Sigma Aldrich, pureza não declarada) e direct blue 39 (Sigma Aldrich, pureza não declarada). A estrutura dos corantes está ilustrada na Tabela 3.1.

3.1.3. Preparo dos eletrólitos empregados na otimização da separação dos analitos

3.1.3.1. Tampão fosfato, pH 2,50: preparados por meio de diluições das soluções estoque do sal dihidrogenofosfato de sódio e, o pH desejado foi acertado com ácido fosfórico (17 mol/L).

3.1.3.2. Tampão fosfato com TEA

Com este reagente três procedimentos de preparo do eletrólito foram empregados:

3.1.3.2.1. A: diluição do ácido fosfórico (17 mol/L) e o pH acertado com TEA 100% (v/v).

3.1.3.2.2. B: diluições de uma solução estoque do sal dihidrogenofosfato de sódio e TEA, pH ajustado com ácido fosfórico 17 mol/L.

3.1.3.2.3. C: diluições de uma solução estoque do sal dihidrogenofosfato de sódio e TEA, pH ajustado com ácido fosfórico 17 mol/L e adição de solvente orgânico.

Tabela 3.1: Corantes azo e suas características empregados para tingimento de celulose, bem como as amins liberadas após a redução da ligação N=N

Nome comercial	C.I.	Estrutura química	Pureza (%)	Massa molar (g/mol)	Amina liberada
Direct red 7	24100		ND	756,729	8
Direct blue 39	30390		ND	1021,89	7
Congo red	22120		89	696,66	1

C.I.: color index number

ND: Nada declarado

3.1.4. Condicionamento do capilar

3.1.4.1. Condicionamento de início de trabalho:

- 10 minutos a 950 mbar com eletrólito de condicionamento (70 mmol/L de dihidrogenofosfato + 12,3 mmol/L de TEA, pH=2,50 acertado com ácido fosfórico);
- 10 minutos de +30 kV de tensão aplicada

3.1.4.2. Condicionamento entre corridas

- 1 minuto a 950 mbar com HCl 0,1 mol/L (Synth, 37%)
- 1 minuto a 950 mbar com água ultra pura
- 5 minutos a 950 mbar com BGE

3.1.5. Procedimento experimental para medição do fluxo usando marcas térmicas

Para a medida do fluxo eletrosmótico usando marcas térmicas foram adotados como marcadores térmicos dois resistores SMD (Surface Mounting Device) de 15 Ω , encapsulamento 0402. Eles foram soldados em um PCB (placa de circuito impresso), permitindo o manuseio e as conexões elétricas. Um sistema microcontrolado permitiu o acionamento de transistores de potência, alimentados por uma fonte de 5 V por 1 A, como também a temporização dos acionamentos, para a geração das marcas térmicas. Os resistores de trabalho foram do regime normal de operação pois o objetivo foi aquecimento. Cada marcador foi posicionado de tal forma que o filme de carbono ficou em contado físico com o lado externo do capilar. Presilhas foram usadas para a efetividade do contado físico.

A Figura 3.1 mostra um esquema do capilar e as posições das marcas térmicas e a Figura 3.2 apresenta uma figura do cassete de um equipamento comercial contendo o capilar juntamente com as marcas térmicas.

Figura 3.1: Esquema das marcas térmicas empregadas. MT1: marca térmica 1; MT2: marca térmica 2; Det: detector; 52.0 e 60.5 cm: comprimento efetivo e total, respectivamente; 4.5 cm: distância da MT1 até o detector; 5.2 cm: distância entre a MT2 e MT1.

Figura 3.2: Cassete com o capilar juntamente com as marcas térmicas 1 e 2.

- Eletrólito empregado: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L contendo 0,5 mmol/L de imidazol, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico.
- Demais condições do CE: Capilar: $L_{tot}=60,5$ cm; $T=25$ °C; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; $\lambda = 200$ nm.

3.1.6. Procedimento experimental para o condicionamento do capilar com polímero

O seguinte procedimento foi adotado: capilar lavado com a solução de PB, 10% (m/v) por 10 min.; 5 min de H₂O ultra pura; 10 min com DS 3% (m/v); 5 min H₂O ultra pura; mais 10 min de PB 10 % e por fim mais 5 min de H₂O ultra pura.

Após este condicionamento, o capilar estava pronto para as análises com o BGE que era passado pelo capilar por 3 minutos entre cada corrida.

3.1.7. Procedimento experimental adotado com capilar revestido com polivinilálcool (PVA)

Um capilar de 60 cm de comprimento total revestido de polivinil álcool (marca Agilent) foi testado.

BGE: 70 mmol/L de dihidrogenofosfato de sódio, pH= 2,50 acertado com ácido fosfórico; T= 25 °C; 5 s de injeção; V= +30 kV.

- Condicionamento de início de trabalho: 10 minutos a 950 mbar com BGE;
- Condicionamento entre corridas: 5 minutos a 950 mbar com BGE.

3.1.8. Procedimento experimental para a avaliação dos produtos de degradação.

Uma concentração de 30 mg/L foi preparada e submetida ao processo de redução descrito no item 3.9.2.

3.1.9. Procedimento experimental para o preparo das amostras

3.1.9.1. Procedimento 1.

Tingimento da matriz têxtil: O procedimento de tingimento da matriz têxtil (100% celulose) foi a sugerida e empregada pela Indústria Têxtil Clariant.

O procedimento empregado é o que segue:

- 10 mg/g de razão corante/matriz têxtil (100% algodão).
- 10 mg/g de corante/matriz têxtil + 15 g/L de NaCl (a cada grama de matriz têxtil 67 mL de solução do sal);
- Agitação com aquecimento até uma temperatura de ca. 100 °C.
- Agitação a T=100 °C até completo tingimento.
- Secagem da matriz tingida a T= 50 °C.

3.1.9.2. Procedimento 2

Redução da ligação N=N: O procedimento de redução foi o sugerido pela Diretiva 2002/61/EC, com exceção da massa de matriz têxtil tingida que foi ca. 300 mg¹. Portanto, o volume de tampão citrato e a concentração de redutor empregada foram proporcionais ao empregado pela Diretiva 2002/61/EC para a redução de 1 g de matriz têxtil (17 mL de tampão citrato, pH 6,0 seguidos de 3 mL de 200 mg/mL de redutor ditionito de sódio). Assim, à quantia de 300 mg de matriz têxtil tingida contidas em frascos de polipropileno foram adicionados 5 mL de tampão citrato (60 mmol/L, pH=6,0) previamente aquecido a uma temperatura de 70 °C. Os frascos foram fechados e rapidamente agitados (manualmente) vigorosamente. Em seguida, os mesmos permaneceram em um banho de água a uma temperatura de 70 °C por um período de 30 minutos. Subsequentemente, 1 mL da solução do redutor ditionito de sódio (60 mg/mL) e uma nova agitação manual foi realizada por mais 2 minutos. A solução na presença do tecido permaneceu por mais 30 minutos no banho de água a uma temperatura de 70 °C.

3.1.9.3. Procedimento 3

Extração das aminas com ultrassom

Procedimento adaptado de Alström *et al.*²: A solução resultante da redução do corante foi reservada. À matriz têxtil, agora branca, foram adicionados 8 mL de HCl 1 mol/L e submetida ao banho de ultrassom por 10 minutos a uma T 40 °C para a completa extração das aminas. Esse procedimento foi repetido três vezes. O extrato resultante foi adicionado à solução reservada da redução do corante e filtrado.

Procedimento otimizado: A solução resultante da redução do corante foi reservada. À matriz têxtil, agora branca, foi adicionado 16 mL de HCl 0,77 mol/L (volume de ácido para 1 g de matriz têxtil) e submetida ao banho de ultrassom por 5 minutos a uma T 52 °C para a completa extração das aminas. Esse procedimento foi repetido três vezes. O extrato resultante foi adicionado à solução reservada da redução do corante e filtrado.

3.1.9.4. Procedimento 4

¹ European Community, 2004. Disponível em: <http://www.cbi.nl/acessguide>, acessado em março de 2008.

² Ahlström, L-H; Björklund, E.; Mathiasson, L., Optimization of an analytical procedure for the determination of banned azo dyes in leather, Anal Bioanal Chem, v. 382, p.1320-1327, 2005.

Estudo do clean-up e Pré concentração

3.1.9.4.1. Extração por ponto nuvem (PN)

Para a extração em ponto nuvem foi adotado o procedimento proposto por Bezerra e Ferreira como segue na Figura 3.3³.

Figura 3.3: Fluxograma do procedimento de extração em ponto nuvem

Em cada 4 mL de uma mistura de padrões das 20 aminas contendo 30 mg/L cada, contidas em frascos de falcon de 15 mL, foram adicionadas quantidades (em mg) correspondentes a cada uma das concentrações (% m/v) de tensoativo Triton-X-114. Para a formação do ponto nuvem, cada frasco foi agitado manualmente e colocado em um banho termostatizado a 40 °C por 10 minutos. Posteriormente, após a solução ficar turva, para a separação das duas fases (fase rica e fase pobre em tensoativo), os frascos foram centrifugados por 15 minutos, seguidos de 10 minutos em um banho de gelo para melhor separação destas fases. A fase pobre em tensoativo foi descartada e a fase rica que contém as aminas aromáticas foi

³ Bezerra, M. de Almeida e Ferreira, S.L.C, Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica, 2006, edições UESB, Vitória da Conquista – BA.

avolumada em 2 mL de metanol 100% e injetados no eletroforese capilar. Promovendo uma pré-concentração de duas vezes.

3.1.9.4.2. Procedimento de extração em fase sólida

3.1.9.4.2.1. Com resina de fase ligada não polar

A resina C18 (fase reversa de octadecil quimicamente ligada a sílica) foi testada. O procedimento de extração foi o proposto por Costa⁴. Foram empregados cartuchos de SPE de 500 mg de sorbentes de fase estacionária. A ativação da fase foi obtida por meio de um condicionamento inicial de 5 mL de MeOH, 5 mL de água: metanol (50:50 v/v) e por fim mais 5 mL de água.

Para a extração das aminas, o pH de um volume de 5 mL de uma mistura de das 20 aminas a uma concentração de 30 mg/L cada foi ajustado para ca. 11 para garantir que todas as aminas estivessem neutras. Esse volume foi submetido à extração a uma vazão de 74 gotas/min, seguida de uma eluição sob gravidade (ou baixo vácuo) com 10 mL de metanol 100%. Esse volume foi evaporado até um volume de 2 mL e analisado por meio do método de eletroforese capilar em zona proposto.

3.1.9.4.2.2. Com resinas de fase ligada de troca iônica

Duas resinas foram testadas, uma comercial (stracta XC - Allcrom) e uma empacotada manualmente (Dowex 50WX8-200 – Sigma Aldrich).

O procedimento de extração empregando a coluna comercial foi o sugerido pelo fabricante⁵. Para a ativação das fases, o cartucho foi condicionado com 7 mL de metanol 100% seguidos de 7 mL de água acidificada com HCl (1mol/L) a pH=4,0. Para a extração, o pH de um volume de 5 mL de uma mistura de das 20 aminas a uma concentração de 30 mg/L cada foi ajustado para ca. 1,5 para garantir que todas as aminas estivessem protonadas. No caso da amostra, o pH do extrato, resultante da extração descrita no item 2.9.3, já estava na ordem de 1,0.

⁴ Costa, A.C.O., Metodologias para a determinação de fármacos, metabólitos e disruptores endócrinos em águas de abastecimento público utilizando técnicas de separação em meio líquido (CE/UV, CE-MS, LC-MS/MS), Tese de doutorado, Instituto de química de São Paulo, 2009.

⁵ Procedimento SPE – Alcrom

Esse volume foi submetido à extração a uma vazão de 60 gotas/min, seguida de uma etapa de lavagem HCl 0,1 mol/L e secagem da resina por 5 min em alto vácuo. A eluição foi feita sob gravidade (ou baixo vácuo) com 5 mL de NH₄OH 5% (v/v) em metanol. Esse volume foi evaporado até um volume de 2 mL e analisado por meio do método de eletroforese capilar em zona proposto.

O procedimento de extração empregando a coluna empacotada manualmente foi adaptado de Simionato *et al.*. Para a execução do cartucho de SPE, uma massa de Ca 300 mg de resina foi pesada e colocada e empacotada em uma seringa que continha na parte inferior lã de vidro. O condicionamento da coluna foi o mesmo adotado pela stracta-XC da Allcrom.

Para o carregamento da amostra (no caso solução padrão), o pH de um volume de 5 mL de uma mistura de das 20 aminas a uma concentração de 30 mg/L cada foi ajustado para ca. 1,5 para garantir que todas as aminas estivessem protonadas e assim interagir com a coluna. Esse volume foi submetido a extração a uma vazão de 60 gotas/min, seguida de uma etapa de lavagem HCl 0,1 mol/L e secagem da resina por 5 min em alto vácuo. A eluição foi feita sob gravidade (ou baixo vácuo) com 5 mL de NH₄OH 7 mol/L. O eluato foi todo evaporado com gás nitrogênio e avolumado para 2 mL de metanol 100% e analisado por meio do método de eletroforese capilar em zona proposto.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Escolha do pH

Com os valores de mobilidade e pK_a de cada amina determinados no capítulo 2, por meio de um simulador (SIMLACE, programa desenvolvido no grupo)⁶, o pH ótimo de trabalho foi estimado em 2,50; neste, as diferenças das mobilidades efetivas de cada uma das aminas são maximizadas havendo porém, uma baixa resolução de picos para algumas delas.

Assim, outras variáveis eletroforéticas precisam ser avaliadas, com o intuito de maximizar essas pequenas diferenças de mobilidade, ou seja, aumentar a resolução dos picos para o maior número possível de picos. Ainda, por meio dos resultados apresentados na curva de mobilidade, sugere-se a otimização de dois métodos para separar as aminas, pois um grande grupo apresentou mobilidades

⁶ Micke, G.A.. Simulação computacional e otimização de separações por eletroforese capilar. Tese de doutorado, 2004.

efetivas muito distintas do outro grupo de aminas (aminas 16 a 20). Estas últimas por apresentarem mobilidade muito baixa, permanecem por muito tempo dentro do capilar o que acarreta em alargamento de pico.

3.2.2. Estudo do método 1

Os primeiros resultados referente à otimização da separação das aminas será mostrado com relação ao método denominado de número 1, ou seja, para as 16 aminas que apresentaram maior mobilidade eletroforética.

3.2.2.1. Estudo da composição do BGE e condicionamento do capilar

Como já sabido, um tampão ideal para detecção direta no UV-vis é aquele que apresenta baixo valor de absorbância no comprimento de onda de trabalho. Também, como a variação do fluxo eletrosmótico está diretamente relacionada a alterações de pH, é importante que o tampão apresente uma elevada capacidade tamponante, condição obtida na região do pK_a do tampão. Portanto, um sistema que atende os requisitos mencionados é o tampão fosfato, uma vez que, um dos pK_a s deste tampão é 2,12, apresentando um tamponamento adequada em $pH=2,50$.

A concentração do tampão está diretamente ligada à separação dos analitos. As concentrações usualmente empregadas em eletroforese capilar variam de 5 a 200 mmol/L, entretanto, concentrações elevadas podem promover geração de calor excessivo (pelo efeito Joule) e, baixas concentrações promovem a adsorção dos analitos na parede do capilar, comprometendo a separação em ambos os casos.

Um problema frequente encontrado na eletroforese capilar na análise de cátions é a adsorção dos analitos na superfície interna do capilar de sílica⁷. Assim, modificar essa parede para minimizar a carga negativa dos grupos silanóis, os quais são responsáveis por essa adsorção, pode ser uma saída, principalmente em faixas de pH extremas, ou seja, meios muito alcalinos ou muito ácidos⁸. Para sanar esse tipo de problema, a literatura sugere a aplicação de uma tensão, ou ainda fazer o que se chama de modificação estática ou dinâmica da parede do capilar. Essas

⁷ Znaleziona, J.; Knob, J.P.R.; Maier, V.; Ševčík, Dynamic Coating Agents in CE, *Chromatographia*, v. 67, p. S5-S12, 2008.

⁸ Mikšík, I; Deyl, Z., Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis in acid buffers containing high concentrations of surfactants, *J. Chromatogr A*, v. 852, p. 325-336, 1999.

estratégias alteram o fluxo eletrosmótico ou até mesmo o eliminam, promovendo melhoras na repetibilidade da separação⁷.

Na modificação estática, tem-se a formação de duplas camadas de polímeros por meio de ligações covalentes, que ocorrem durante o processo de organosinalização. Por outro lado, o segundo recobrimento (dinâmico) tem por princípio recobrir a parede do capilar por adição de substâncias ao sistema de eletrólito, como surfactantes, líquidos iônicos etc⁷. Esse recobrimento se dá por interações eletrostáticas, van der Waals ou por ligação de hidrogênio.

Ao controlar as interações dos analitos com a parede do capilar, tem-se um ganho não somente em termos de repetibilidade, como também na eficiência da separação, com tempos de análise menores, como mostrado no trabalho de Wei *et al.*⁹, que alcançaram a separação de 4 proteínas apenas alterando o sistema do eletrólito (40 mmol/L de tampão fosfato) por adição de 1.3 mmol/L de dodecil dimetil (2-hidroxi-3-sulfopropil) amônio (DSB) e 6.5 mmol/L de perclorato.

