UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

FERNANDO SILVA LOPES

**Hifenização da eletroforese capilar com
sistema eletroquímico em fluxo:
Desenvolvimento de instrumentação para
a determinação de íons metálicos com
pré-concentração eletroquímica e para o
estudo da oxidação de alcoóis**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data de Depósito na SPG

30/07/2014

FERNANDO SILVA LOPES

**Hifenização da eletroforese capilar com
sistema eletroquímico em fluxo:
Desenvolvimento de instrumentação para
a determinação de íons metálicos com pré-
concentração eletroquímica e para o
estudo da oxidação de alcoóis**

Tese de doutorado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos necessários para obtenção
do Título de Doutor em Ciências (Química).

Orientador: Prof Dr. Ivano G. R. Gutz

São Paulo

Julho de 2014

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

L864h Lopes, Fernando Silva
Hifenização da eletroforese capilar com sistema eletroquímico em fluxo: desenvolvimento de instrumentação para a determinação de íons metálicos com pré-concentração eletroquímica e para o estudo da oxidação de alcoóis / Fernando Silva Lopes. -- São Paulo, 2014. 161p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Gutz, Ivano Gebhardt Rolf

1. Métodos instrumentais : Análise química I. T. II. Gutz, Ivano Gebhardt Rolf, orientador.

543.08 CDD

Dedico esta tese

À minha família.

Vocês sabem o quanto lutamos.

Ao amigo e orientador Ivano Gutz.

**Sem seu apoio e empenho, este trabalho não
seria possível.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar aqui registrado o enorme apreço aos amigos Lúcio e Claudimir, pelas discussões, ensinamentos e também pelo apoio dado para a realização desta tese.

Agradeço a todos os colegas de laboratório e do IQ.

Aprendi muito com todos vocês, espero um dia poder retribuir.

Agradeço ao CNPq, por ter financiado o projeto desenvolvido e ao Instituto de Química - USP por ter permitido a realização de minha pós-graduação.

RESUMO

Lopes, F.S. **Hifenização da eletroforese capilar com sistema eletroquímico em fluxo: Desenvolvimento de instrumentação para a determinação de íons metálicos com pré-concentração eletroquímica e para o estudo da oxidação de alcoóis.** 2014. **161p.** Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um sistema completo foi desenvolvido para o novo acoplamento de uma célula eletroquímica em fluxo com um eletroforese capilar equipado com detector condutométrico sem contato (EC-CE-C⁴D). Este acoplamento compreendeu o design da interface EC-CE, um potenciostato protegido contra fuga de alta tensão, subsistema de controle de fluxo por bombas solenóide e um equipamento CE-C⁴D adaptado para a aplicação. Um software dedicado para aquisição de dados, controle e operação do sistema foi desenvolvido na ferramenta gráfica de programação LabView.

O sistema foi inicialmente aplicado na eletrodeposição de traços dos metais Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ e Tl⁺, seguida pela redissolução e separação destes por CE, o que resultou em fator de pré-concentração de até 55 vezes para todos os metais, exceto Zn²⁺. Os metais acumulados foram redissolvidos na matriz original da amostra para permitir a separação e determinação conjunta com cátions majoritários (p. ex. alcalinos e alcalinos terrosos e amônio, se acima do LD). Para amostras cuja matriz possa causar interferência, pouco antes da injeção no CE, foi realizado processo de cleanup pela redissolução dos metais no eletrólito de separação. Experimentos pra separação bidimensional com o potencial de deposição ou redissolução voltamétrica como primeira dimensão e o tempo de eletromigração como segunda dimensão foram propostos e demonstrados.