Compostos carregados positivamente, os quais apresentam centros de ligação, são exemplos de substâncias que ao serem adicionadas ao eletrólito podem efetivamente interagir com a parede do capilar e modificar a carga da superfície do mesmo, alterando o sentido ou a magnitude do fluxo eletrosmótico. Como exemplo tem-se as aminas, (triethylamina, (TEA)), as quais são amplamente empregadas na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, High Performance Liquid Chromatography),¹⁰ com esse mesmo objetivo. Aminas mascaram os grupos silanóis por interação eletrostática. Quanto menor a cadeia carbônica e maior o número de centros ativos, ou seja, de grupamentos amino, maior a eficiência do recobrimento. Assim, etilenodiamina apresenta maior eficiência de recobrimento do capilar se comparada com a cadaverina, que possui uma cadeia carbônica maior.

A literatura apresenta a eficiência na separação de peptídeos e proteínas empregando algumas aminas. Eckhardt *et al.* empregaram alquilaminas, aminas poliméricas e amino surfactantes para a separação de misturas de peptídeos em

⁹ Wei W, Ju, H., Application of dodecylmethyl(2-hydroxy-3-sulfopropyl)ammonium in wall modification for capillary electrophoresis separation of proteins, *Electrophoresis*, v. 26, p. 586-592, 2005.

¹⁰ Nahum, A; Horváth, Cs., Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases : I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography *J. Chromatogr.*, v. 203, p. 53-63, 1981

eletrólito composto de tampão fosfato a pH 2,5¹¹. Tetrametilamônio foi empregado por Quang *et al.* como modificador de superfície para a separação de peptídeos¹².

Sendo assim, primeiramente foram testados dois sistemas de eletrólitos, um contendo o co-íon sódio e outro contendo o co-íon TEA.

Este estudo está ilustrado nas Figuras 3.4 A e B, respectivamente, para o co-íon sódio e co-íon TEA. Com um BGE contendo 50 mmol/L de dihidrogenofosfato (Figura 3.4 A) somente, a resolução dos picos é comprometida, bem como picos com cauda são observados. Por outro lado, a presença da TEA promove uma melhora, tanto na separação quanto no perfil dos picos referentes às aminas (Figura 3.4 B). O preparo dos respectivos eletrólitos está descrito nos itens 3.1.3.1 A e 3.1.3.2.1 B, respectivamente para as Figuras 3.4 A e B.

Figura 3.4: Eletroferogramas de 16 aminas aromáticas (30 mg/L). (A) dihidrogenofosfato de sódio 50 mmol/L, pH = 2,50 ajustado com ácido fosfórico; (B) ácido fosfórico 50 mmol/L contendo TEA, 9.84 mmol/L, pH=2,50 ajustado com TEA 100%. Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Sendo assim, outras concentrações de fosfato foram estudadas, como ilustrado na Figura 3.5, onde é possível observar picos com cauda com o emprego de concentrações baixas de eletrólito (10 mmol/L) - provavelmente decorrente da

¹¹ Eckhardt, A.; Mikšik, I.; Deyl, Z.; Charvátová, J., Separation of low-molecular mass peptides by capillary electrophoresis with the use of alkylamines as dynamic coating agents at low pH, *J Chromatogr A*, v. 1051, p. 111-117, 2004.

¹² Quang, C.; Malek, A.; Khaledi, M.G., Separation of peptides and proteins by capillary electrophoresis using acidic buffers containing tetraalkylammonium cations and cyclodextrins, *Electrophoresis*, v. 24, p. 824-828, 2003.

adsorção dos analitos na parede do capilar, como relatado anteriormente, bem como uma eletrodispersão acentuada. Por outro lado, alcançou-se uma melhora na separação, bem como simetria de pico, à medida que a força iônica era aumentada.

Segundo Landers¹³, o aumento da força iônica do meio tende a aumentar o potencial zeta e, conseqüentemente, uma redução do fluxo eletrosmótico e um aumento no tempo de análise. Com o aumento da força iônica nos eletrólitos estudados na Figura 3.5, aumenta-se a capacidade tamponante e a possibilidade de interação dos analitos com a parede do capilar é reduzida, promovendo uma melhora na separação dos analitos. Associado a isso, há a presença da TEA no BGE que, neste caso, é proporcional a quantidade de fosfato. Assim, este reagente tanto impede a adsorção das aminas na parede do capilar quanto tem a função de aumentar o tempo de análise por redução do fluxo eletrosmótico. O que fica claro ao verificarmos a Figura 3.5.

¹³ Landers, J.P., Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 2008.

Figura 3.5: Otimização da concentração do eletrólito. [a] fosfato 70 mmol/L contendo TEA 14,76 mmol/L, pH=2,50 ajustado com TEA 100%(v/v); [b] ácido fosfórico 60 mmol/L contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,52 ajustado com TEA 100%(v/v); [c] ácido fosfórico 50 mmol/L contendo TEA 9,84 mmol/L, pH=2,52 ajustado com TEA 100%(v/v), [d] ácido fosfórico 25 mmol/L contendo TEA 4,26 mmol/L, pH=2,5 ajustado com TEA 100%(v/v), [e] ácido fosfórico 10 mmol/L contendo TEA 1,64 mmol/L, pH=2,50 ajustado com TEA 100%(v/v). Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Após este estudo, foi observado que a resolução de alguns pares críticos era alterada entre uma réplica e outra, ao empregar um BGE composto de fosfato 60 mmol/L contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,52 ajustado com TEA 100% (v/v).

Os capilares em eletroforese capilar são feitos de sílica fundida não porosa, o mesmo material empregado em colunas de GC. A química da sílica pode variar entre uma análise e outra, como também entre manufatura de uma coluna e outra. Assim, essas alterações podem ocasionar métodos não robustos. Ainda, a atividade da parede do capilar tem sido um grande desafio em separações de compostos básicos, uma vez que os silanóis altamente ácidos têm apresentado adsorção de impurezas metálicas, as quais têm a função de promover a ativação dos silanóis, tornando-os mais ácidos. Por outro lado, a presença desses metais faz com que a parede interna do capilar deixe de ser uniforme. Assim, para que um capilar possa ser usado é importante que ele seja tratado com NaOH, 1 mol/L por um tempo que varia de alguns minutos a até 1 hora produzindo com isso um capilar com uma

superfície dotada de grupos silanóis ¹⁴. Além disso, o NaOH também tem a função de remover o grafite que se liga covalentemente a sílica (Si-C) o qual é formado durante a fabricação do capilar.

A etapa de condicionamento do capilar tem por função o re-equilíbrio da sua parede, tanto na primeira análise do dia, quanto entre corridas. Um bom condicionamento pode variar de uma simples lavagem com o eletrólito até múltiplas etapas de condicionamentos, com base, ácido ou ambos, e solvente ¹⁵. Assim, a literatura também relata a eficiência do condicionamento do capilar com o uso do HF ¹⁶ e do HCl ¹⁵.

Portanto, a possível causa da falta de repetibilidade do método poderia ser a falta de um bom condicionamento entre corridas, que foi avaliado. A Figura 3.6 mostra que mesmo com um condicionamento entre corridas foi observada mudanças na separação principalmente do par crítico 6 e 7.

Figura 3.6: Estudo do efeito do condicionamento entre corridas: Condicionamento empregado: 5 min de NaOH, 5 min H₂O e 5 min do tampão de corrida. Eletrólito: ácido fosfórico 60 mmol/L contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,55 ajustado com TEA 100% (v/v). Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ= 200 nm.

¹⁴ Gómes, J.E., Sandoval, J.E., The effect of conditioning of fused-silica capillaries on their electrophoretic performance, *Electrophoresis*, v. 29, p. 381-392, 2008.

¹⁵ Ehmann, T., Bächman, K., Fabry, L., Rüfer, H., Capillary preconditioning for analysis of anions using indirect UV detection in capillary zone electrophoresis sytematic investigation of alkaline and acid presinsing techniques by designed experiments, *J. Chromatogr. A*, v. 816, p.261-275, 1998.

¹⁶ Kaupp, S., Steffen, R., Wätzig, H., Characterisation of inner surface and adsorption phenomena in fused-silica capillary electrophoresis capillaries, *J. Chromatogr. A*, v. 744 p. 93-101, 1996.

A literatura destaca que quando se trabalha com condicionamento com NaOH, o Na⁺ se liga aos grupos silanóis da parede do capilar e o eletrólito (etapa seguinte do condicionamento) não substitui completamente esses Na⁺ ligados. Assim, na parede do capilar pode haver tanto Na⁺ quanto TEA em concentrações variadas, alterando também o pH do meio e, como consequência, gerando tempos de migração não reprodutíveis¹⁵.

Para solucionar esse problema, uma das etapas de condicionamento deveria ser com ácido clorídrico, como sugerido por Cifuentes *et al*¹⁷. O H⁺ do ácido tem a função de substituir o Na⁺ que está ligado aos grupos silanóis, e assim promover um equilíbrio entre estes grupos com o H⁺ do ácido. Este estudo está ilustrado na Figura 3.7, onde é possível verificar que mesmo empregando HCl na etapa de condicionamento do capilar, a falta de repetibilidade na separação persistiu.

Figura 3.7: Efeito do condicionamento entre corridas: 1 min NaOH 1 mol/L, 1 min H₂O, 1 min HCl 0,1 mol/L, 1 min H₂O e 5 min tampão. Eletrólito: ácido fosfórico 60 mmol/L contendo TEA 12,3 mmol/L, pH= 2,51 acertado com TEA 100%(v/v). Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ= 200 nm.

Quando o hidróxido é passado pela coluna, o sódio se liga à parede, interagindo com os silanóis desprotonados. Portanto, um tempo maior é necessário para que o equilíbrio entre a solução do eletrólito e a parede do capilar seja atingido, ou seja,

¹⁷ Cifuentes, A., Canalejas, P., Ortega, A., Díez-Masa, J.C., Treatments of fused-silica capillaries and influence on the electrophoretic characteristics of these columns before and after coating, J. Chromatogr. A, v. 823, p. 561-571, 1998.

um tempo maior é gasto para remoção do sódio da parede. No caso de conter somente prótons no meio, esse equilíbrio é atingido mais rapidamente. Além disso, a literatura destaca que o pH do meio pode ser alterado quando NaOH é usado para o condicionamento do capilar, promovendo alteração dos tempos de migração. Portanto, um condicionamento entre corridas sem o uso do NaOH foi avaliado¹⁵.

A Figura 3.8 nos mostra que uma melhora na repetibilidade dos tempos de migração foi alcançada. Portanto, o condicionamento com HCl foi adotado para dar continuidade aos trabalhos.

Figura 3.8: Estudo do condicionamento: Condicionamento entre corridas: 1 min HCl 0,1 mol/L, 1 min H₂O e 5 min tampão. Eletrólito: ácido fosfórico 60 mmol/L contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,50 ajustado com TEA 100% (v/v). Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: L_{tot}= 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

3.2.2.2. Avaliação da influência da concentração do BGE e tensão aplicada

Com o intuito de melhorar a separação dos pares críticos, foi novamente verificado o efeito do aumento da força iônica no meio. Neste sentido foi estudado um sistema de tampão fosfato empregando dois co-íons: o sódio e o TEA. Assim, este sistema de eletrólito foi preparado por meio de diluições de uma solução

estoque do sal dihidrogenofosfato de sódio e TEA 188 mmol/L (pH ajustado com ácido fosfórico 17 mol/L). O estudo está ilustrado na Figura 3.9, onde é possível verificar que ao aumentar a força iônica do meio, a separação das aminos 1, 2 e 3 foi promovida, bem como das aminos 11 e 12. Segundo Kenndler e colaboradores¹⁸, a mobilidade de um íon em solução é diretamente dependente da força iônica do meio, de acordo com:

$$\mu' / \mu_0 = \exp(-0,77 \sqrt{zI}) \quad (1)$$

onde μ' é a mobilidade corrigida, μ_0 é a mobilidade à diluição infinita, z é a carga do íon e I é a força iônica do meio.

No entanto, observa-se o contrário ao se comparar o tempo de corrida da Figura 3.9 com o tempo de corrida apresentado na Figura 3.8 quando foi empregado um BGE contendo 60 mmol/L de dihidrogenofosfato. Esse resultado mostra que não é apenas um efeito de força iônica que afeta a separação das aminos. Portanto, como há separação dos pares críticos 2 e 3, além dos pares críticos 11 e 12, este sistema de BGE foi adotado para dar continuidade aos trabalhos.

Figura 3.9: Estudo do efeito da concentração do BGE na separação. Condicionamento entre corridas: 1 min HCl 0,1 mol/L, 1 min H₂O e 5 min tampão. BGE: dihidrogenofosfato de sódio, 70 mmol/L, contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,52 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

¹⁸ Friedl, W.; Reijenga, J.C., Kendler, E., Ionic strength and charge number correction for mobilities of multivalent organic anions in capillary electrophoresis, J.Chromatogr, A, v. 709, p. 163-170,1995.

3.2.2.3. Estudo de um condicionamento de início de trabalho

Uma falta de repetibilidade entre dias em termos de tempo de migração também foi observada com o emprego do BGE constituído de 70 mmol/L de dihidrogenofosfato de sódio com TEA 12,3 mmol/L, pH 2,5 (acertado com ácido fosfórico), como ilustrado na Figura 3.10.

Figura 3.10: Eletroferogramas das 16 aminas aromáticas. (A): dia 1; (B) réplicas do dia 2. BGE: dihidrogenofosfato de sódio, 70 mmol/L, contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,52 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

A literatura destaca que um tempo maior de condicionamento do capilar antes do início dos trabalhos é necessário ao ser empregado tampão fosfato, devido ao tempo requerido para que seja atingido o equilíbrio entre o tampão e a parede do capilar¹³.

Assim, um capilar preenchido com eletrólito (dihidrogenofosfato 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol/L, pH=2,50 acertado com ácido fosfórico) e armazenado por um período

de três semanas foi empregado para avaliar a repetibilidade do método. A Figura 3.11 mostra este estudo.

Figura 3.11: Estudo da repetibilidade do método por meio do uso de um capilar deixado por 3 semanas com o eletrólito de corrida. Eletroferogramas coloridos: Separação das 16 aminas na condição otimizada; Eletroferogramas em preto: separação das 16 aminas com o mesmo capilar deixado em eletrólito de corrida por três semanas. BGE: dihidrogenofosfato de sódio, 70 mmol/L, contendo TEA 12,3 mmol/L, pH=2,52 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: L_{tot} = 60 cm; injeção 5s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Por meio deste estudo é possível observar que ao empregar um capilar armazenado com o eletrólito de corrida, um ganho de repetibilidade do método em termos de separação dos pares críticos é obtido. Assim, pode-se concluir que o condicionamento é importante para se obter uma repetibilidade da separação de um método analítico. Entretanto, é de grande valia saber qual a condição deste condicionamento, uma vez que deixar um capilar em presença de eletrólito por um tempo indeterminado não é uma escolha ideal. Também, a literatura destaca a importância da aplicação de uma tensão no capilar antes do início dos trabalhos com intuito de se obter uma maior homogeneidade do sistema, ou seja, do fluxo

eletrosmótico¹⁹. Nesse sentido, uma otimização do condicionamento de início de trabalho foi estudada.

Para avaliar um condicionamento de início de trabalho, foi feito um planejamento fatorial completo de 2 níveis e 3 fatores, 2³, com o total de oito experimentos. No presente caso, as seguintes variáveis foram consideradas: tempo de “flush” por pressão (tempo de condicionamento), tempo de tensão aplicada e valor da tensão aplicada. Demais variáveis como, tempo de injeção, comprimento de onda, dimensões do capilar, temperatura do cartucho, eletrólito de corrida e concentração dos analitos foram mantidas constantes. Vale ressaltar que o eletrólito usado foi o mesmo empregado até o momento, ou seja, tampão contendo dihidrogenofosfato 70 mmol/L e TEA 12,3 mmol/L, pH=2,50. A Tabela 3.2 mostra a matriz de planejamento com os níveis estudados. Ainda, entre cada experimento o capilar foi condicionado com hidróxido de sódio 1 mol/L por 5 min por pressão, seguida de água ultra pura por 5 min. Este procedimento é de extrema importância para deixar o capilar sempre na mesma condição inicial de uso, ou seja, para simular um capilar novo.

Tabela 3.2: Matriz de planejamento do fatorial completo 2³ para o estudo do condicionamento do capilar de início de trabalho.

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8
X ₁	10	30	10	30	10	30	10	30
X ₂	10	10	30	30	10	10	30	30
X ₃	10	10	10	10	60	60	60	60

1: Tensão (kV);

2: Tempo de tensão aplicada (min);

3: Tempo de condicionamento com eletrólito (min).

Os eletroferogramas de cada experimento estão ilustrados na Figura 3.12. Ao avaliarmos a variação dos tempos de migração em termos de desvio padrão relativo (RSD%) para cada experimento, foi possível verificar que todas as condições estudadas apresentaram baixos desvios (0,1 – 0,2%), a exceção do experimento 1, ou seja, ao considerar todas as variáveis no nível mais baixo, uma pequena falta de

¹⁹ Han, J. H.; Chun, M-S.; Riaz, A.; Chubg, D. S., Large-volume staking in capillary electrophoresis using pH hysteresis of the electroosmotic flow in a bare fused-silica capillary, *Electrophoresis*, v. 26, p. 480-486, 2005.

repetibilidade em termos de tempo de migração foi observada (RSD= 0,5%, n=3). Portanto, levando em consideração o condicionamento que irá propiciar a maior frequência analítica, optou-se por selecionar a condição do experimento 2, que apresenta nível baixo tanto para o tempo de tensão quanto para o tempo de condicionamento

Figura 3.12: Eletroferogramas referentes ao planejamento fatorial para o condicionamento do capilar referente ao método 1. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol/L, pH=2,52 acertado com ácido fosfórico, pH=2,50. Condições: V= +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.,

Após esse estudo, a repetibilidade do método foi verificada e o desvio padrão relativo referente aos tempos de migração para cada pico avaliada apresentando valores inferiores a 3%, sem levar em consideração a correção com o uso de um padrão interno. A Figura 3.13 mostra o eletroferograma do método 1 desenvolvido.