A oxidação eletroquímica de espécies orgânicas na interface EC-CE surgiu como um segundo campo de aplicação para: a) derivatização de analitos neutros tornando-os carregados ou ionizáveis, p. ex., conversão de álcoois alifáticos de cadeia curta em carboxilatos que possam ser separados e quantificados por CE-C⁴D; b) investigação/monitoramento de processos de eletrodo pela detecção de produtos carregados ou ionizáveis de reação de eletrodo, p. ex., investigação de condições experimentais para eletrooxidação de glicerol objetivando-se a síntese de produtos com maior valor comercial.

Palavras-chave: eletroforese capilar, eletroanalítica, tratamento de amostras, determinação de metais, oxidação de alcoóis, instrumentação.

ABSTRACT

Lopes, F.S. **Hyphenation of capillary electrophoresis with an electrochemical flow system: Development of Instrumentation aiming metallic ions determination by electrochemical preconcentration and study of alcohols oxidation.** 2014. **161p.** PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A complete instrumental system was developed for the new coupling of an electrochemical flow cell to capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (EC-CE-C⁴D) and comprising an innovative design of the EC-CE interface, a potentiostat circuit protected from high voltage leakages, a solenoid pump based flow management subsystem, and a CE-C⁴D equipment tailored for this application. Dedicated software for data acquisition, devices control and operation automation was developed in LabVIEW graphical programming tool.

The system was first applied to the electrodeposition of traces of Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Tl⁺, followed by stripping and separation by CE, allowing a 55-fold preconcentration factor in 6 min for all metals but Zn²⁺. The accumulated metals were stripped into the original sample matrix to allow their separation together with the sample's major cations (e.g. alkaline and alkaline earth metals and ammonium, if above LOQ). For samples with a matrix that originates interferences, cleanup was achieved by stripping the metals into background electrolyte shortly before injection in the capillary. Two-dimensional separations with voltammetric deposition or stripping potential as one dimension and electromigration time as the second one were proposed and demonstrated.

Electrochemical oxidation of organic species in the EC-CE interface emerged as a second field of application for: a) derivatization of neutral analytes into charged or ionizable species, e.g., conversion of short chain aliphatic alcohols into carboxylates that can be determined by CE-C⁴D; b) investigation/monitoring of electrode processes by detection of charged or ionizable reaction products of electrode reactions, e.g., investigation of experimental conditions for glycerol electro-oxidation aiming the synthesis of commercially valuable products.

Keywords: capillary electrophoresis, electroanalysis, sample treatment, metals determination, alcohols oxidation, instrumentation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASV – Voltametria de Redissolução Anódica (*Anodic Stripping Voltammetry*)

BGE – Eletrólito de Separação Eletroforética (*BackGround Electrolyte*)

CE – Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

C⁴D – Detecção Condutométrica sem Contato (*Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*)

CG – Cromatografia Gasosa

CMC – Concentração Micelar Crítica

CSV – Voltametria de Redissolução Catódica (*Cathodic Stripping Voltammetry*)

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio (*Cetyl TrimethylAmmonium Bromide*)

DEMS – Espectrometria de Massa Eletroquímica Diferencial (*Differential Electrochemical Mass Spectroscopy*)

EC – Eletroquímica (*ElectroChemical*)

EOF – Fluxo Eletroosmótico (*ElectroOsmotic Flow*)

FA – Análise em Fluxo (*Flow Analysis*)

HIBA – Ácido 2 – Hidroxi-Isobutírico (*2-hydroxyisobutyric acid*)

His – Histidina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MECK – Cromatografia Eletrocinética Micelar (*Micellar Electrokinetic Chromatography*)

MES – Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfônico

PP – Bomba de Pressão (*Pressure Pump*)

SPE – Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Micro Extração em fase sólida (*Solid Phase MicroExtraction*)

TOF-MS – Espectrômetro de Massas por Tempo de Voo (*Time-of-Flight Mass Spectrometry*)

VP – Bomba de Vácuo (*Vacuum Pump*)

WE – Eletrodo de Trabalho (*Working Electrode*)