Figura 3.13: Eletroferograma da separação do método 1 considerando o condicionamento de início de trabalho otimizado. (A) e (B): réplicas de injeção, (C): eletroferograma com o mesmo capilar em dia diferente. Condicionamento de início de trabalho: 10 min + 30 kV; 10 min BGE. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Por meio desse resultado é possível concluir que o condicionamento de início de trabalho foi adequado para promover a repetibilidade desejada do método, o qual foi adotado para dar continuidade aos trabalhos.

3.2.2.4. Estudo do efeito do solvente, adicionado ao BGE, na separação das aminas.

Os solventes orgânicos são muito empregados em CZE para modificar a seletividade da separação. Como mencionado anteriormente, uma separação em CZE é alcançada se os compostos apresentarem mobilidades efetivas distintas.

A adição de solventes orgânicos ao BGE é uma forma de maximizar essas diferenças, caso elas sejam muito pequenas e, comprometam a separação dos analitos.

Os solventes orgânicos podem influenciar diretamente a carga do analito, e/ou o seu raio de solvatação do íon. Assim, quando se emprega solvente orgânico a formação de um par iônico é favorecida devido à baixa constante dielétrica do solvente em relação a da água, podendo modificar a seletividade do método²⁰.

Existe uma variedade de solventes orgânicos que podem ser empregados em CZE, entretanto alguns critérios precisam ser adotados, tais como, aceitável constante dielétrica (ϵ) (quanto maior, mais polar o solvente), baixo custo, elevada pureza, viscosidade (η) relativamente baixa, solubilização dos compostos, estabilidade química, relativa volatilidade, e uma elevada relação ϵ/η ²¹. A relação ϵ/η é de extrema importância, pois tanto a μ_{ef} quanto μ_{osm} são proporcionais a mesma, portanto, é ela que fornece a velocidade do analito²⁰.

Dentre os solventes mais empregados na eletroforese capilar a acetonitrila (ACN) e o metilformamida (NMF) são os que apresentam maior relação ϵ/η . Além disso, a ACN apresenta uma boa capacidade de solvatação de cátions pela presença de um par de elétrons livres. Neste sentido, o solvente acetonitrila foi o escolhido para estudo da seletividade do método.

Como ilustrado na Figura 3.14 diferentes concentrações de ACN foram estudadas. O primeiro resultado observado foi a diminuição da corrente, a qual apresentou uma redução 8 μA (38 para 30 μA), o que está de acordo com a literatura. Os autores Geiser e Veuthey²⁰ descrevem que essa queda na corrente não está intimamente ligada a um fator, mas sim a vários, como, o grau de dissociação do eletrólito, formação de par iônico, diferentes condutividades dos íons. Assim, pode-se considerar esse resultado uma das vantagens em se usar solventes orgânicos em CZE, uma vez que ao diminuir a corrente elétrica, o efeito Joule também é reduzido, conseqüentemente, uma melhora na repetibilidade dos tempos

²⁰ Geiser, L., Veuthey, J-L., Non-aqueous capillary electrophoresis 2005-2008, *Electrophoresis, Rev.*, v. 30, p. 36-49, 2009.

²¹ Porras, S.P., Riekkola, M-L, Kenndler, E., The principles of migration and dispersion in capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents, *Electrophoresis*, v. 24, p.1485-1498, 2003.

de migração dos compostos deveria ser alcançada. Portanto, um capilar de maior tamanho pode ser empregado, bem como uma maior tensão, alcançando tempos de análise menores sem comprometimento na separação.

Por meio da Figura 3.14, é possível observar que uma seletividade adequada foi alcançada empregando uma concentração de ACN de 10% (V/V). É importante destacar que o pH foi acertado antes da adição do solvente orgânico.

Entretanto, a falta de repetibilidade fez-se presente como pode ser observado na Figura 3.15. Neste caso, uma possível explicação seria o fato de o solvente alterar o pH do meio e, assim a faixa de pH pode estar fora da capacidade tamponante.

Figura 3.14: Estudo do efeito da concentração do solvente na separação das aminas aromáticas. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol/L, pH=2,50 acertado com ácido fosfórico. Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: L_{tot} = 60 cm; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Figura 3.15: Estudo da reprodutibilidade em sistema não-aquoso: BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol/L, ACN 10% (v/v), pH=2,50 acertado com ácido fosfórico. Condições: Tensão: +30 kV; T=25 °C; capilar: Ltot= 60 cm; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Sendo assim, o uso de solvente para a separação das aminas não foi favorável para o método proposto. Portanto, o método de separação empregando apenas tampão fosfato/TEA foi o escolhido para dar continuidade aos trabalhos (Figura 3.13).

3.2.3. Otimização da separação do método 2

Como relatado anteriormente, era de interesse desenvolver um segundo método para a separação das aminas que apresentaram uma mobilidade muito baixa, ou seja, as aminas 17 a 20, bem como tentar atingir uma separação para as aminas 13 e 14 as quais no método 1 estão co-migradas. Dessa forma, as variáveis, tensão, temperatura e comprimento do capilar foram avaliados univariadamente.

As Figuras 3.16 a 3.19 mostram esses estudos, onde é possível verificar que em nenhuma condição estudada foi possível atingir a separação em linha de base das aminas 13 e 14. A melhor condição obtida foi a apresentada na Figura 3.16, sem o comprometimento da amina 16 com a adição do padrão interno, lidocaína.

Figura 3.16 Eletroferograma contendo as 20 aminas aromáticas considerando o método 2. BGE: dihidrognofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol L⁻¹, pH=2.52 ajustado com ácido fosfórico; PI= lidocaína 30 mg/L. Condições: T=25 °C; capilar: Ltot= 40 cm; V=25 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ= 200 nm .

Figura 3.17: Estudo do efeito do comprimento do capilar. Eletroferograma contendo as 20 aminas aromáticas considerando o método 2. BGE: dihidrognofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol L⁻¹, pH=2.52 ajustado com ácido fosfórico; PI= lidocaína 30 mg/L. Condições: T=25 °C; capilar: Ltot= 50 cm; V=25 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ= 200 nm.

Figura 3.18: Estudo do efeito da temperatura. Eletroferograma contendo as 20 aminas aromáticas considerando o método 2. BGE: dihidrognofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol L⁻¹, pH=2.55 ajustado com ácido fosfórico; PI= lidocaína 30 mg/L. Condições: T=27 °C; capilar: Ltot= 50 cm; V=25 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Figura 3.19: Estudo do efeito da tensão aplicada. Eletroferograma contendo as 20 aminas aromáticas considerando o método 2. BGE: dihidrognofosfato de sódio 70 mmol/L, TEA 12,3 mmol L⁻¹, pH=2.55 ajustado com ácido fosfórico; PI= lidocaína 30 mg/L. Condições: T=25 °C; capilar: Ltot= 50 cm; V=27 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

3.2.4. Otimização do método 3

É de interesse otimizar um método único para a separação das 20 aminas, devido a baixa frequência analítica apresentada quando dois métodos são empregados para avaliar uma única amostra.

3.2.4.1. Estudo da composição do BGE

Como o reagente TEA tem a função de interagir com a parede do capilar, o fluxo eletrosmótico presente, que é de pequena magnitude, é diminuído ainda mais. Logo, optou-se por remover este reagente do BGE e avaliar o resultado em termos de separação. Assim, este reagente foi empregado apenas na etapa de condicionamento do capilar de início de trabalho. A literatura descreve que quando o capilar é condicionado com TEA seguido de HCl o equilíbrio entre eletrólito e a parede do capilar é atingido mais rapidamente¹⁵. Portanto, um teste empregando um BGE apenas com um tampão fosfato com co-íon sódio, foi testado. Uma separação em linha de base de 16 aminas das 20 em estudo foi alcançada, como se pode observar na Figura 3.20.

Figura 3.20: Eletroferograma das 20 aminas. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico. Condicionamento de início de trabalho e entre corridas foi o otimizado, vide Figuras 14 e 20. Condições: L_{tot} : 60 cm V = 30 kV; T =25 °C; Injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

A repetibilidade em termos de tempo de migração foi verificada no mesmo dia e entre dias. Um desvio padrão relativo menor que 2% entre corridas e menor que 4,12 % entre dias diferentes foi alcançado, empregando o condicionamento otimizado pelo planejamento fatorial, ou seja, 30 kV por 10 min e condicionamento de 10 min do eletrólito de lavagem. Considerando esses valores aceitáveis, essa metodologia pode ser adotada. Esses resultados estão discriminados na Tabela 3.3 e na Figura 3.21.

Tabela 3.3: Repetibilidade dos tempos de migração no mesmo dia e entre dias, referentes ao terceiro método desenvolvido.

Tempo de migração no dia (min)			Tempo de migração entre 3 dias (min)	
Amina	Média (n=3)	RSD (%)	Média (n=3)	RSD (%)
1	4,0	0,3	4,0	1,6
2	4,1	0,3	4,1	1,6
3	4,1	0,3	4,1	1,5
4	4,2	0,3	4,2	1,8
5	4,3	0,3	4,3	1,8
6	4,5	0,3	4,5	1,7
7	4,6	0,3	4,6	1,7
8	4,7	0,3	4,7	1,8
9	5,1	0,3	5,1	2,0
10	5,3	0,3	5,3	2,0
11	5,5	0,3	5,5	2,1
12	5,5	0,4	5,5	2,0
13	5,8	0,4	5,8	2,1
14	5,8	0,4	5,8	2,1
15	6,1	0,4	6,1	2,1
16	6,9	0,9	6,9	2,8
17	9,6	1,1	9,5	3,3
18	9,8	1,3	9,7	3,4
19	12	1,3	12	3,8
20	12	1,8	12	4,1

Figura 3.21: Repetibilidade do método 3. (A) Entre dias diferentes (A: dia 1; B: dia 2; C: dia 3); (B) Réplicas no mesmo dia. Condicionamento de início de trabalho e entre corridas foi o previamente otimizado e descrito n item 3.4 do anexo 1. Condições: Capilar: L_{tot} = 60 cm; V = 30 kV; T =25 °C; Injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

3.2.4.2. Avaliação de outras variáveis eletroforéticas

Com intuito de se obter a separação das aminas 1, 2 e 3 em linha de base, uma tensão de 20 e 25 kV foi testada apenas entre 3,8 e 4,4 minutos. Entretanto nenhuma melhora significativa foi observada se comparada com uma corrida eletroforética realizada toda a uma tensão de 30 kV (Figura 3.22).

Figura 3.22: Eletroferograma das aminas referentes ao método 3 com uma tensão aplicada menor entre 3,8 e 4,4 min. (A) 20 kV; (B) 25 kV. Condicionamento inicial e entre corridas: otimizado (item 3,4 do anexo 1). BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,53 ajustado com ácido fosfórico. Capilar: Ltot: 60 cm; V= +30 kV; T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Além disso, uma última tentativa em termos de melhorar a separação das aminas 2 e 3 e 13 e 14, foi realizada por meio do aumento da força iônica para 80 mmol/L de tampão fosfato; uma vez que a mobilidade de um íon em solução é diretamente dependente da concentração da solução quando esta tende a zero (diluição infinita). Entretanto, por meio da Figura 3.23 é possível observar que nenhuma melhora, em termos de resolução de pico, foi alcançada com aumento da força iônica para 80 mmol/L.

Figura 3.23: Eletroferograma das aminas referentes ao método 3 com aumento da força iônica. Condicionamento inicial e entre corridas: otimizado (item 3.4 do anexo 1). BGE: dihidrogenofosfato 80 mmol/L, pH=2,49 acertado com ácido fosfórico. Condições: Capilar: Ltot: 60 cm: V= 30 kV, T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão, λ = 200 nm.

3.2.4.3. Medida do fluxo eletrosmótico.

Uma das causas da dificuldade em obter um método eletroforético repetitivo pode ser a variação do fluxo eletrosmótico ⁷. A literatura destaca que mesmo em pH baixo o fluxo eletrosmótico existe porém, em pequena extensão. Assim, esse fluxo pode comprometer a repetibilidade da separação do método eletroforético, como já mencionado.

A extensão do fluxo eletrosmótico pode ser medida por meio da injeção de compostos neutros (antraceno, cariofileno, metanol, etc.). Entretanto, para sistemas de BGE em pH baixo esse procedimento apresenta como desvantagem o elevado tempo para visualizar o pico correspondente ao composto injetado. Assim, uma nova estratégia para medição de fluxo eletrosmótico seria o uso de marcas térmicas. Essas foram empregadas em sistemas com detecção codutométrica²³ e sistemas UV-vis indireto²².

²² Neves, C.A.; Silva, C.; Tavares, M.F.M.; Lago, C.L.; Carrilho, E., Monitoring of electroosmotic flow by UV-vis detection of thermal marks 14º Simposio Latinoamericano LACE 2008, PP-A55.

As marcas térmicas são consideradas uma perturbação da concentração do eletrólito, gerada por um aquecimento pontual no capilar, enquanto é mantido o potencial elétrico, durante a separação eletroforética²³. Essa perturbação somente pode ser visualizada por meio da adição de um cromóforo iônico ao sistema de BGE. Este cromóforo poderia comprometer a separação dos analitos previamente otimizada, daí a dificuldade em se usar em sistemas com detecção UV-vis direto. O esquema de capilar com as posições das marcas térmicas, bem como uma figura do cassete com o capilar e as marcas térmicas está ilustrado nas Figuras 3.1 e 3.2, respectivamente, do item 3.1.5 do procedimento experimental.

Portanto, com o intuito de verificar se realmente havia um fluxo eletrosmótico mensurável no método 3 desenvolvido para as aminas aromáticas, bem como uma variação do mesmo ao longo da corrida eletroforética, tentou-se usar pela primeira vez as marcas térmicas para tal finalidade.

Portanto, a possibilidade do monitoramento do fluxo eletrosmótico, usando marcas térmicas detectadas indiretamente e detectando os analitos diretamente, ao mesmo tempo foi verificada. O eletrólito em estudo era composto do sal dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico, com 0,5 mmol/L de imidazol como cromóforo.

A Figura 3.24 mostra 3 marcações térmicas duplas, ou seja, duas marcas térmicas foram empregadas ao mesmo tempo e aplicadas três vezes, com um intervalo entre cada uma delas de 40 segundos. Ou seja, foi possível visualizar a perturbação ocasionada na linha de base com a adição de apenas 0,5 mmol/L de imidazol ao eletrólito de corrida com um campo elétrico de 495,86 V/cm.

²³ Saito, R.M.; Neves, C.A.; Lopes, F.S.; Blanes, L.; Brito-Neto, J.G.A.; Lago, C.L., Monitoring the electroosmotic flow in capillary electrophoresis using contactless conductivity detection and thermal marks. *Anal. Chem.*, v. 79, p. 215-223, 2007.

Figura 3.24: Eletroferograma das MT aplicadas em um sistema de detecção UV-vis. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, com 0,5 mmol/L de imidazol, pH=2.5 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Capilar: $L_{tot}=60,5$ cm; $V=+30$ kV; $T=25$ °C; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; $\lambda = 200$ nm. (A); (B) e (C) posições de aplicação em tempo das MT.

Uma vez verificado que foi possível aplicar as marcas térmicas em um sistema de detecção UV-vis direto, foi avaliada a viabilidade de se monitorar o fluxo eletrosmótico em uma corrida eletroforética considerando todas as aminas estudadas, bem como se a presença do cromóforo poderia comprometer o método de separação previamente otimizado.

A Figura 3.25 mostra que não houve alteração na separação das aminas por meio do método 3 proposto neste trabalho após a adição de 0,5 mmol/L de imidazol, sem alteração do campo elétrico aplicado.

Figura 3.25: Perfil da separação das 20 aminas aromáticas por meio do método 3 juntamente com aplicação de duas marcas térmicas duplas MT1 e MT2. Condições empregadas, vide item 3.1.5.

Assim, por meio dos tempos de migração das MT a mobilidade do fluxo eletrosmótico foi calculada, tanto com o condicionamento do capilar apenas com água quanto com HCl 0,1 mol/L. A Tabela 3.4 mostra os resultados obtidos, onde é possível verificar que com 11 minutos de corrida eletroforética a mobilidade do fluxo variou na

ordem de $0,25 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ao considerar o capilar sem condicionamento com HCl. Por outro lado, considerando o mesmo tempo de corrida, porém com um capilar condicionado com HCl 0,1 mol/L, a mobilidade do fluxo variou apenas $0,02 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ou seja, ficou praticamente inalterada. Apenas houve uma variação do fluxo a partir de 12 minutos de corrida.

Como a resolução de algumas aminas aromáticas consideradas no método 3 é muito baixa, essa pequena variação do fluxo eletrosmótico pode sim afetar a repetibilidade. Por outro lado, após efetuar um condicionamento com HCl entre corridas, uma melhora na repetibilidade dos tempos de migração, bem como na resolução dos picos foi obtida.

Assim, por meio deste estudo foi possível comprovar que o uso do HCl melhora a repetibilidade do método, gerando um fluxo eletrosmótico constante pelo menos nos 11 primeiros minutos de corrida eletroforética, tempo este o suficiente para analisar todas as aminas, vide Figura 3.25.

Tabela 3.4: Medida do fluxo em diferentes tempos de corrida eletroforética, sem e com condicionamento do capilar com 0,1 mol/L de HCl.

	Sem o condicionamento do capilar com 0,1 mol/L de HCl	Com condicionamento do capilar 0,1 mol/L de HCl
Tempo das MT	$\mu_{\text{fosm}} / (10^{-9}) \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\mu_{\text{fosm}} / (10^{-9}) \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
A	6,30	6,00
B	6,55	6,02
C	6,76	6,43

A: MT de 3 até 6 minutos

B: MT de 7 até 11 minutos

C: MT de 12 até 15 minutos

3.2.4.4. Avaliação de outros condicionamentos do capilar usando aditivos ao BGE

Como descrito previamente a adição do reagente TEA ao eletrólito de corrida (método 1), ou no eletrólito de lavagem (método 3) não promoveu resultados satisfatórios em termos de resolução de algumas aminas aromáticas.

A literatura descreve como possibilidade de recobrimento do capilar o uso de surfactantes catiônicos, como por exemplo, o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) usado por Tsuda em 1987 para a análise de ânions²⁴. Estes são muito empregados com o intuito de reverter o fluxo eletrosmótico, entretanto, podem também ser empregados com o objetivo de recobrir a parede do capilar, impedindo assim a adsorção de compostos catiônicos. A concentração desse tipo de surfactante precisa ser cuidadosamente ajustada, pois a mesma pode interferir no mecanismo de separação, devido a interação do mesmo com o analito, como o reportado por Buchberger *et al*²⁵. Os autores mostraram a interação entre cianetos e o surfactante (sal de trimetilalquilamônio). Ainda, deve-se dar atenção à concentração micelar crítica (CMC) do surfactante, para evitar tal situação indesejada

Portanto, a busca por um recobrimento do capilar que pudesse melhorar a resolução dos picos foi realizada primeiramente por meio do uso de CTAB.

Por meio desse estudo verificou-se que a presença do CTAB no eletrólito promovia o mesmo efeito observado com o uso da TEA, ou seja, aumento do tempo de análise, como ilustrado na Figura 3.26.

²⁴ Tsuda, T., Modification of electroosmotic flow with cetyltrimethylammonium bromide in capillary zone electrophoresis, J High Resolut Chromatogr, v. 10, p. 622-624, 1987.

²⁵ Buchberger, W.; Haddad, P.R.; Separation of metallo-cyanide complexes by capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr A, v. 687, p. 343-349, 1994.

Figura 3.26: Avaliação do efeito do CTAB na separação das 20 aminas. Condicionamento inicial e entre corridas: otimizado (item 3,4 do anexo 1). BGE: dihidrogenofosfato de sódio, 70 mmol/L + CTAB 0,1mmol/L, pH=2,46 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Capilar: Ltot: 60 cm; V= +30 kV; T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Adicionalmente foi verificado o uso deste aditivo apenas no eletrólito de lavagem, assim como o realizado com a TEA, (Figura 3.20). Entretanto, como ilustrado na Figura 3.27, com o uso do CTAB nenhum ganho em termos de separação dos pares críticos foi alcançado, bem como um aumento no tempo de análise da ordem de 5 min foi observado.

Figura 3.27: Avaliação do efeito do CTAB apenas na etapa de condicionamento do capilar. Eletrólito de lavagem: dihidrogenofosfato, 70 mmol/L + CTAB 0,1mmol/L, pH=2,46 ajustado com ácido fosfórico. BGE: dihidrogenofosfato, 70 mmol/L, pH=2,46 ajustado com ácido fosfórico. Condições: capilar: Capilar: Ltot= 60 cm; V= +30 kV; T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

A literatura também destaca a eficiência do uso de polímeros para o recobrimento dinâmico da parede do capilar. Essa interação ocorre por meio de interação eletrostática, quando carregados, ou por interação via ligação de hidrogênio, quando neutros. Essa técnica foi introduzida por Hjértén em 1967⁷.

O polímero tem a função de suprimir o fluxo eletrosmótico por aumento da viscosidade do eletrólito na dupla camada elétrica. Um recobrimento mais estável é alcançado por meio do uso de polímeros hidrofóbicos, os quais tem grande afinidade pela parede do capilar e não são facilmente removidos da mesma por solução aquosa. Por outro lado, o uso dos polímeros hidrofílicos é limitado pelo fato de sua eficácia ser dependente do pH do meio²⁶.

Muitos autores também tem empregado polímeros catiônicos de cadeia carbônica extensas que promovem uma adsorção física na parede do capilar. Como exemplo tem-se: polibreno (PB), cloreto de polidialquildimetilamônio (PDADMAC), poliarginina (PA), agarose catiônica, citosana, entre outros²⁷.

Outras formas de se obter-se uma boa separação é por meio do recobrimento com bicamadas, como o mostrado por Catai *et al.*, os quais empregaram polibreno com ácido polivinil sulfônico (PVS) para obter uma bicamada na parede do capilar, para a separação de proteínas ácidas²⁸. Entretanto, esse tipo de recobrimento não é eficiente para a separação de proteínas básicas, pois a bicamada é carregada negativamente e assim as proteínas básicas tendem a adsorver na parede do capilar²⁹. Assim, seria interessante usar apenas a camada de polibreno a qual é positiva. Entretanto esse

²⁶ Albarghouti, M.N; Stein, T.M.; Barron, A.E; Comparison of capillary zone electrophoresis performance of powder-blasted and hydrogen fluoride-etched microchannels in glass, *Electrophoresis*, v. 24, p. 166-1175, 2003.

²⁷ Iliki, M.; Yeung, E.S.; Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis, *J Chromatogr A*, v. 731, p. 273-282, 1996.

²⁸ Catai, J.R.; Sartre, Toraño, J.; Jongen, P.M.J.M.; de Jong, G.J.; Somsen, G.W., Analysis of recombinant human growth hormone by capillary electrophoresis with bilayer-coated capillaries using UV and MS detection, *J Chromatogr B*, v. 852, p. 160-166, 2007.

²⁹ Haselberg, R.; Jong, G.J.; Somsen, G.W., Capillary electrophoresis of intact proteins using noncovalently triple-layer coated capillaries, *J. Sep. Sci.*, v. 32, p. 2408-2415, 2009.

procedimento diminui a estabilidade do recobrimento, sendo necessárias lavagens entre corridas para assegurar um elevado desempenho do método²⁹.

Alternativamente, múltiplas camadas podem ser usadas para esta finalidade, como o proposto por Haselberg *et al.* ²⁹ Os autores propuseram um recobrimento da parede do capilar com uma tripla camada, ou seja, uma de PB, outra de sulfato dextran (DS) e novamente uma camada de PB para solucionar o problema de adsorção de proteínas básicas.

Portanto, essa mesma metodologia foi estudada no método 3 otimizado. O preparo das soluções está discriminado no item 3.1.6 do procedimento experimental.

A Figura 3.28 mostra as réplicas após o condicionamento do capilar, por meio da qual é possível verificar uma nítida instabilidade refletida pelas variações de tempo de migração.

Figura 3.28: Estudo do efeito da tripla camada de PB-DS-PB na separação das 20 aminas. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Capilar: Ltot= 60cm; V= -30 kV; T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Na tentativa em melhorar a separação, a presença de acetonitrila no meio foi verificada, vide Figura 3.29. Por meio deste estudo foi possível verificar uma melhora na resolução de certas aminas e constância para as aminas que eluem mais rapidamente, ao ser comparada com a apresentada na Figura 3.28 (BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico).

Figura 3.29: Estudo do efeito da ACN na separação das 20 aminas aromáticas. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, ACN, pH=2,5 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Capilar: L_{tot} = 60cm; V = +30 kV; T =25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

A repetibilidade da condição foi avaliada, e, por meio da Figura 3.30, onde é possível observar que a separação das 20 aminas não apresentou repetibilidade, ao considerar as análises de um dia para o outro, tanto empregando o mesmo capilar condicionado com a tripla camada PB-SD-PB, quanto com um capilar condicionado novamente, como mostrado na Figura 3.30 C.

Uma possível explicação, para a falta de repetibilidade com a tripla camada antecedendo a injeção poderia ser a remoção da mesma pela presença do solvente ACN, bem como um condicionamento incompleto. Assim, é possível concluir que a metodologia empregada por Haselberg *et al.*²⁹ não apresentou-se adequada tanto em termos de separação das 20 aminas, quanto em repetibilidade de separação.

Figura 3.30: Avaliação da repetibilidade da separação das 20 aminas com capilar condicionado com PB-DS-PB. (A) dia 1; (B) dia 2; (C) dia 2 novo condicionamento com PB-DS-PB. BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, ACN 17% (v/v), pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico. Condições: Capilar: L_{tot} = 60cm; V = +30 kV; T =25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; λ = 200 nm.

Alternativamente, foi avaliada a viabilidade de uso de um capilar comercial com condicionamento permanente, ou seja, revestido com polivinilálcool (PVA). Esse tipo de capilar é caracterizado por uma união não covalente entre o polímero e a parede do capilar, isso porque durante a sua construção, o capilar é submetido a temperaturas elevadas da ordem de 160 °C, gerando camadas pseudocristalinas, não solúveis em água, que interagem muito provavelmente por ligação de hidrogênio³⁰.

A Figura 3.31 A mostra a separação das 20 aminas aromáticas com o emprego de um capilar comercial revestido com PVA, e a Figura 3.31 B mostra a separação das mesmas 20 aminas, porém com um capilar de sílica convencional, com o método de condicionamento de início de trabalho proposto, ou seja, “flush” de 10 min de BGE de lavagem (dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L contendo 12,3 mmol/L de TEA, pH 2,50 ajustado com ácido fosfórico), seguidos de 10 min de 30 kV de tensão aplicada. Ao comparar o perfil eletroforético com os dois capilares é possível observar que com o

³⁰ Blanco, D., Herrero, I., Laviana, L., Gutiérrez, M.D., Capillary zone electrophoretic separation of proteins using coated capillaries, J. Liq. Crom. & Rel. Technol., v. 25, p.1171-1185, 2002.

capilar revestido com PVA o tempo de análise aumentou. Isso porque, segundo a literatura o fluxo eletrosmótico é suprimido com esse tipo de revestimento. Esse tipo de capilar é usado geralmente para suprimir interações dos analitos com a parede do capilar, bem como minimizar o fluxo eletrosmótico³⁰. Entretanto, nenhum ganho significativo de resolução foi observado.

Figura 3.31: Eletroferogramas das 20 aminas aromáticas. (A) capilar comercial revestido com PVA; (B) capilar sem revestimento, com condicionamento de início de trabalho: “flush” de 10 min de eletrólito de lavagem (dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L contendo 12,3 mmol/L de TEA, pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico), seguidos de 10 min de 30 kV de tensão aplicada. Condições: BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,46 ajustado com ácido fosfórico; V= +30 kV, T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; Ltot: 60 cm; λ = 200 nm.

Por outro lado, a repetibilidade em termos de tempo de migração, ao empregar um capilar revestido, foi satisfatória para quase a totalidade das aminas estudadas a exceção das aminas 17 a 20, como ilustrado na Figura 3.32. Essa repetibilidade parcial

(para as aminas 1 a 16) dos tempos de migração foi obtida sem um condicionamento mais longo de início de trabalho, bem como entre réplicas, como o proposto no método 3.

A falta de repetibilidade nos tempos de migração para as aminas 17 a 20 pode ser visualizada na Figura 3.33.

Figura 3.32: Avaliação da repetibilidade dos tempos de migração das aminas aromáticas com um capilar revestido comercialmente com PVA. Condições: BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30 kV; T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; Ltot: 60 cm; λ = 200 nm.

Figura 3.33: Ilustração da falta de repetibilidade dos tempos de migração para as aminas 17 a 20 com o uso de um capilar revestido comercialmente com PVA. Condições: BGE = dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30 kV, T=25 °C; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; Ltot: 60 cm; λ = 200 nm.

Na Figura 3.33 também é verificada a assimetria de pico, provavelmente devido à adsorção dessas aminas na parede do capilar devido ao elevado tempo de permanência das mesmas dentro do capilar, ou a presença de eletrodispersão devido a diferença entre as mobilidades do sódio e das respectivas aminas 17 a 20. Esse tempo é maior devido a ausência de fluxo eletrosmótico promovido pelo recobrimento do capilar.

Assim, a única vantagem ao empregar um capilar revestido comercialmente é a frequência analítica, uma vez que é possível obter a mesma separação sem um condicionamento prévio do capilar com aditivos, como HCl, por exemplo. Portanto, é totalmente inviável o desenvolvimento de um método analítico de rotina ao levarmos em consideração o elevado custo de um capilar revestido (125 cm, ca. R\$= 900, 00), bem como o tempo de vida útil do capilar ao considerar a fragilidade da janela de detecção. Neste caso foi possível realizar apenas 20 análises com um único capilar.

O método proposto até o momento, ou seja, com um capilar convencional, com algumas etapas a mais de condicionamento inicial e entre corridas (vide procedimento experimental, item 3.1.4) foi satisfatório, bem mais barato, apenas com uma frequência analítica menor (ca. 2 minutos a mais por análise).

Portanto, o uso de um capilar convencional, com os condicionamentos estudados e apresentados no item 3.1.4 do procedimento experimental, será adotado para dar continuidade aos trabalhos.

3.2.4.5. Avaliação da interferência de produtos de degradação

A própria Diretiva 2002/61/EC¹ destaca a possibilidade de formação de outras aminas aromáticas por redução das aminas 18, 19 e 20, uma vez que essas aminas apresentam ligação azo em sua estrutura. Como produtos de degradação temos: anilina, toluidina, 2-metil-p-fenilenodiamina (MPFDA), 1,4-fenilenodiamina (FDA) e 2,4-diaminotolueno (DAT). Essas aminas podem se formar devido ao excesso de redutor empregado na etapa de desmembramento do corante azo. Portanto, a interferência dos produtos de degradação das aminas 18, 19 e 20, no método proposto foi avaliada. Entretanto a interferência dos produtos de degradação como a 1-4-fenilenodiamina e 2,4-diaminotolueno não foram avaliados devido à falta de padrão das mesmas.

Ao adicionar à mistura das 20 aminas uma concentração de 30 mg/L de anilina e o-toluidina, individualmente, foi observado um aumento da intensidade do pico referente às aminas 8 e 9, respectivamente, bem como a presença de mais um pico no início da corrida como ilustrado na Figura 3.34 A, B e C e a Figura 3.35.

Figura 3.34: Verificação da interferência da anilina e o-toluidina. (A): mistura das 20 aminas; (B): mistura das 20 aminas + 30 mg/L de anilina e (C) mistura das 20 aminas + 30 mg/L de anilina e toluidina. Condições: BGE = dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T = 25 °C; λ = 200 nm.

Figura 3.35: Verificação da interferência da amina MPFDA. Mix das 20 aminas + 30 mg/L de anilina, toluidina e MPFDA. Condições: BGE = dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T = 25 °C; λ = 200 nm.

Como ilustrado na Figura 3.35, a amina MPFDA não comprometeu a separação. Por outro lado, o mesmo não pode ser dito com relação às aminas anilina e o-toluidina as quais co-migraram com as aminas 8 e 9, respectivamente.

A confirmação da co-migração da anilina com a amina 8 foi feita por meio da comparação dos espectros da amina 8 pura e após a adição da anilina, vide Figura 3.36 e Figura 3.37, respectivamente. É visível a modificação do perfil do espectro da amina 8 após a adição da anilina confirmando assim co-migração desta com a amina 8.

A confirmação da presença da toluidina em 4,8 minutos não foi feita por meio do espectro UV-vis, pois é nítida a presença de mais um pico após a adição desta na mistura das aminas.

Figura 3.36: Eletroferograma da mistura das 20 aminas aromáticas ilustrando o espectro puro da amina 8. Pico 8: amina 8. Condições: BGE = dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; Ltot= 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T= 25 °C; λ = 200 nm.

Figura 3.37: Eletroferograma da mistura das 20 aminas aromáticas ilustrando a alteração do espectro da amina 8 após adição da anilina. Pico (8 + A): 30 mg/L da amina 8 + anilina; Pico (9 + T): 30 mg/L da amina 9 + toluidina. Condições: BGE = dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; capilar: Ltot= 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s; T= 25 °C; λ = 200 nm

Assim, é necessário saber se esses produtos de degradação realmente poderiam se formar. Para isso foi necessário saber a real quantidade de ditionito presente no meio e se esta poderia promover a formação desses produtos de degradação ou por redução da ligação azo (aminas 18 e 19) ou por redução do grupo nitro presente na amina 20.

A quantidade de ditionito sobressalente foi determinada após a redução de uma massa de 3 mg (correspondente a uma massa de 300 mg de matriz têxtil) do corante congo red. Essa quantidade de corante foi empregada para fins de economia, apesar de a Diretiva 2002/61/EC sugerir que as análises das matrizes têxteis sejam realizadas sempre com massas de 1 g de matriz têxtil o que corresponde a uma massa de 10 mg de corante.

Após a redução dos 3 mg de corante congo red por meio da adição de $3,10 \times 10^{-4}$ mol de redutor ditionito de sódio, a quantidade de redutor sobressalente foi determinada espectrofotometricamente como sugerido por Carvalho *et al*³¹, a qual deu uma quantidade em mols de $6,12 \times 10^{-7}$ mol.

As aminas 18, 19 e 20 foram colocadas em contato com o excesso de ditionito ($6,12 \times 10^{-7}$ mol/L). O procedimento adotado foi o mesmo usado para a redução do corante, descrito no procedimento experimental no item 3.1.9.2 do procedimento experimental.