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1. Eletroforese Capilar	13
1.2. Determinação de metais por CE.....	16
1.3. Determinação de ácidos carboxílicos por CE	19
1.4. Separação de espécies neutras em CE.....	22
1.5. Tratamento de amostras visando separações por CE	23
1.6 Hifenção de célula eletroquímica.....	26
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 introdução	31
3.2 Reagentes, soluções e amostras.....	32
3.3 Equipamentos.....	33
3.4 Bombas propulsoras	34
3.5 Dispositivos de controle e aquisição de dados	37
3.6 Programas e ferramenta de programação	38
4 DESENVOLVIMENTO, TESTES INICIAIS E APRIMORAMENTO DO SISTEMA EC-CE-C ⁴ D	39
4.1 Introdução.....	39
4.2 Hardware: Desenvolvimento e avaliação.....	39
4.2.1 Célula eletroquímica.....	39
4.2.2 Implementação e avaliação de sistemas de propulsão de fluidos.....	42
4.2.3 Potenciostato	47
4.2.4 Avaliação do sistema em aplicações FIA	52
4.2.5 Acoplamento FA-EC-CE-C ⁴ D.....	57

4.3 Software	63
4.4 Aprimoramento do sistema	67
5 Pré-concentração eletroquímica seguida de separação eletroforética dos metais	80
5.1 Introdução	80
5.2 Avaliação do comportamento voltamétrico de metais	82
5.3 Avaliação do comportamento eletroforético dos metais	87
5.4 Pré-concentração seguida de separação por CE.....	94
6 Aplicação do sistema EC-CE-C ⁴ D em processos de oxidação de álcoois.....	118
6.1 Introdução	118
6.2 Estudos de avaliação da queda ôhmica para correção de potencial.....	124
6.3. Aplicação do sistema em processos de oxidação de álcoois.....	130
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	146
8 REFERÊNCIAS	153

1 INTRODUÇÃO

1.1. Eletroforese Capilar

A utilização de tubos capilares permitiu que a já conhecida técnica de eletroforese [1, 2] obtivesse avanço significativo em aplicações analíticas nas últimas décadas [3-5]. Devido à melhor dissipação de calor decorrente do efeito Joule, o movimento convectivo no interior do capilar, causador de alargamento de bandas, foi drasticamente reduzido, possibilitando trabalhar com campo elétrico mais elevado que o usual na modalidade em papel ou filme de gel. Para capilares com diâmetro interno de no máximo 100 μm e comprimentos que variam de 40 a 100 cm, tornou-se comum a aplicação de potenciais na faixa de 10 a 30 kV entre os extremos do capilar. Isto possibilitou à Eletroforese Capilar (CE) a obtenção de separações com eficiência até então inigualável por técnicas em fase líquida [6, 7] e resultou também em tempo de análise reduzido quando comparada aos métodos cromatográficos de análise.

É importante notar, porém, que a estratégia que possibilitou que a eletroforese competisse com técnicas como HPLC, também introduziu limitações. O menor volume de amostra introduzido no capilar (alguns nanolitros) resulta, comparativamente, em limites de detecção mais elevados, quando expressos em concentração (tipicamente de 0,5 a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), insuficientes para aplicações, por exemplo, no acompanhamento de metais pesados no ambiente ou em alimentos.

Para detecção por técnicas espectrofotométricas de absorção, por exemplo, o caminho óptico de um capilar tipicamente utilizado em CE (50 μm) é 100 a 200 vezes menor que o das cubetas em fluxo usuais em detectores UV para HPLC, implicando em grande perda de detectabilidade. Já os detectores eletroquímicos, via de regra, são menos penalizados que os de absorção no UV-Vis pela elevação dos limites de detecção em CE quando comparados aos obtidos em HPLC, mas o elevado campo elétrico em CE pode causar séria interferência e tornar a aplicação destes detectores uma tarefa laboriosa. Em alguns casos há de se recorrer ao uso de estratégias para o desacoplamento elétrico entre a alta tensão do sistema eletroforético e o potencial aplicado ao circuito de detecção. Exceção seja feita apenas ao detector de condutividade sem contato desenvolvido por do Lago e colaboradores [8-11], cujos eletrodos não entram em contato com a solução no interior do capilar. O melhoramento dos limites de detecção das técnicas instrumentais [9, 12, 13] compatíveis com a CE, assim como a introdução de métodos de pré-concentração ou concentração no próprio capilar [14-17] constituem, por isso, campos ativos de pesquisa.

Um fator adicional a ser considerado em CE refere-se à desprotonação dos grupos silanol na superfície do capilar de sílica. O pK_a médio destes grupos é de 5,9 e, quanto maior a fração desprotonada, mais extensiva a adsorção de cátions em sua dupla camada elétrica [5, 18, 19], eventualmente desidratados do lado mais próximo ao silanol. Íons hidratados são também atraídos pela superfície do capilar, estes se posicionam em distância definida por seus raios iônicos e apresentam menor interação com o capilar. A concentração destes íons decresce da parede do capilar (camada compacta) em direção ao centro da coluna de separação passando

por uma camada difusa até que a concentração das espécies catiônicas seja igual à concentração destas espécies no seio da solução. Quando o potencial de separação é estabelecido, parte dos íons sobre a superfície do capilar (íons posicionados na camada difusa) inicia processo de migração, arrastando consigo moléculas de água. O ponto onde os íons iniciam o processo de migração é definido como plano de cisalhamento e o processo como um todo é denominado como Fluxo Eletrosmótico (EOF) [5, 18, 20]. O resultado é o bombeamento da solução como um todo, o que acaba por influenciar a movimentação não apenas de espécies neutras no interior do capilar, mas também proporciona maior velocidade a espécies que migram no mesmo sentido do fluxo enquanto espécies que migram em sentido contrário têm suas velocidades reduzidas ou mesmo são arrastadas (velocidade negativa) pelo EOF.

Devido à adsorção de espécies catiônicas na superfície negativa do capilar, o sentido natural de migração do EOF é em direção ao cátodo. Isto, porém, pode ser alterado pela adição de surfactantes catiônicos ao eletrólito de corrida [21] ou por meio do condicionamento preliminar do capilar com polieletrólito catiônico [22, 23]. Estes compostos, denominados de inversores de EOF, se ligam à superfície negativa do capilar e permanecem imóveis durante a separação (exceção feita à pequena parcela de moléculas do surfactante que desorve do capilar e migra em seu interior). Desta forma, a superfície interna do capilar passa a ser formada por cargas positivas, favorecendo então a formação de uma camada móvel não mais compostas por íons [24] positivos, mas sim pelas espécies negativas que adsorvem no inversor de EOF. Assim, ao migrarem para o ânodo, os íons negativos ligados

fracamente ao inversor arrastam também moléculas de água e promovem o bombeamento no sentido inverso ao verificado sem a utilização do inversor.

No que diz respeito às aplicações, a modalidade de separação mais simples para implementação, denominada de eletroforese em zona (CZE) ou em solução livre (FSCE ou, simplesmente, CE) [25, 26], permite a determinação de espécies catiônicas ou aniônicas, tanto inorgânicas como orgânicas [24] [27, 28].

1.2. Determinação de metais por CE

Cátions inorgânicos como metais alcalinos, alcalino-terrosos, metais de transição ou mesmos íons de terras raras são passíveis de determinação por CE, sendo possível também a detecção destes pelo uso de detectores eletroquímicos como, por exemplo, a detecção condutométrica sem contato (C^4D , do inglês *capacitively coupled contactless conductivity detection*). Há de se considerar, porém, que o UV-Vis é o detector disponível na maioria dos equipamentos comercializados e que muitos cátions de metais não apresentam sinal para este tipo de detector, sendo a detecção então realizada pelo uso de um cromóforo catiônico no eletrólito de corrida e utilização de detecção denominada de indireta. Neste tipo de detecção, durante a corrida, o cromóforo é parcialmente substituído pelos íons do analito, isto resulta em uma região com menor absorbância e possibilita que a medida do analito seja realizada pela redução no sinal de absorbância, ou de forma indireta, o que resulta em pico invertido no eletroferograma registrado. Anéis aromáticos como o imidazol fazem parte da lista de cromóforos comumente utilizados para a