Como essas aminas são coloridas (por possuírem grupo azo ou grupo nitro em sua estrutura), se a redução completa ocorrer, a solução ficará transparente comprovando o efeito do excesso do ditionito, ou seja, a degradação das aminas 18 a 20. A cor das aminas não se alterou na presença dessa quantidade de ditionito ($6,12 \times 10^{-7}$ mol), assim, provavelmente, a redução das aminas avaliadas não foi promovida.

Essa observação foi confirmada ao serem avaliados os espectros dessas aminas, bem como a relação das áreas das soluções padrão de cada amina com o padrão interno após terem sido analisadas pelo método 3. Os resultados estão ilustrados nas

³¹ Carvalho, L.M.; Schwedt, G., Spectrophotometric determination of dithionite in household commercial formulation using naphthol yellow S, *Mikrochim Acta*, v.138, p.83-87, 2002.

Figuras 3.38 a 3.40, respectivamente para as amins 19, 18 e 20, bem como na Tabela 3.5.

Por meio da Tabela 3.5 é possível observar que a amina 18 apresentou uma diminuição na concentração de ca. 10%, um indício de que houve um processo de degradação desta. Porém, não foi visualizada a anilina e a dianilina, as quais são produtos de degradação dessa amina.

Figura 3.38: Eletroferogramas do padrão de 30 mg/L da amina 19 (A) e; de 30 mg/L da amina 19 após contato com $6,12 \times 10^{-7}$ mol/L de ditionito (B). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; capilar: $L_{tot} = 60$ cm; $V = +30$ kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; $T = 25$ °C; $\lambda = 200$ nm.

Figura 3.39: Eletroferogramas da solução padrão de 30 mg/L da amina 18 (A) e; de 30 mg/L da amina 18 após contato com $6,12 \times 10^{-7}$ mol/L de ditonito (B). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; capilar: $L_{tot} = 60$ cm; $V = +30$ kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; $T = 25$ °C; $\lambda = 200$ nm.

Figura 3.40: Eletroferogramas da solução padrão de 30 mg/L da amina 20 (A) e; 30 mg/L da amina 20 após contato com $6,12 \times 10^{-7}$ mol/L de ditonito (B). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; capilar: $L_{tot} = 60$ cm; $V = +30$ kV; injeção: 5 s; $T = 25$ °C; $\lambda = 200$ nm.

Tabela 3.5: Porcentagem de concentração das aminas após serem tratadas com $6,12 \times 10^{-7}$ mol de ditionito.

Aminas	(%)
18	89,3
19	96.5
20	100

Até o momento, as aminas apenas foram avaliadas em presença de ditionito a uma concentração mínima possível, ou seja, considerando o excesso referente à análise de uma matriz têxtil a uma massa de 300 mg. É preciso avaliar a degradação na presença de uma quantidade maior de redutor.

No processo de redução são adicionados 17 mL de tampão citrato para cada 1g de matriz têxtil. Portanto, é possível analisar em um único frasco de falcon (ca. 50 mL) três matrizes têxteis por vez, quando empregados 1 g de matriz têxtil. Caso a massa de matriz têxtil seja reduzida para 300 mg, no mesmo tubo de falcon é possível analisar 7 amostras em uma única vez. Portanto, levando em consideração a análise de 7 amostras, o excesso de ditionito passa a ser de $4,28 \times 10^{-6}$ mols. Ao submeter 30 mg/L de cada uma das 3 aminas a essa quantidade de redutor, foi detectado novos picos no eletroferograma como ilustrado nas Figuras 3.42 a 3.44 se comparadas com a Figura 3.41 que ilustra o eletroferograma com as três aminas juntamente com o padrão interno antes da adição do redutor. Esses picos foram confirmados como produtos de degradação dessas aminas por meio da biblioteca do equipamento. Os produtos de degradação FDA e DAT, respectivos das aminas 18 e 20, não foram identificados, pois não foi possível obter uma biblioteca devido à falta de padrões para os mesmos.

Figura 3.41: Eletroferogramas da solução padrão de 30 mg/L das aminas 17 a 20 antes do contato com excesso de ditionito. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T = 25 °C; λ = 200 nm.

Figura 3.42: Eletroferograma da solução padrão de 30 mg/L da amina 20 após o contato com excesso de ditionito ($4,28 \times 10^{-6}$ mols). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV, injeção: 5 s com 50 mbr de pressão; T = 25 °C, λ = 200 nm

Figura 3.43: Eletroferograma da solução padrão de 30 mg/L da amina 18 após o contato com excesso de ditionito ($4,28 \times 10^{-6}$ mols). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T = 25 °C; λ = 200 nm.

Figura 3.44: Eletroferograma da solução padrão de 30 mg/L da amina 19 após o contato com excesso de ditionito ($4,28 \times 10^{-6}$ mols). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T = 25 °C; λ = 200 nm

Os resultados indicam que uma quantidade maior de ditionito no meio promove a degradação das aminas 18 a 20 e, conseqüentemente, os respectivos produtos de degradação são formados.

Uma forma de tentar melhorar a separação das aminas ao incluir os produtos de degradação poderia ser a alteração do pH do meio. Portanto, ao alterar o pH do eletrólito para 2,7, (vide Figura 3.45) foi possível verificar que os produtos de degradação DTA e FDA co-migraram com as aminas 1 a 3, bem como a anilina e toluidina co-migraram com as aminas 7 e 9, respectivamente. Por outro lado o produto de degradação MPFDA continuou não comprometendo a separação. Além disso, neste pH observa-se que houve uma resolução dos pares críticos 13 e 14.

Esta seria uma boa condição de separação caso esses produtos de degradação fossem encontrados, uma vez que a amina 1 poderia ser separada por espectro (apresenta dois máximos, 1 em 200 e outro em 250 nm), bem como a amina 7. A única amina que ainda apresentaria co-migração seria a amina 9. A própria Diretiva de 2002/61/EC destaca que esses corantes são muito difíceis de serem empregados, conseqüentemente, seus produtos de degradação não são encontrados. Caso os mesmos forem encontrados a solução para o problema seria analisá-los em um pH 2,70.

Por esse motivo optou-se por dar continuidade aos trabalhos com o método previamente otimizado, ou seja, em pH 2,50.

Figura 3.45: Eletroferograma da mistura de 30 mg/L de solução padrão das 20 aminas aromáticas juntamente com os produtos de degradação. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L; pH=2,70 ajustado com ácido fosfórico; L_{tot} = 60 cm; V = +30 kV; injeção: 5 s com 50 mbar de pressão; T = 25 °C; λ = 200 nm.

3.2.4.6. Estudo da extração – SPE e CPE

Avaliação da eficiência da extração por ponto nuvem e em fase sólida (SPE)

Antes de se analisar um determinado composto por uma determinada técnica é de grande importância, que esta substância esteja o mais livre possível de interferentes da matriz, ou seja, isolar o analito da matriz. Assim, *clean-up* da amostra, ou seja, isolar o analito dos possíveis interferentes da matriz é prática comum.

A literatura apresenta diversas opções para a realização de *clean-up* de amostra, incluindo a técnica convencional de partição líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid liquid extraction*), a qual é muito empregada. Entretanto, LLE apresenta como desvantagem o elevado consumo de tempo e solventes orgânicos, bem como em geral acrescenta etapas muito laboriosas ao método. Assim, nas últimas duas décadas, o apelo para a redução do uso de grandes volumes de solventes fez com que aumentasse a demanda de alternativas rápidas e automatizadas para extração. Um dos exemplos é a extração

em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*), como também a extração por ponto nuvem (CPE, do inglês *cloud point extraction*), as quais apresentam uma frequência analítica maior se comparadas com a LLE.

A SPE é uma técnica de separação baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, ou seja, emprega-se uma pequena coluna aberta, denominada de cartucho de extração, que contém a fase sólida (fase estacionária da cromatografia). Assim, a solução contendo o analito é introduzida no cartucho e aspirada por meio de um baixo vácuo, ou pressionada com uma seringa de forma a penetrar na fase sólida. Em seguida, o analito retido nesta fase sólida é eluído com um pequeno volume de solvente.

O uso da SPE tem diversas finalidades, tais como: enriquecimento, *clean-up*, isolamento da matriz, etc. No primeiro caso (enriquecimento), tem-se como objetivo a pré-concentração da amostra, ou seja, reduzir a solução da amostra a um volume menor, concentrando assim o analito de interesse. Tal procedimento é usualmente empregado na química ambiental. Já, no *clean-up* se tem interesse no aprisionamento da amostra, como já discutido previamente. Por outro lado, no isolamento da matriz queremos exatamente o contrário do *clean-up*, ou seja, neste caso se objetiva o aprisionamento da matriz da amostra e deixa-se passar o analito pela coluna³².

A maioria dos trabalhos envolvendo quantificação de aminas aromáticas, destaca o uso e a eficiência da SPE, como o descrito por Cavallaro, *et al.*³³. Os autores analisaram 21 aminas aromáticas de águas ambientais, por extração com cartuchos de SPE. Os mesmos alcançaram um enriquecimento da ordem de 100 vezes. Por outro lado, com intuito de realizar um *clean-up* na amostra, os autores Smith, *et al.*³⁴ também empregaram cartuchos de SPE de troca catiônica, bem como cartuchos com caráter

³² Lanças, F. M., Extração em fase sólida (SPE), Rima, São Paulo, 2004

³³ Cavallaro, A.; Piangerelli, V.; Nerini, Cavalli, S; Reschiotto, C., Selective determination of aromatic amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction, v. 709, p.361-366, 1995.

³⁴ Smith, C.J.; Dooly, S.G.L.; Moldoceanu, S.C., New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke, v. 991, p. 99-107, 2003.

apenas hidrofóbico, para extrair aminas aromáticas da fumaça de cigarros e obtiveram bons resultados de recuperação, sem interferência da matriz.

Outra forma eficiente de extração de compostos é por meio da extração em ponto nuvem. Esta é uma técnica que se baseia no fenômeno em que uma solução aquosa de surfactante torna-se turva pela adição de um tensoativo em determinadas condições de temperatura e pressão. A turbidez ocorre porque o surfactante atinge seu ponto nuvem. Nesta hora, a solução duas fases distintas são formadas: uma rica em surfactante e outra pobre em surfactante as quais são nitidamente visualizadas após submetidas a centrifugação e choque térmico com banho de gelo. É uma técnica é empregada com intuito de separar e pré-concentrar³⁵. A literatura descreve alguns trabalhos empregando CPE para extração de vitaminas, herbicidas, fenólicos, bem como aminas aromáticas, como relatado por Wu, Y, *et al.*³⁶

Ainda, a literatura descreve a possibilidade do uso de extração de aminas assistida por ultrassom, como o descrito por Zhou *et al.*³⁷. Os autores obtiveram bons resultados para a extração de aminas de amostras de água por meio da adição do reagente hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolium após serem submetidos ao ultrassom por 5 minutos. Ainda, aminas aromáticas heterocíclicas foram determinadas em amostras de carne frita por meio de extração ultrassônica e obtiveram recuperações de até 60%³⁸.

O método convencional para extração das aminas encontrado na Diretiva de 2002/61/EC¹ emprega primeiramente terra de diatomácea para a retenção das aminas,

³⁵ Bezerra, M.A.; Ferreira, S.L.C., Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica. 2006, Edições UESB, 168p.

³⁶ Wu, Y.; Huang, S.; Cloud point preconcentration and liquid chromatographic determination of aromatic amines in dyestuffs, *Anal. Chim. Acta*, 373, 197-206.

³⁷ Zhou, Q.; Zhang, X.; Xiao, J., Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase micro-extraction: A novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples, *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p.4361-4365, 2009.

³⁸ Janoszka, B.; Blaszczyk, U; Warzecha, L; Strózyk, M; Damasiewicz-Bodzek, A, Clean-up procedure for the analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazarenes) from heat treated meat samples, *J. Chromatogr. A*, v.938, p.155-165, 2001.

seguida de uma extração sólido-líquido com terc-butil-metil-eter. Este procedimento apresenta um elevado consumo de tempo, bem como faz uso de solventes prejudiciais à saúde, e com resultados de baixa confiabilidade.

Neste sentido, o objetivo dessa parte do trabalho foi propor métodos de extração alternativos aos adotados pela Diretiva de 2002/61/EC que apresentassem uma maior frequência analítica, com uso de solventes menos prejudiciais, com volume reduzido e por fim gerassem resultados mais confiáveis. Assim, foram estudadas: extração com ultrassom, seguida de uma SPE (C-18, troca catiônica) ou por CPE para tal finalidade.

A parte da extração por ultrassom foi primeiramente à sugerida por Alström *et al.*². Um estudo detalhado desta será descrito no item subsequente. Detalhes estão descritos no item 3.1.9.3 do procedimento experimental.

O objetivo da segunda parte da extração é promover um *clean up* após a redução, bem como uma pré-concentração após a extração das aminas da matriz têxtil por meio do procedimento com HCl a quente em ultrassom (vide item 3.1.9.3). Assim, o estudo de *clean-up* foi primeiramente realizado com a mistura dos padrões das aminas de interesse neste trabalho, para avaliar a eficiência da extração nos dois sistemas.

A Figura 3.46 mostra o perfil de separação do extrato de 30 mg/L de algumas aminas aromáticas após extração por SPE em cartuchos C-18. Por meio da mesma é possível observar a presença de muitos picos desconhecidos e uma perturbação em linha de base, diferentemente do encontrado no perfil eletroforético do extrato de 75 mg/L das aminas aromáticas obtido após extração SPE em uma coluna de troca catiônica, como ilustrado na Figura 3.47.

Com uma coluna de troca catiônica, verifica-se um eletroferograma praticamente livre de picos desconhecidos, bem como uma linha de base bem definida foram obtidos. Vale ressaltar que a separação das aminas otimizada para o método 3, não é a mesma apresentada nas Figuras 3.46 e 3.47, pois para este teste foi empregado um equipamento com refrigeração com líquido refrigerante, diferentemente do equipamento empregado na otimização dos métodos 1, 2 e 3 que era com refrigeração a ar.

A escolha do melhor método de extração foi realizada por avaliação da eficiência de extração, ou seja, a relação área/padrão interno do extrato foi comparada com relação área/padrão interno de uma solução padrão nas mesmas concentrações.

Neste sentido, a coluna C-18 não se apresentou eficiente em termos de eficiência de extração principalmente para as aminas 1, 4, 14 e 16, em relação à coluna com resina de troca catiônica (Figura 3.48). Essas aminas apresentam relativa hidrofobicidade, portanto, interagem fortemente com a fase estacionária que também é apolar. Para alcançar uma eficiência de extração satisfatória, um aumento da força do solvente se faz necessária. Portanto, após o emprego do solvente hexano, outras aminas com caráter hidrofóbico foram eluídas, como a amina 17 e 18.

Vale ressaltar que a eficiência de extração das duas colunas só foi feita para as aminas que não estavam co-migradas.

Figura 3.46: Perfil eletroforético do extrato obtido da extração em fase sólida das aminas aromáticas com uma coluna de fase reversa C-18. Condições: 70 mmol/L fosfato; pH=2,50; injeção 5 s; +30 kV; Ltot = 60 cm. Procedimento de extração vide item 3.1.9.4.2.1 do procedimento experimental.

Figura 3.47: Perfil eletroforético do extrato obtido da extração em fase sólida das aminas aromáticas com uma coluna de troca catiônica Stracta-X-C comercial. Condições: 70 mmol/L fosfato; pH=2,50; injeção 5 s; +30 kV; Ltot = 60 cm. Procedimento de extração vide item 3.1.9.4.2.2 do procedimento experimental.

Figura 3.48: Comparação da eficiência de extração de algumas aminas empregando SPE C-18 e SPE de TC. Condições: vide item 3.1.9.4.2.1 e 3.1.9.4.2.2 do procedimento experimental. TC: resina de troca catiônica; C-18: resina de fase reversa.

Por meio dos resultados apresentados, é possível concluir que a melhor coluna a ser empregada para dar continuidade aos estudos é a de resina com troca catiônica.

O procedimento de SPE com resina de troca catiônica com coluna comercial foi comparado com SPE com coluna empacotada manualmente. Os eletroferogramas dos dois extratos, bem como a eficiência de extração estão ilustrados nas Figuras 3.49 e 3.50, respectivamente.

Figura 3.49: Perfil eletroforético das 20 aminas aromáticas após a extração com SPE com resina de troca catiônica. Eletroferograma azul: extrato da SPE com coluna comercial (SPE - CC); eletroferograma vermelho: extrato da SPE com coluna empacotada manualmente (SPE-CEM). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; +30 kV; T= 25 °C; Ltot = 60 cm; λ = 200 nm.

Figura 3.50: Comparação da eficiência de extração das aminas aromáticas com as colunas de SPE CC e CEM. Condições: vide item 3.1.9.4.2.2. do procedimento experimental. SPE (CC): extração em fase sólida com coluna comercial; SPE (CEM): extração em fase sólida com coluna empacotada manualmente.

Por meio dos resultados é possível verificar que a coluna comercial foi a que apresentou melhor resposta em termos de eficiência de extração, principalmente para as aminas 5 a 8, 18 e 19 em comparação com a empacotada manualmente. Apesar das duas serem de troca catiônica, a eficiência de extração desta última (CEM) foi menor muito provavelmente devido ao empacotamento ineficiente. Assim, o eluente fica menos tempo em contato com a resina, ou seja, a eluição ocorre muito rapidamente comprometendo a extração. Portanto, como o empacotamento da coluna comercial é mais eficiente, o contato do eluente com a resina é mais longo, consequentemente uma melhora na eficiência de extração é alcançada.

Alguns autores empregam em linha tanto a coluna C-18 quanto a de TC, uma seguida da outra, pois os mesmos verificaram baixa recuperação de aminas mais hidrofóbicas³⁹.