determinação de espécies catiônicas; já para ânions que não absorvem radiação UV, é comum o uso dos íons cromato, ftalato ou dinitrobenzoato.

Quanto à eficiência da separação por CE, muitos desses cátions hidratados possuem valor de mobilidade eletroforética semelhante [29] e comigram. Por meio de tabelas de condutância iônica molar limite é possível se estimar o valor de mobilidade eletroforética de uma espécie, bastando-se multiplicar o valor de condutância pela constante de Faraday. Assim, é possível então prever o resultado de um eletroferograma [29] e trabalhar em alternativas para resolver possíveis sobreposições de picos. Neste contexto, é comum a adição de aditivos ao eletrólito de corrida visando à alteração da mobilidade do analito para melhorar a separação das espécies, por exemplo, para íons metálicos, recorre-se a agentes complexantes. O amino ácido histidina (pK_a 2,0, 6,0 e 9,3) é um dos componentes frequentes em soluções tampão de $pH \sim 6$ pois, além de promover o efeito tampão do meio (tampão His/HHis⁺), é um bom ligante para alguns íons metálicos. Outra espécie de grande aplicabilidade é o ácido 2-hidroxi-isobutírico, mais conhecido como HIBA. Chen e colaboradores utilizam este complexante em determinação que engloba a separação simultânea de até 27 cátions e complexos metálicos, dentre estes, metais alcalinos, alcalino-terrosos, metais de transição e íons de terras raras [30].

Os exemplos acima citados são aplicações envolvendo a formação de complexos lábeis com metais. Para estes casos deve-se levar em conta que o processo de formação e dissociação do complexo é uma etapa dinâmica, sendo que a mobilidade do íon dependerá então da mobilidade iônica do íon livre em solução, da mobilidade do complexo metálico e da fração do íon que se encontra complexada na concentração de ligante livre observada ao longo do percurso no capilar [31].

Assim, o fato é que a mobilidade de espécies que formam complexo com o aditivo será influenciada tanto pela constante de formação do complexo metal ligante (também dependente do pH do meio e do íon metálico) quanto pela concentração do ligante em solução. Há de se considerar ainda que, dependendo da concentração do complexante em solução, alguns metais podem formar, em concentrações apreciáveis, espécies com mais de um ligante em sua esfera de coordenação, o que levaria então a formação de espécies com carga não necessariamente positiva, tendo assim os íons sua mobilidade drasticamente alterada. Com isso, é possível compreender que a mobilidade do metal não coincidirá com o valor de mobilidade iônica limite do íon hidratado, mas terá um novo valor, sendo este então definido como mobilidade eletroforética efetiva da espécie, ou seja, a mobilidade observada durante uma separação e que leva em conta a força iônica do meio e todos os equilíbrios químicos envolvidos.

O uso de ligantes em CE visa não apenas a obtenção de melhor separação de íons metálicos. Como a velocidade do íon (complexo ou quelato) no interior do capilar é função também da estabilidade metal/ligante, por meio de alguns experimentos, é possível também a obtenção de dados de constante de formação destas espécies.

Os exemplos acima citados dão apenas uma noção da amplitude de alternativas possíveis para a separação de metais, mostrando como a química de coordenação pode ser aproveitada para promover a alteração diferenciada da mobilidade de complexos de metais pela seleção do tipo e concentração do complexante. Pode-se ainda optar-se pelo ajuste de seletividade de um ligante por meio da alteração de pH.

1.3. Determinação de ácidos carboxílicos por CE

A dependência do valor mobilidade eletroforética de ácidos fracos com o pH é amplamente utilizada como estratégia para aumento de seletividade durante a separação destas espécies por CE [32]. Para melhor entendimento desta afirmação, consideremos a separação de um ácido como o acético. Este possui apenas um grupo ácido com pKa de 4,756. Caso seja realizado uma corrida eletroforética deste ácido em solução tampão com pH igual ao seu pKa, o equilíbrio se estabelecerá de forma a manter sempre metade da espécie na forma molecular, e metade desta na forma iônica. Nesta condição, a concentração da espécie aniônica ($\mu_e = -42,4 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ — a diluição infinita) torna-se igual à da espécie molecular ($\mu_e = 0$). Sendo este um equilíbrio dinâmico (rápido), todo o analito migrará no interior do capilar com mobilidade igual à metade da mobilidade eletroforética do íon acetato, sendo a mobilidade definida então como mobilidade eletroforética efetiva do ácido fraco em um dado pH. Esta é a condição mais simples possível para se considerar: um ácido monoprótico num meio com pH igual ao pKa do analito, o que resulta em fração molar de 0,5 para ambas espécies presentes em solução. É possível notar que o valor atribuído para a mobilidade do íon acetato possui valor negativo. Este valor é atribuído devido ao fato de espécies negativamente carregadas migrarem em sentido oposto ao sentido normal do EOF. Apesar disto, a determinação destas espécies pode facilmente ser realizada por CE em eletrólito com ou sem a adição de modificadores de EOF [24, 27, 33].

A mobilidade efetiva de bases e ácidos fracos depende, porém, do número de etapas envolvidas no equilíbrio. Para uma espécie com mais de um grupo ácido, há

de se considerar a contribuição para a mobilidade efetiva de cada uma das espécies presentes em solução. O resultado é que a mobilidade efetiva (μ_{ef}) é a soma dos produtos entre as frações molares (α) de cada espécie (cujo valor depende do pH) e suas respectivas mobilidades eletroforéticas (μ_e). Para um ácido hipotético H_3B , por exemplo, a mobilidade efetiva poderia então ser determinada por meio da equação 1.

$$\mu_{ef} = \alpha_{H_2B^-} \cdot \mu_{eH_2B^-} + \alpha_{HB^{2-}} \cdot \mu_{eHB^{2-}} + \alpha_{B^{3-}} \cdot \mu_{eB^{3-}} \quad (1)$$

A fração molar de um ácido pode ser calculada por meio dos valores de pKa da espécie e dados de pH do meio. Com isso, curvas de distribuição das espécies participantes do equilíbrio em função do pH podem ser construídas, fornecendo então dados para construção de curvas de mobilidade destas espécies por meio da equação apresentada. A construção destas curvas ou simulação de eletroferogramas obtidos com dados oriundos destas curvas é prática comum em CE. Estas são frequentemente utilizadas e servem como base na formulação e otimização prévia do pH de eletrólitos de corrida.

Em separações onde inversores de EOF não são utilizados para determinação de espécies aniônicas, pode-se optar por realizar a injeção de amostra tanto na extremidade do capilar onde se posiciona o cátodo (lado negativo do capilar) quanto no extremo oposto, onde está posicionado o ânodo (lado positivo do capilar). Quando a amostra é injetada do lado negativo do capilar, apenas íons de mobilidade maior que o EOF conseguem vencer o bombeamento eletrosmótico e

serem detectados, uma vez que estas são apenas atrasadas pelo EOF. Íons de mobilidade igual ou menor que o EOF ficam retidos dentro da coluna de separação ou são arrastados para fora do capilar, em direção ao cátodo, sem passar pelo detector.