Além da extração com SPE, a literatura relata o uso da extração de aminas aromáticas por CPE⁴⁰.

Para este experimento foram testadas concentrações de tensoativo (Triton X-114) que variaram de 0,5 a 4% (m/v). A Figura 3.51 ilustra as fases, rica e pobre em tensoativo, em cada concentração estudada. Ao avaliar a Figura 3.51, é possível verificar que a intensidade da cor amarelada na fase pobre em tensoativo diminui ao aumentar a concentração do mesmo, levando-nos a concluir que à medida que a quantidade de tensoativo é adicionada, mais aminas são extraídas pelo tensoativo. Essa constatação foi confirmada ao calcular a eficiência de extração, como pode ser visualizado na Figura 3.52, ou seja, uma tendência de aumento de eficiência é observada à medida que a concentração de tensoativo é aumentada. Por outro lado, nenhuma diferença significativa é verificada ao compararem-se as concentrações de 1% ou 2 % de tensoativo.

³⁹ Lavandeira-García, J.; Petinal-Salgado, C., A sensitive and efficient procedure for the high throughput determination of banned aromatic amines in textiles and leather products aided by advanced sample composition, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 751-763

⁴⁰ Wu, Y-C.; Huang, S-D., Cloud point preconcentration and liquid chromatographic determination of aromatic amines in dyestuffs, *Anal. Chim. Acta*, v.373, p.197-206, 1998,.

Figura 3.51: Ilustração das fases rica e pobre em tensoativo (Triton X-114) em diferentes concentrações de tensoativo. Condições: vide item 3.1.9.4.1.do procedimento experimental. FPT: Fase pobre em tensoativo; FRT: Fase rica em tensoativo

Figura 3.52: Eficiência de extração das aminas aromáticas em diferentes concentrações de tensoativo. Condições: item 3.1.9.4.1 do procedimento experimental.

A extração por ponto nuvem, além de não apresentar uma eficiência de extração satisfatória para todas as aminas em estudo, a presença do tensoativo no *plug* de amostra promoveu interferência na separação das aminas 17 e 18, bem como das aminas 19 e 20, como ilustrado na Figura 3.53.

Figura 3.53: Perfil da separação eletroforética do extrato com ponto nuvem. Condições: BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; V=+30 kV; T= 25 °C; Ltot=60 cm; λ = 200 nm .

Com relação à baixa eficiência de extração, mais acentuada para a 4 e 9, em se tratando de concentrações de tensoativo menores que 2%, pode-se dizer que estas apresentam baixa afinidade pela micela formada no CP. Isso é comprovado ao ser avaliado o logaritmo do coeficiente de partição água/tensoativo, logP destas duas e compararmos com o logP das demais aminas. Estes dados estão ilustrados na Tabela 3.6, e foram obtidos por meio de cálculos empíricos por meio de um método

implementado no programa *Spartan* baseado nos trabalhos de Ghose *et al*⁴¹. O coeficiente de partição água/tensoativo de um composto é definido como sendo a relação entre as concentrações do analito nestas duas fases no estado de equilíbrio. Assim, quanto menor o logP mais hidrofílico o composto, ou seja, tem mais afinidade pela água do que com o tensoativo. Por outro lado, quanto maior o logP, como é o caso das aminas 16 e 18, o composto é retido com mais facilidade no tensoativo⁴².

Tabela 3.6 Relação dos logP das aminas aromáticas para o sistema água:Triton X-114.

Amina	logP
1	2.1
2	1.45
3	2.52
4	0.3
5	2.02
6	3.5
7	3.08
8	1.85
9	1.1
10	1.79
11	1.59
12	2.23
13	2.28
14	2.69
15	2.91
16	3.64
17	3.22
18	3.67
19	4.64
20	1.75

⁴¹ Ghose, A.K; Crippen, G.M., Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. J. Chem. Inf. Comput. Sci., v. 27, p.21-35, 1987.

⁴² Kubinyi, H., in "QSAR: Hansch analysis and related approaches", VCH, Weinheim, 1993.

Huang e colaboradores determinaram aminas aromáticas em corantes por meio de extração por ponto nuvem. Os autores obtiveram recuperações de até 100% para as aminas mais hidrofóbicas como a 3,3-dimetilbenzidina e 4-aminobifenil. Portanto, os resultados aqui obtidos estão de acordo com o obtido pelos autores³⁶.

Por fim, a eficiência de extração dos modos de extração aqui estudados, a exceção da extração com resina C-18, foram comparadas. Os resultados dessa comparação estão ilustrados na Figura 3.54, por meio da qual é possível verificar que a extração em fase sólida com resina de troca catiônica comercial apresentou a maior eficiência de extração para o maior número de aminas aromáticas. Portanto, este procedimento será adotado para dar continuidade aos trabalhos.

Figura 3.54: Comparação da eficiência de extração das aminas aromáticas entre os procedimentos de SPE (CC e CEM) e PN. Condições: vide item 3.1.9.4.2.2 e 3.1.9.4.1 do procedimento experimental, respectivamente. SPE TC (CC): extração em fase sólida com resina de troca catiônica (coluna comercial); SPE TC (CEM): extração em fase sólida com resina de troca catiônica coluna empacotada manualmente; EPN: extração por ponto nuvem.

3.2.4.7. Aplicação do método de extração SPE com troca catiônica em amostra sintética

A aplicação do procedimento de extração em fase sólida que previamente foi estudado só com padrões, agora será aplicado para a amostra têxtil empregando o método de extração das aminas da matriz têxtil como sugerido por Ahlström, como descrito no item 3.1.9.3 do procedimento experimental².

Para tal estudo, uma amostra sintética de algodão 100% tingida com os corantes Congo red e Direct red 7, de acordo com o procedimento experimental (item 3.1.9.1) foi usada e submetida ao processo de redução desses corantes (item 3.1.9.2) seguida dos procedimentos das etapas de extração com ultrassom e SPE com resina de troca catiônica, como relatado acima (itens 3.1.9.3 e 3.1.9.4.2.2 do procedimento experimental). Mais informações, a respeito dos corantes empregados, estão apresentadas na Tabela 3.1 do procedimento experimental.

A Figura 3.55 mostra o perfil eletroforético do extrato obtido após uma matriz têxtil (ca. 300 mg algodão 100%) ter sido submetida a todas as etapas de tratamento descritas. Os espectros na região UV mostram a presença das aminas 1 e 8, confirmadas pela comparação com os espectros obtidos com padrões puros de cada uma delas.

Figura 3.55 Perfil eletroforético do extrato matriz têxtil, após extração SPE com resina de troca catiônica. Amostra empregada: ca 300 mg de algodão 100% e ca 3 mg dos corantes congo red e direct red 7). Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,5 ajustado com ácido fosfórico; V=+30 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; T=25 °C; λ = 200 nm.

Por meio dos resultados aqui apresentados conclui-se que o procedimento de clean-up após extração SPE com resina de troca catiônica apresentou-se eficiente para a extração das amins 1 e 8 de um extrato matriz têxtil sintética de celulose, apesar de ter sido empregado o procedimento de extração das amins da matriz têxtil com ultrassom sem uma otimização prévia, isto é, o sugerido da literatura.

3.2.4.8. Estudo da extração com ultrassom por meio de planejamento fatorial por superfície de resposta

Como descrito previamente, o procedimento de extração das aminas envolve três etapas, a redução, seguida de uma extração por ultrassom (procedimento de extração 1) com posterior pré-concentração e clean-up com SPE com resina de troca catiônica (procedimento de extração 2).

Portanto, nesta parte do trabalho, será abordado o estudo do primeiro procedimento de extração. Entretanto, foram consideradas apenas as aminas 1, 7 e 8 presentes na estrutura dos azo corantes disponíveis no laboratório (Congo Red, Direct Blue e Direct Red 7, respectivamente), específicos para tingimento de matriz de celulose.

Para avaliação da condição ótima de extração de aminas por ultrassom, um planejamento experimental baseado em modelos de superfície de resposta do tipo Box-Behnken foi aplicado⁴³. O modelo de Box-Behnken é construído como um modelo fatorial incompleto de três níveis (-1, 0 e +1) para explorar superfícies de resposta de segunda ordem. É um modelo alternativo em relação ao fatorial de três níveis ou o modelo composto central. Neste modelo matemático, o número de experimentos é obtido pela Equação 14.

$$N = 2k(k - 1) + PC \dots\dots\dots 14$$

onde: k é o número de variáveis; e PC, o número de repetições no ponto central.

No design Box-Behnken, os fatores são avaliados de dois em dois em um fatorial completo de dois níveis sendo a terceira variável mantida fixa no nível médio. Assim, três conjuntos de quatro tratamentos são executados.

No estudo da extração, as variáveis: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo de ultrassom (min) e concentração do ácido clorídrico (mol/L) foram escolhidas com base no estudo realizado por Alström². Os níveis das variáveis citadas estão especificados na Tabela

⁴³ Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., Como fazer experimentos, Editora Unicamp, 3^a ed., 2007.

3.7. Dentre a diversidade de funções respostas estabelecidas na literatura⁴⁴, a área do pico eletroforético foi a mais adequada para expressar o rendimento de extração das aminas 1, 7 e 8. Para A avaliação das respostas observadas para as aminas 1, 7 e 8, foi aplicado o modelo com três variáveis ($k=3$), resultando em 12 combinações de experimentos mais 3 repetições no ponto central. Assim, 15 experimentos foram realizados.

Tabela 3.7: Variáveis experimentais e níveis usados no modelo de Box-Behnken.

Fator	(-)	(0)	(+)
A (°C)	20	40	60
B(min)	5,0	10	15
C (mol/L)	0,01	1,0	1,99

(A) Temperatura

(B) Tempo

(C) Concentração de HCl

A Tabela 3.8 apresenta as variáveis avaliadas e as respostas obtidas a partir da realização dos 15 experimentos sugeridos pelo modelo.

⁴⁴ Klein, E.J., Rivera, S.L., A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies v. 23 , p. 2097-2121, 2000.

Tabela 3.8: Níveis das variáveis estudadas e respostas das aminos 1, 7 e 8 nos ensaios experimentais.

Ensaio	Ordem dos ensaios	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Resposta		
		A:	B:	C:			
		Temperatura	Tempo de ultrassom	Concentração de HCl	Área		
		(°C)	(min)	(mol/L)	amina 1	amina 7	amina 8
14	1	40	10	1,00	33	3.7	5.2
11	2	40	5	1.99	17	3.3	4.7
9	3	40	5	0.01	28	3.1	4.6
3	4	20	15	1,00	29	3.4	4.4
8	5	60	10	1.99	17	3.1	4.4
13	6	40	10	1,00	33	3.5	4.8
2	7	60	5	1,00	31	3.6	5.4
6	8	60	10	0.01	26	3	4.7
7	9	20	10	1.99	17	3.5	5.1
4	10	60	15	1,00	30	3.5	5.2
10	11	40	15	0.01	25	2.8	3.8
12	12	40	15	1.99	20	3.3	5.7
15	13	40	10	1,00	32	3.4	5.2
5	14	20	10	0.01	23	2.4	3.5
1	15	20	5	1,00	28	3.4	4.7

De acordo com os resultados do programa Design Expert a função quadrática foi adequada para relacionar o comportamento das variáveis em relação às respostas. Assim, uma superfície de resposta foi construída baseada na seguinte equação:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

onde: y é a resposta experimental, neste caso, são os valores de área das aminas; b_0 é o coeficiente do modelo; b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes dos efeitos principais; b_{12} , b_{13} , b_{23} são os coeficientes de interação; b_{11} , b_{22} e b_{33} são os coeficientes quadráticos; x_1 , x_2 e x_3 representam as variáveis independentes (temperatura, tempo de ultrassom e concentração de HCl, respectivamente). Os coeficientes da equação modelada para cada amina estão ilustrados na Tabela 3.9 juntamente com os dados estatísticos. Os valores da ANOVA para cada termo da equação estão nas Tabelas 3.10 a 3.12, respectivamente para as aminas 1, 7 e 8.

Ao avaliar o valor de F e p para a variável, tempo de ultrassom, é possível observar que esta não apresenta influência sobre o modelo, ou seja, apresentou um valor p maior que 0,05 e F muito pequeno. Isso se reflete nos parâmetros quadráticos da equação, os quais também apresentaram valores de p maiores que 0,05.

Por outro lado, a variável que apresentou maior influência no modelo foi a concentração de ácido clorídrico, o que esta de acordo com a literatura. Uma possível explicação para isso seria a forte interação por ligação de hidrogênio do grupo amino das aminas aromáticas com o grupamento hidroxila da celulose. Assim, com a adição do ácido a protonação das aminas ocorre e a dessorção das mesmas da matriz têxtil é promovida. Este efeito é mais pronunciado com maior concentração do ácido até atingir um patamar.

Vale ressaltar que apesar do segundo fator não ter se apresentado significativo, o modelo de um modo geral apresentou-se significativo, como pode ser observado na Tabela 3.9 por meio dos valores de F e p do modelo.

A partir de então, as superfícies de resposta foram obtidas, como pode ser visualizado nas Figuras 3.56 a 3.57, respectivamente para as aminas 1, 7 e 8.

Para obter uma resposta otimizada, o programa mantém uma variável no ponto central, e, as interações entre variáveis são visualizadas por meio da superfície de resposta. Porém, se o ajuste dos pontos sugerido pelo modelo não apresentar um máximo de resposta, o programa permite visualizar outra superfície de resposta em outros níveis de variáveis, dentro do domínio experimental. Isso ocorreu com as superfícies de resposta obtidas para as aminas 7 e 8 (Figuras 3.57 e 3.58). Considerando a amina 7, é possível verificar que a variável fixa, concentração de HCl, não está no ponto central (1,0 mol/L) mas sim no nível mais alto (1,99 mol/L), bem como o tempo de ultrassom fixo em 5 min, e a temperatura fixa em 60 °C, (vide Figura 3.57), respectivamente. O mesmo é observado para a amina 8, a exceção do tempo de ultrassom e temperatura as quais estão fixadas nos níveis alto e baixo, respectivamente, (vide Figura 3.58).

Tabela 3.9: Coeficientes da função quadrática obtida na otimização da extração das aminas e dados estatísticos do modelo.

y	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₁₂	b ₁₃	b ₂₃	b ₁₁	b ₂₂	b ₃₃	R ² _{aj}	F	p
A _{amina 1}	32.78 ±	0.88 ±	0.058 ±	-3.82 ±	-0.51 ±	-0.70 ±	1.52 ±	-2.26 ±	-0.42 ±	-9.53 ±	0.9904	162.1	0,0001
	0,33	0,20	0,20	0,20	0,29	0,29	0,29	0,30	0,30	0,30			
A _{amina 7}	3.54 ±	0.065±	-0.035 ±	0.24 ±	-0.044 ±	-0.26 ±	+0.075	-0.11 ±	+0.032	-0.45 ±	0.8426	9.32	0,0121
	0,080	0,049	0,049	0,049	0,069	0,069	± 0,069	0,072	± 0,072	0,072			
A _{amina 8}	5.07 ±	0.26 ±	-0.035 ±	0.42 ±	0.014 ±	0.49 ±	0.45 ±	-0.20 ±	+0.056	-0.43 ±	0.8133	7.78	0,0180
	0,15	0,090	0,090	0,090	0,13	0,13	0,13	0,13	± 0,13	0,13			

A: área das aminas
F: valor de F de Fisher
p: probabilidade
R²_{aj}: Coeficiente de correlação ajustado

Tabela 3.10: ANOVA para a superfície de resposta do modelo quadrático para a amina 1.

Fatores	Valor de F	Valor de p
A	18,80	0,0070
B	0,083	0,7850
C	355,0	< 0,0001
AB	3,170	0,135
AC	5,980	0,0580
BC	28,30	0,0030
A ²	57,40	0,0010
B ²	2,020	0,2140
C ²	1019	<0,0001

Tabela 3.11: ANOVA para a superfície de resposta do modelo quadrático para a amina 7

Fatores	Valor de F	Valor de p
A	1,70	0,240
B	0,52	0,500
C	24,0	0,004
AB	0,41	0,550
AC	14,0	0,013
BC	1,20	0,330
A ²	2,40	0,180
B ²	0,20	0,670
C ²	39,0	0,002

Tabela 3.12: ANOVA para a superfície de resposta do modelo quadrático para a amina 8.

Fatores	Valor de F	Valor de p
A	8,400	0,0340
B	0,150	0,7200
C	21,00	0,0057
AB	0,013	0,9200
AC	15,00	0,0120
BC	13,00	0,0170
A ²	2,300	0,1900
B ²	0,180	0,6900
C ²	11,00	0,0230

Figura 3.56: Superfícies de resposta para a amina 1

Figura 3.57: Superfícies de resposta para a amina 7.

Figura 3.58: Superfícies de resposta para a amina 8

Após o estudo da melhor condição de extração para as aminas, individualmente, é necessário obter uma condição ótima de extração única para as três aminas. Assim, recorreu-se ao conceito de desejabilidade. Atribui-se a função desejabilidade (d) para cada resposta valores restritos ao intervalo de 0 a 1⁴⁵. O valor de 0 e 1 significa inaceitável e mais desejável, respectivamente.

A desejabilidade individual é dada por:

$$d = (y - LI / A - LI)^s, \text{ para } LI \leq y \leq A;$$

$$d = (y - LS / A - LS)^t, \text{ para } A \leq y \leq LS;$$

$$d = 0; \text{ para } y \text{ fora do intervalo } LI \text{ e } LS.$$

onde: d é a desejabilidade individual (intervalo de 0 a 1); A é o valor ótimo desejado; LI e LS são os limites inferior e superior, respectivamente; s e t são os expoentes responsáveis pela taxa de variação da função.