O oposto ocorre para injeção de amostra do lado positivo do capilar. Espécies com mobilidade maior que o EOF continuam vencendo o bombeamento, porém, escapam do capilar sem serem detectadas. Espécies com mobilidade relativamente baixa são arrastadas pelo EOF e atingem o detector, enquanto espécies que possuem mobilidade próxima ou igual ao EOF continuam retidas no interior da coluna.

Nos dois exemplos acima apresentados, espécies de mobilidade próxima ao EOF não são detectadas. Para que isto seja realizado, há de se recorrer ao uso de inversores de EOF. Apenas com o EOF invertido todas as espécies aniônicas podem ser detectadas.

Nota-se então que, quando a separação é realizada sem a utilização de inversores de EOF, é necessário optar-se por quais espécies detectar. Apesar de parecer um problema, a separação de espécies de baixa mobilidade é frequentemente realizada sem a utilização de inversores de EOF [28, 34], sendo esta denominada de separação em contra fluxo. Uma vertente de relevante importância para separações em CE sem a utilização de inversores de EOF está relacionada com a determinação simultânea de espécies catiônicas em conjunto com espécies aniônicas de baixa mobilidade, sendo estas últimas determinadas em contra fluxo [35, 36]. Outro ponto refere-se a métodos nos quais a amostra é injetada no capilar, bombeada hidrodinamicamente até o centro deste e, em seguida, a

separação é iniciada. Este procedimento faz uso de dois detectores, um em cada extremo da coluna e permite a determinação simultânea de cátions em geral (pois migram a favor do EOF) ou ânions de baixa ou alta mobilidade, exceção feita apenas a espécies aniônicas que possuem mobilidade próxima a do EOF que, como já dito, não alcançam o detector [37].

Para determinações simultâneas de cátions e ânions sem a utilização de inversores de EOF é possível também a realização de dois procedimentos de injeção: um no extremo positivo do capilar e outro no extremo negativo, sendo que o primeiro dos plugues de amostra injetado deve possuir volume maior para que não seja totalmente ejetado durante a segunda injeção. Este procedimento recebeu o nome de “*Dual-Opposite End Injection*” e, assim como o procedimento de injeção no centro do capilar, restringe-se ainda a aplicações acadêmicas para prova de conceito [38].

1.4. Separação de espécies neutras em CE

A CE, no modo de separação em solução livre, é aplicável apenas para espécies iônicas ou ionizáveis, sendo que a separação de espécies neutras deve ser realizada por metodologia que utiliza micelas como uma espécie de pseudo fase estacionária (MECK – *Micellar electrokinetic chromatography*).

Em CE, espécies neutras são transportadas pelo fluxo eletrosmótico (EOF) juntamente com o solvente, num único plugue, resultando então em pico único caso, o detector apresente resposta a essas espécies.

O modo MECK, no entanto, baseia-se na diferença de coeficiente de partição da espécie em estudo entre uma micela (pseudo fase estacionária) e o eletrólito de corrida. A implementação do método é realizada pela inclusão de um tensoativo em concentração acima da concentração micelar crítica (CMC) na formulação do eletrólito de corrida. A migração da micela é função, principalmente, da sua carga e tamanho, enquanto que o equilíbrio de distribuição de cada analito entre a fase aquosa e a micelar irá determinar se este analito irá se deslocar com velocidade mais próxima à do EOF ou da micela. As diferenças de coeficiente de partição de misturas de analitos neutros irão então determinar, desta forma, a separação entre as espécies. Analitos que não interagem com a micela irão ser arrastados pelo EOF chegando ao detector juntamente com o plugue de solvente da amostra. Analitos cuja interação com a micela seja alta permanecerão no interior desta a maior parte do tempo e possuirão tempo de chegada ao detector próximo ao da micela. No caso de analitos cuja interação com a micela seja intermediária, estes irão chegar ao detector em tempo superior ao EOF e inferior ao da micela sendo então separados e detectados. A mobilidade da micela utilizada pode ser drasticamente alterada pela utilização de surfactantes que, dependendo da carga, permitem, inclusive, a inversão do sentido de migração.