Assim, as funções individuais de desejabilidade (d) são combinadas em uma desejabilidade global (D) (equação 15) para encontrar os níveis das variáveis que maximizem o valor de D .

$$D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{m/2} \quad (15)$$

Os resultados da desejabilidade global estão ilustrados na Figura 3.59. A condição indicada pela função com valor de D de 0,913 estabelece as variáveis, temperatura, tempo de ultrassom e concentração de HCl em valores de 52 °C, 5 min e 0,77 mol/L, respectivamente.

⁴⁵ Jimidar, M., Bourguignon, B., Massart, D.L., Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis, v. 740, p. 109-117, 1996.

Figura 3.59: Superfícies de resposta para a desejabilidade global

3.2.4.9. Figuras de mérito.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis é preciso que o mesmo sofra uma avaliação denominada de validação⁴⁶. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas, podendo promover um grande dano financeiro ou até mesmo à saúde humana.

Um processo de validação bem definido demonstra que o método proposto apresenta um sistema adequado para uso. Portanto, existem diferentes agências reguladoras, tais como, ANVISA, USP, AOAC e INMETRO, por exemplo, cada qual com diretrizes distintas, para cada finalidade.

Em se tratando de indústria têxtil, esta emprega para a validação de seus processos as normas sugeridas pelo INMETRO⁴⁷, portanto, os parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido serão baseados nesta norma com algumas exceções, como descrito no decorrer do texto.

Dentre os parâmetros de validação existentes, foram avaliados, linearidade, LD e LQ, precisão, robustez, seletividade, especificidade e recuperação.

Com relação a linearidade do método proposto, uma curva analítica processada foi construída, ou seja, a pequenas porções de matriz têxtil sem tintura (branca) foram adicionadas concentrações crescentes da mistura dos padrões das 20 aminas. Estas foram submetidas aos 2 processos de extração (ultrassom e SPE) estudados e analisadas pelo método 3 de eletroforese capilar proposto. A ANOVA foi usada para avaliar a linearidade do método para cada uma das aminas. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.13. A linearidade para as aminas 4, 9, 10, 11, 12 e 20 não foi considerada. A explicação está no fato de a amina 4 não ter sido constatada em nenhum nível de concentração estudado. Este mesmo fato foi observado para as aminas 9, 10, 11 e 12 em concentrações abaixo de 60 mg/L. Por outro lado, a linearidade para a amina 20 não foi considerada, pois os valores de área e concentração estudados não se apresentaram com boa correlação, ou seja, os valores de R^2 encontrados foram menores que 0,700.

⁴⁶ Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.; Melo, L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, Quim. Nova, 2004, 27, 771-780.

⁴⁷ INMETRO - <http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>

Para as demais aminas pode-se dizer que apresentaram bons coeficientes de determinação, bem como valores de F e p adequados.

Vale ressaltar que, para a determinação dos demais parâmetros de validação, as aminas 4, 9, 10, 11, 12 e 20 não serão consideradas, pois em um processo de validação de um método considera-se todo o método desenvolvido, desde a separação até o tratamento da amostra. Portanto, como essas aminas ao serem submetidas ao processo de extração sofrem degradação, pode-se dizer que este método não é adequado para determiná-las, em outras palavras, é preciso um estudo de extração cauteloso para essas aminas em particular.

Tabela 3.13: Avaliação da linearidade do método

Aminas	Coeficiente linear $\pm$ EPC*	Coeficiente Angular $\pm$ EPC*	R²	F	EPR**	p	Faixa linear de trabalho ($\mu\text{mol/L}$)
1	0,190 $\pm$ 0.068	5095,2 $\pm$ 273.42	0,991	347,27	0.080	0,00034	50,23 – 409,1
5	-0,023 $\pm$ 0.073	5301,4 $\pm$ 292.90	0,991	327,62	0.085	0,00037	50,42 - 405,5
6	0,107 $\pm$ 0.010	7164,6 $\pm$ 400.66	0,991	319,76	0.115	0,00038	50,43 - 401,9
7	0,110 $\pm$ 0.073	5463,1 $\pm$ 296.25	0,990	340,05	0.085	0,00035	50,54 – 400,2
8	-0,047 $\pm$ 0.083	5641,3 $\pm$ 333.01	0,990	286,97	0.096	0,00045	50,22 - 403,9
15	-0,023 $\pm$ 0.105	7758,2 $\pm$ 427.05	0,991	330,03	0.121	0,00036	50,37 - 396,8
16	0,382 $\pm$ 0.058	6115,3 $\pm$ 232.02	0,996	694,65	0.067	0,00012	50,40 – 403,1
17	0,178 $\pm$ 0.046	3353,8 $\pm$ 183.44	0,991	334,27	0.053	0,00036	50,49 - 406,0
18	0,267 $\pm$ 0.056	3294,4 $\pm$ 226.68	0,990	211,23	0.066	0,00070	50,21 - 403,9
19	0,198 $\pm$ 0.070	3246,7 $\pm$ 288.73	0,980	126,45	0.081	0,00150	50,11 - 395,4

*EPC: erro padrão dos coeficientes

**EPR: erro padrão da regressão

O procedimento para a obtenção dos limites de detecção (LD, do inglês, *limit of detection*) e quantificação (LQ, do inglês, *limit of quantification*) do método foi realizado com adaptações do sugerido pelo INMETRO. Neste caso, autores⁴⁸ sugerem que estes parâmetros sejam obtidos por meio da avaliação da relação sinal ruído (S/N), ou seja, considerando o ruído obtido do branco da amostra processado. Assim, como sugerido pelo INMETRO, 7 brancos da amostra foram processados, ou seja, a matriz têxtil sem tingimento foi submetida ao processo de extração. Os resultados estão ilustrados na Tabela 3.14.

Tabela 3.14: Limites de detecção e quantificação do método.

aminas	LD		LQ	
	mg/L	μmol/L	mg/L	μmol/L
1	0,67	3,63	2,23	12,1
5	0,75	3,49	2,52	11,6
6	0,61	2,67	2,01	8,9
7	0,61	2,90	2,04	9,6
8	1,00	3,92	3,20	13,1
15	0,41	2,43	1,37	8,1
16	0,86	3,20	2,85	10,7
17	1,14	4,52	3,82	15,1
18	1,32	6,70	4,40	22,3
19	1,27	5,64	4,24	18,8

⁴⁸ Skoog, D., Princípios de análise instrumental, 6ª Ed., Editora Bookman.

Segundo o INMETRO, a precisão do método proposto deve ser avaliada por meio da repetitividade e reprodutibilidade. No primeiro caso, sete soluções padrão em dois níveis de concentração contendo as 20 aminas foram preparadas e analisadas uma única vez. A reprodutibilidade pode ser avaliada por meio de diferentes operadores, equipamentos, laboratórios ou as soluções analisadas em diferentes espaços de tempo. Este último foi adotado para avaliar a reprodutibilidade do método.

Neste caso também foram analisadas uma única vez 7 soluções padrão em dois níveis de concentração, em dois dias diferentes. Para ambos os casos, foram avaliadas as áreas de pico. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.15.

Tabela 3.15: Resultados da precisão do método

Aminas	Repetitividade RSD% (n=7)		Reprodutibilidade RSD% (n=7)	
	20 mg/L	50 mg/L	20 mg/L	50 mg/L
1	8,07	4,77	0,44	1,20
5	6,20	5,47	1,22	14,0
6	7,90	4,41	0,23	5,00
7	7,01	4,97	5,49	5,70
8	7,70	5,13	3,42	1,19
15	6,90	4,72	4,75	6,45
16	7,73	4,16	18,2	4,46
17	5,88	4,66	19,2	9,31
18	7,31	5,12	27,6	9,94
19	5,49	4,16	11,6	1,55

Com relação à robustez, esta foi avaliada por meio de um planejamento fatorial com 3 fatores em dois níveis, tendo como resposta a variação da resolução dos pares críticos. A Tabela 3.16 mostra a matriz de planejamento empregada neste estudo. Vale ressaltar que devido à limitação do equipamento de eletroforese capilar, a tensão máxima aplicada foi a mesma da condição otimizada, ou seja, 30 kV. A Figura 3.60 ilustra o eletroferograma da condição otimizada, bem como os pares críticos levados em consideração neste estudo.

Tabela 3.16: Matriz de planejamento do fatorial completo 2^3 para o estudo da robustez.

Fatores	Temperatura (°C)	Tensão (kV)	pH
1	24,5	29,5	2,47
2	25,5	29,5	2,47
3	24,5	30,0	2,47
4	25,5	30,0	2,47
5	24,5	29,5	2,53
6	25,5	29,5	2,53
7	24,5	30,0	2,53
8	25,5	30,0	2,53

Figura 3.60: Eletroferograma da condição otimizada juntamente com os pares críticos avaliados na robustez. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,5 ajustado com ácido fosfórico; V=+30 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; T=25 °C; λ = 200 nm.

A Tabela 3.17 mostra as resoluções dos pares críticos 1, 2 e 3 em todas as condições variadas. Aplicando a ANOVA fator único, as pequenas variações nas resoluções não são estatisticamente diferentes a um nível de confiança de 95%, ou seja, o valor de F encontrado foi maior que o F crítico e o valor de $p < 0,05$. Portanto, pode-se dizer que o método é robusto frente às pequenas variações de temperatura, tensão e pH, com 95% de confiança.

Tabela 3.17: Resultados da robustez do método proposto

Experimento	R _{par 1}	R _{par2}	R _{par3}
1	2.03	1.84	1.83
2	1.80	2.22	2.04
3	1.82	2.06	1.90
4	1.75	2.28	2.05
5	1.35	2.90	2.24
6	1.35	3.04	2.39
7	1.37	3.15	2.32
8	1.33	3.20	2.04
Condição otimizada	1.54	2.65	2.14

Os valores são estatisticamente iguais levando em consideração o $F_{cal} > F_{crítico}$ ($18.71 > 3,4$) e p-valor que deve ser $< 0,05$ ($1.27E-05$).

Na ausência de uma matriz que contenha todos os interferentes possíveis, o INMETRO menciona que é possível submeter um extrato da amostra a condições extremas de calor e/ou luz para avaliar possíveis produtos de degradação e assim avaliar se há co-migração ou não destes produtos com os analitos, ou seja, realizar o teste de especificidade.

Portanto, este procedimento foi realizado, entretanto apenas sob efeito da luz, pois este fator é o mais importante em se tratando de aminas aromáticas. Assim, um extrato de matriz têxtil, que continha as aminas 1 e 8, já armazenado por 3 meses foi descongelado e no mesmo foram adicionados volumes a dar uma concentração final de 30 mg/L de cada uma das aminas que faltavam, ou seja, todas a exceção da 1 e 8. Este foi submetido a luz fluorescente a temperatura ambiente por 20 horas. O resultado deste estudo está ilustrado na Figura 3.59.

Ao se comparar o eletroferograma da Figura 3.61 com o da Figura 3.60 (eletroferograma onde as aminas não foram submetidas a luz fluorescente e armazenadas sob refrigeração), é possível verificar que nenhum pico adicional foi observado no eletroferograma após o extrato ser submetido a luz fluorescente e mantido a temperatura ambiente por 20 horas. Portanto, após realizar o estudo de

especificidade sugerida pelo INMETRO o método 3 proposto é considerado específico.

Figura 3.61: Eletroferograma de um extrato submetido a luz por 20h. dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,5 ajustado com ácido fosfórico; V=+30 kV; injeção 5 s com 50 mbar de pressão; T=25 °C; λ = 200 nm.

A recuperação foi avaliada com o emprego de três amostras sintéticas processadas (matriz têxtil tingida no laboratório com padrões de corantes que liberavam as aminas 1, 7 e 8). Essas amostras foram submetidas ao procedimento de redução da ligação azo dos corantes, seguidas da extração das aminas formadas com ultrassom e SPE com resina de troca catiônica como previamente otimizado.

A recuperação foi determinada considerando a diferença das áreas obtidas das aminas (1, 7 e 8) nas amostras fortificadas e sem fortificar, a qual, foi comparada com a área de um padrão com a mesma concentração que foi submetido às mesmas etapas de extração. Mais detalhes dos corantes empregados estão apresentados na Tabela 3.1 do procedimento experimental.

O INMETRO⁴⁷ não sugere qual a faixa aceitável de recuperação, assim, seguindo outras normas como da AOAC⁴⁹, são aceitas até 115% de recuperação em matrizes complexas, como as de alimentos.

Os resultados da recuperação estão ilustrados na Tabela 3.18. Com relação à amina 1 (benzidina), a recuperação não foi possível, isto é, as áreas de benzidina encontradas foram as mesmas tanto na amostra dopada quanto na amostra sem dopar o analito. Ahlström *et al.* avaliou algumas aminas aromáticas em couro de animal, sendo três delas as avaliadas aqui neste trabalho². Para o autor, essas três aminas apresentaram baixa recuperação na matriz estudada. O autor explica que aminas com dois anéis aromáticos apresentam relativa hidrofobicidade, interagindo mais com a matriz. Entretanto, no nosso estudo, todas as 3 aminas possuem dois anéis aromáticos e somente a amina 1 não apresentou boa recuperação. Com isso, pode-se dizer que as aminas realmente apresentam comportamentos diferentes umas das outras dependendo do tipo de matriz avaliada.

Eskilsson *et al.* descrevem que o contato com o redutor pode afetar a recuperação das aminas⁵⁰. Os autores obtiveram recuperações de até 100% quando não era considerado o redutor no procedimento de extração. Portanto, os autores concluíram que esse agente redutor poderia estar reagindo com as aminas. No caso em específico do estudo da extração descrita nesta tese, o redutor poderia estar reagindo mais com a benzidina, o que está de acordo com o observado por Eskilsson *et al.*⁵⁰.

Tabela 3.18: Recuperação das três aminas analisadas

Aminas	Recuperação (% , n=3)
1	0
7	115 ± 10
8	105 ± 13

a $X \pm t./(n)^{1/2}$; n= número de replicas.

⁴⁹ http://www.aoac.org/News/OMA_18_rev_4.htm

⁵⁰ Eskilsson, C.S.; Davidsson, R.; Mathiasson, L., Harmful azo colorants in leather determination based on their cleavage and extraction of corresponding carcinogenic aromatic amines using modern extraction techniques, J. Chromatogr. A, 955, 2002, 215-227.

3.3. Conclusão do capítulo

Os resultados aqui apresentados provam que o emprego de um capilar convencional e o tampão fosfato em pH baixo requer cuidados rigorosos quanto ao condicionamento do capilar tanto em início de trabalho quanto entre corridas eletroforéticas, fato esse muitas vezes desprezados pelos autores.

E, dos três métodos otimizados, o método 3 de screening das aminas nas matrizes têxteis foi o de escolha levando em consideração a frequência analítica do método. Também, produtos de degradação podem interferir no método 3 proposto, quando em contato com excesso de ditionito, quando corantes específicos são usados.

Com relação à extração, a que apresentou melhor resposta em termos de eficiência de extração das 20 aminas foi a SPE com resina de troca catiônica (ca. 100%).

Algumas figuras de mérito foram obtidas, as quais mostraram-se adequadas para a determinação de 10 aminas das 20 estudadas. Portanto, o método de *screening* por CE-UV proposto nesta tese possui elevada confiabilidade, tanto em termos de repetibilidade da separação quanto em termos de quantificação, para a determinação de 10 aminas aromáticas proibidas pela Diretiva 2002/61/EC.

Capítulo 4

Aplicação do método 3 (CE-UV) na análise de amostras reais e confirmação por LC-MS/MS

4.1. Introdução

Após o desenvolvimento de um método de separação por eletroforese capilar para a determinação das aminas aromáticas proibidas pela Diretiva, é de interesse avaliar se matrizes têxteis comercializadas livremente no mercado local, são tingidas com azo corantes.

Portanto, amostras do mercado local foram avaliadas por CE, pelo método 3, e confirmadas por meio de um método de LC-MS adaptado do método proposto pela própria Diretiva.

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Eletroforese capilar

Os procedimentos com relação ao método 3

BGE: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico.

Condicionamento do capilar

Condicionamento de início de trabalho:

- 10 minutos a 950 mbar com eletrólito de condicionamento (dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L + 12,3 mmol/L de TEA, pH=2.50 ajustado com ácido fosfórico);
- 10 minutos de +30 kV de tensão aplicada

Condicionamento entre corridas

- 1 minuto a 950 mbar com HCl 0,1 mol/L (Synth, 37%)
- 1 minuto a 950 mbar com água ultra pura
- 5 minutos a 950 mbar com BGE de corrida

4.2.2. Método de LC-MS adaptado

Para a análise das amostras obtidas do mercado local, foi empregado um método adaptado da Diretiva 2002/61/EC. O método de LC-MS empregado pela Diretiva de 2002/61/EC, e o adaptado, estão descritos na Tabela 4.1 e, o gradiente empregado está descrito na Tabela 4.2.

Para isso, uma coluna cromatográfica de fase reversa C-18 de dimensões 4,0 μm (150.0 x 3,9 mm), Nova-Pak® C₁₈, Waters, foi usada.

Um espectrômetro de massas com analisador Ion-trap, fonte de íons *electrospray*, marca Bruker, modelo esquire 3000 plus foi empregado. O HPLC usado foi da marca Shimadzu, bombas LC-10AD vp, controladora SLC-10^a vp e injetor automático SIL-10AF.

Os parâmetros de ionização empregados foram: modo positivo, 4,0 kV de voltagem do *spray*; 102,3 V de voltagem do capilar; - 60 V de voltagem das lentes e temperatura de dessolvatação de 320 °C. O nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação a uma vazão de 27 psi. Os fragmentos foram obtidos no modo full scan em um tempo de fragmentação de 40000 μs .

Tabela 4.1: Condições do LC-MS empregadas pela Diretiva de 2002/61/EC e adaptadas

Metodo da Diretiva	Método adaptado
Eluente 1: 100% ACN	Eluente 1: 100% ACN
Eluente 2: 5 mmol/L de acetato de amônio, pH=3,0	Eluente 2: 5 mmol/L de formato de amônio, pH=3,0
Coluna de fase reversa C-18 de 5 cm	Coluna de fase reversa C-18 de 15 cm
Temperatura: 40 °C	Temperatura: 20 °C
Detecção: MS - quadrupolo/íon-trap	Detecção: MS - íon-trap

Tabela 4.2: Gradiente usado pelo método adaptado da Diretiva de 2002/61/EC

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	5 mmol/L formato de amônio	ACN (ácido fórmico (0,1% v/v))
0	1	95	5
10	1	90	10
15	1	80	20
25	1	70	30
30	1	0	100
39	1	0	100
42	1	95	5
50	1	95	5

4.2.3. Procedimento adotado para a extração das amostras reais

- **Redução da ligação N=N:** matriz têxtil (ca. 1 g) foi colocado em frascos de amostra de polipropileno e a adição de um volume de 17 mL de um tampão citrato (60 mmol/L, pH=6,0) previamente aquecido a uma temperatura de 70 °C . Os frascos foram fechados e rapidamente agitados (manualmente) vigorosamente. Em seguida, os mesmos permaneceram em um banho de água a uma temperatura de 70 °C por um período de 30 minutos. Subseqüentemente, 3 mL da solução do redutor ditonito de sódio 200 mg/mL e uma nova agitação manual foi realizada por mais 2 minutos. A solução juntamente com o tecido permaneceu por mais 30 minutos no banho de água a uma temperatura de 70 °C.

- **Extração das aminas com ultrassom**

A solução resultante da redução do corante foi reservada. À matriz têxtil, foi adicionado 16 mL de HCl 1 mol/L (volume de ácido para 1g de matriz têxtil) e submetida ao banho de ultrassom por 5 minutos a uma T 52 °C para a completa extração das aminas. Esse procedimento foi repetido três vezes. O extrato resultante foi adicionado à solução reservada da redução do corante e filtrado.

- **Com resinas de fase ligada de troca iônica**

O procedimento de extração empregando a coluna comercial foi o sugerido pelo fabricante¹. Para a ativação das fases, o cartucho foi condicionado com 7 mL de metanol 100% seguidos de 7 mL de água acidificada com HCl (1mol/L) a pH=4,0. Para a extração, o pH de um volume de 5 mL de uma mistura de das 20 aminas a uma concentração de 30 mg/L cada foi ajustado para ca. 1,5 para garantir que todas as aminas estivessem protonadas. No caso da amostra, o pH do extrato, resultante da extração com ultrassom, já estava na ordem de 1,0.

Os 5 mL da solução contendo as 20 aminas foram submetidos à extração por SPE a uma vazão de 60 gotas/min, seguida de uma etapa de lavagem HCl 0,1 mol/L e secagem da resina por 5 min em alto vácuo. A eluição das aminas foi feita sob gravidade (ou baixo vácuo) com 5 mL de NH₄OH 5% (v/v) em metanol. Esse volume foi evaporado até um volume de 2 mL e analisado por meio do método 3.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Avaliação das amostras reais pelo método 3 – CE-UV.

Algumas matrizes têxteis 100% algodão obtidas do mercado local (estampadas ou tingidas com apenas um corante) foram avaliadas.

A presença de corante azo nessas matrizes têxteis avaliadas pode ser visualizada pela mudança de cor durante a etapa de redução da ligação N=N, presente neste tipo de corante, como previamente mencionado.

Um total de 7 amostras foi investigado. As imagens das amostras estudadas estão ilustradas na Figura 4.1. Das 7 amostras, apenas 2 (amostras 1 e 3) descoloraram na etapa de redução (procedimento 2), ilustrado na Figura 4.2.

¹ Procedimento SPE – Alcrom

Figura 4.1: Imagem das amostras têxteis avaliadas, obtidas do mercado local.

Figura 4.2: Imagem das amostras 1 e 3 antes e após o processo de redução com ditionito de sódio (detalhes no procedimento experimental, item 4.2.3).

Os produtos de degradação dos corantes azo são aminas que em condições de pH baixo estão na forma protonada. A observação de produtos de degradação fisicamente coloridos, evidencia uma possível presença de azo corantes. Esta constatação é notada no experimento de SPE, se estiverem presentes na amostra. Baseado neste experimento, as amostras 1 e 3 provavelmente contêm aminas aromáticas (Figura 4.3).

Figura 4.3: Imagem da extração em fase sólida. (A) amostra 1; (B) amostra 2 e (C) amostra 3.

A comprovação da presença de compostos catiônicos é notada após avaliação dos extratos pelo método 3, desenvolvido em eletroforese capilar. Os eletroferogramas das amostras 1 a 7 estão ilustrados nas Figuras 4.4 à 4.10, respectivamente.

Figura 4.4: Eletroferograma da amostra 1 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

Figura 4.5: Eletroferograma da amostra 2 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

Figura 4.6: Eletroferograma da amostra 3 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

Figura 4.7: Eletroferograma da amostra 4 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

Figura 4.8: Eletroferograma da amostra 5 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

Figura 4.9: Eletroferograma da amostra 6 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

Figura 4.10: Eletroferograma da amostra 7 obtida do comércio local. Condições: dihidrogenofosfato de sódio 70 mmol/L, pH=2,50 ajustado com ácido fosfórico; V= +30kV; T=25 °C; 5 s de injeção a 50mbar de pressão; capilar: Ltot=60 cm; λ = 200 nm.

A pureza de cada pico registrado nos eletroferogramas das amostras 1 e 3 foi avaliada. Os resultados estão ilustrados nas Tabelas 4.3 e 4.4 para as amostras 1 e 3, respectivamente.

Tabela 4.3: Avaliação da pureza de pico dos picos encontrados na amostra1.

	Amostra 1								
	Picos								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Fator de pureza de pico (fpp)	NP	NP	993,38	NP	1000	944,86	904,40	935,46	931,24
threshold	-	-	984,50	-	636,40	820,76	633,55	790,15	841,17

Quando o valor do fpp for maior que “threshold”, o pico apresenta elevada probabilidade de ser puro.

Tabela 4.4: Avaliação da pureza de pico dos picos encontrados na amostra 3

	Amostra 3				
	picos				
	A	B	C	D	E
Fator de pureza de pico	597,10	980,48	730,33	NP	NP
threshold	26,500	855,18	126,76	-	-

Quando o valor do fpp for maior que “threshold”, o pico apresenta elevada probabilidade de ser puro.

Os resultados indicaram uma baixa probabilidade de pureza de pico para os picos A, B e D da amostra 1. Para a amostra 3, semelhantemente os picos D e E tiveram baixa probabilidade de pureza de pico.

Os espectros dos picos considerados puros nas amostras 1 e 3 podem ser comparados com os respectivos espectros de padrões individuais das 20 aminas aromáticas, presentes em uma biblioteca de espectros. Devido às semelhanças entre os picos dos espectros da amostra com os dos padrões, a biblioteca sugeriu a presença de algumas aminas proibidas.

As aminas sugeridas para cada pico das amostras 1 e 3 estão discriminadas nas Tabelas 4.5 e 4.6, respectivamente.

Tabela 4.5: Relação de picos encontrados na amostra 1 e as respectivas aminas sugeridas pela biblioteca de espectros.

Picos	Aminas sugeridas
C	7 e 8
E	1,7 e 15
F	1, 7 e 15
G	1,7,e 15
H	1,7,e 15
I	7,8 e 15

Tabela 4.6: Relação de picos encontrados na amostra 3 e as respectivas aminas sugeridas pela biblioteca de espectros.

Picos	Aminas sugeridas
A	4 e 5
B	7 e 8
C	7, 8 e 12

Considerando o perfil de espectro UV, a biblioteca de espectros sugere que os picos E até H da amostra 1 são as mesmas aminas (1, 7 ou 15). Porém, ao compararmos os tempos de migração das soluções padrão das aminas 1, 7 e 15 (cerca 4; 4,5 e 6,0 min, respectivamente), com os dos picos E até H (Figura 4.4), não se verifica correspondência, com exceção do pico E, que apresenta um tempo de migração muito próximo ao da amina 15. Logo, é possível inferir que os demais picos (F, G, H e I) não representam aminas proibidas pela Diretiva de 2002/61/EC. Além disso, neste intervalo de corrida eletroforética não se encontra qualquer amina no método otimizado. A biblioteca de espectros sugere que o pico C da amostra 1 possa ser a amina 7 ou 8. Porém, após uma observação entre o espectro (Figura 4.11) e o tempo de migração desse pico, verifica-se mais semelhança com a amina 7 que com a 8.

Figura 4.11: Espectro do pico C da amostra 1 e espectro da amina 7. $\lambda = 200$ nm.

Tratando da amostra 3, o pico A apresenta tempo de migração e espectro UV-vis compatível com os respectivos dados da amina 5 (Figura 4.12). Considerando a mesma justificativa, o pico B poderia ser a amina 7 (Figura 4.13).

O espectro não foi conclusivo com relação ao pico C, portanto apenas o tempo de migração foi considerado. De acordo com o resultado, é possível que o pico C refira-se à amina 12.

Figura 4.12: (A) Espectro do pico A da amostra 3; (B) espectro de uma solução padrão da amina 5.

Figura 4.13: Espectro do pico B da amostra 3 e espectro da solução padrão da amina 7.

4.3.2. Método de LC-MS/MS adaptado da Diretiva 2002/61/EC e avaliação da presença das aminas proibidas nas amostras 1 e 3

De todas as amostras analisadas por CE, apenas as amostras que apresentaram suspeitas da presença de aminas aromáticas é que foram analisadas por meio de um método confirmatório por LC-MS/MS, descrito no procedimento experimental, item 4.2.2.

Soluções padrão das aminas (5, 7, 12 e 15) supostamente presentes nas amostras 1 e 3, foram primeiramente analisadas pelo método de LC-MS/MS. Os cromatogramas e os fragmentos dos íons precursores de relação m/z 217, 213, 144 e 170 correspondentes a essas aminas referentes a solução padrão de cada uma delas, estão ilustrados nas Figuras 4.14 à 4.17.

O cromatograma de íons totais e os espectros de MS/MS dos fragmentos dos íons precursores referentes às amostras 1 e 3 estão ilustrados nas Figuras 4.19 e 4.20.

Figura 4.15: Cromatograma de íons totais e espectro de massa do fragmento referente ao íon precursor de m/z 217 de uma solução padrão de 5 mg/L referente a amina 5. Condições experimentais vide procedimento experimental, item 4.2.2.

Figura 4.16: Cromatograma de íons totais e espectro de massa do fragmento referente ao íon precursor de m/z 213 de uma solução padrão de 5 mg/L da amina 7. Condições experimentais vide procedimento experimental, item 4.2.2.

Figura 4.17: Cromatograma de íons totais e espectro de massa do fragmento referente ao íon precursor de m/z 144 de uma solução padrão de 5 mg/L da amina 15. Condições experimentais vide procedimento experimental, item 4.2.2.

Figura 4.18: Cromatograma de íons totais e espectro de massa do fragmento referente ao íon precursor de m/z 170 de uma solução padrão de 5 mg/L da amina 15. Condições experimentais vide procedimento experimental, item 4.2.2.

Figura 4.19: Cromatograma de íons totais da amostra 1 e os espectros de massa dos fragmentos referentes aos íons precursores de relação m/z 213 (A); m/z 217 (B) e m/z 170 (C). Condições experimentais vide procedimento experimental, item 4.2.2.

Figura 4.20: Cromatograma de íons totais da amostra 3 e os espectros de massa dos fragmentos referentes aos íons precursores de relação m/z 213 (A); m/z 144 (B) e m/z 217 (C). Condições experimentais vide procedimento experimental, item 4.2.2.

Os espectros de massa dos fragmentos das soluções padrão de cada uma das aminas (5, 7, 12 e 15) foram comparados com os espectros de massa dos mesmos fragmentos obtidos nas amostras 1 e 3. Os resultados mostram que os fragmentos (m/z 195 e m/z 152,7) referentes aos íons precursores de m/z 213 e 170 confirmam a presença das aminas 7 e 15 na amostra 1 apesar de os tempos de retenção não serem correspondentes. Por outro lado, para a amostra 3, nenhum fragmento encontrado na amostra foi compatível com os apresentados nos padrões (Figuras 4.14 à 4.17). Os fragmentos encontrados referentes aos

íons precursores das aminas 5, 7, 12 e 15 estão de acordo com o apresentado por Lavandeira-García *et al.*².

Portanto, com os resultados de espectros MS² apresentados para as amostras 1 e 3, pode-se concluir que de todas as 20 aminas proibidas pela Diretiva de 2002/61/EC, foi confirmada a presença das aminas 7 e 15 na amostra 1, porém, para a amostra 3 nenhuma amina sugerida pela biblioteca de espectros foi confirmada pelo método confirmatório LC-MS/MS. Portanto a concentração dessas duas aminas foi determinada pelo método 3 de eletroforese capilar com detecção UV-vis, e os resultados estão ilustrados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Concentração das aminas encontradas na amostra 1 em mg/g de matriz têxtil, (n=3).

Aminas	Amostra 1
	Concentração (mg/g) ^a
5	NE
7	59 ± 12
15	< LQ

NE: não encontrado

^a $\bar{X} \pm t \cdot \sigma / (n)^{1/2}$; n= número de replicas de amostras

Os valores de concentração encontrados para a amina 7 apresentaram concordância entre si com 95% segundo o teste *t*.

A concentração da amina 7 na amostra 1 ultrapassou o permitido pela Diretiva 2002/61/EC, ou seja, a quantidade de amina no tecido superou os 30 mg/Kg.

² Lavandeira-García, J.; Petinal-Salgado, C., A sensitive and efficient procedure for the high throughput determination of banned aromatic amines in textiles and leather products aided by advanced sample composition, *Anal. Bioanal. Chem.* v.397, p.751-763, **2010**.

4.4. Conclusão do capítulo

Por meio dos estudos realizados foi possível confirmar a presença das aminas 7 e 15 na amostra 1, considerando os tempos de migração, espectros UV-vis e os fragmentos do respectivo íon molecular de m/z 213 e 170. A concentração da amina 7 na amostra 1 superou o limite aceito pela Diretiva 2002/61/EC. Portanto, é possível concluir que produtos têxteis contendo azo corantes, os quais são proibidos pela União Européia, estão sendo comercializados livremente no comércio local sem qualquer inspeção.

Conclusões Finais

A separação do maior número de aminas aromáticas se deu em pH 2,50, como sugerido pelo simulador por meio dos valores de pK_a e mobilidades iônicas determinadas por curvas de mobilidade efetiva em função do pH. Entretanto nenhum dos métodos testados apresentou-se capaz de separar todas as aminas em linha de base.

Os estudos mostraram que um condicionamento de início de trabalho, bem como entre réplicas foi de extrema importância para atingir baixos coeficientes de variação dos tempos de migração dos analitos estudados. Ainda, a medida do fluxo via marcas térmicas foi importante para provar as variações de fluxo presentes no capilar e assim auxiliar no estudo dos condicionamentos.

Com relação à extração das aminas da matriz têxtil com ácido clorídrico (0,77 mol/L) a quente (52 °C) em ultrassom (5 min), esta apresentou-se adequada para as aminas 7 e 8. Também, a extração em fase sólida com troca catiônica apresentou-se satisfatória com bons resultados de recuperação para todos os analitos avaliados.

Com relação aos parâmetros de validação, estes se apresentaram adequados, para a metade das aminas, ou seja, todas as aminas a exceção das 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 20. Os LD e LQ obtidos atenderam às exigências da Comunidade Européia, ou seja, permitida uma concentração menor que 30 mg de aminas aromáticas por kg de matriz têxtil.

Ainda, as amostras reais analisadas por CE e confirmadas por meio de um método de LC-MS/MS, adaptado da Diretiva 2002/61/EC, mostraram que o comércio popular emprega corantes azo para o tingimento de matriz têxtil de algodão.

E por fim, o método de *screening* por CE-UV, proposto nesta tese, possui elevada confiabilidade tanto em termos de repetibilidade da separação das aminas avaliadas quanto em termos de quantificação. Por esse motivo, o método desenvolvido atende as necessidades da Associação Brasileira das Indústrias Têxteis (ABIT), isto é, a busca por um método de *screening* para avaliação de matrizes têxteis destinados à exportação.

Perspectivas

O desenvolvimento deste projeto de pesquisa abriu caminhos para novas investigações experimentais. Uma destas investigações é a possibilidade de estudo de um procedimento de extração para as aminas aromáticas proibidas pela Diretiva 2002/61/EC; uma vez que o estudo de um procedimento de extração (com resultados satisfatórios) foi realizado para a o-tolidina (3,3'-dimetilbenzidina) e a 3,3'-dimethoxybenzidina, ambas extraídas de matriz de celulose.

Pelo fato de somente a matriz de celulose (100% algodão) ter sido empregada neste estudo, outra perspectiva a ser investigada é o estudo de procedimentos experimentais para matrizes têxteis, tais como, a poliamida, viscose, nylon, acrílico e de matrizes de composições variadas.

Na parte instrumental, um método por CE-MS poderia ser desenvolvido visando resultados de confirmação estrutural dessas aminas em matrizes têxteis.