1.5. Tratamento de amostras visando separações por CE

Além dos procedimentos comumente utilizados em química analítica, em que a derivatização é realizada previamente à separação, em CE também se recorre

com frequência a métodos de derivatização *on-line* do analito [39], nos quais o agente derivatizante (por exemplo, um complexante) é inserido no BGE. Estes métodos proporcionam menor manipulação da amostra e conseqüente redução de erros devido a procedimentos adicionais. No que tange a utilização de procedimentos de derivatização visando à conversão do analito em uma espécie cromófora ou fluorófora [40], estes procedimentos geralmente são substituídos pela adição de íons com estas características ao eletrólito de corrida e utilização de detecção indireta [41-43].

Apesar da possibilidade do uso de MEKC para a separação de espécies neutras, via de regra, esta se destina à detecção de espécies por UV-Vis ou LIF [44]. Detectores de condutividade sem contato (C^4D) também já foram utilizados para este fim, porém, o mecanismo de detecção de espécies neutras é ainda desconhecido e os limites de detecção são relativamente altos [45].

Métodos de derivatização objetivando a conversão das espécies neutras em uma forma ionizável, quando aplicáveis, são de grande interesse, pois permitem que a separação se dê por diferenças na mobilidade iônica, cujos fundamentos são a base da CE. A detecção por C^4D torna-se também efetiva nestas condições, já que este detector possui resposta que depende, além de outros fatores, da diferença de condutividade iônica molar limite entre o íon analito e seu respectivo co-íon, presente no BGE [10, 11].

Como exemplos de procedimentos de derivatização para CE, podemos considerar uma simples oxidação química prévia de um álcool com formação de um ácido carboxílico, o que viabiliza a separação por CE e a detecção por C^4D ; A adição de sulfito ao eletrólito de corrida causa a formação de um aduto carregado com o

formaldeído e, dessa forma, permite também sua separação; O uso de tampão ácido bórico/borato (pH ~ 9) como eletrólito de corrida para a separação de glicerol ou açúcares [46] é um outro exemplo de procedimento de derivatização em CE. Neste caso, ocorre a formação de um complexo de borato com dióis em configuração cis (vicinais ou espaçados de até um carbono cis) resultando em um ácido [47], o que possibilita então que a separação seja realizada sem recorrer ao modo MEKC.

Uma outra estratégia, denominada de *stacking*, possibilita a pré-concentração de analitos e se baseia na diferença de campo elétrico e, conseqüentemente, de velocidade de deslocamento de espécies carregadas em regiões com diferentes condutividades ao longo do capilar. O efeito de *stacking* é observado quando o plugue de amostra apresenta condutividade inferior à do eletrólito de corrida (BGE). Isso leva as espécies contidas no plugue de amostra a experimentar campo elétrico de valor superior quando comparado com a região do BGE. O resultado é que espécies carregadas transitam com maior velocidade nesta região de campo elétrico amplificado, vindo a acumular-se na parte frontal do plugue de amostra (ou posterior, dependendo da carga) por terem sua velocidade reduzida pelo campo elétrico menor da região do BGE. Pensando-se em um único analito, após a saída de todos os seus íons da região da amostra, eles estarão contidos num volume menor que o inicial de amostra injetada no capilar. A razão entre estes volumes após o empacotamento (*stacking*) define a extensão, ou fator, de pré-concentração, o qual pode também ser obtido pela razão das intensidades (altura) dos picos detectados sem e com a realização do *stacking*. Esta modalidade de pré-concentração, definida como *stacking* em campo amplificado, será utilizada neste trabalho. Há ainda outras modalidades, que não serão usadas nesta tese, por exemplo, *stacking* mediado por

pH, injeção de elevado volume, além do método desenvolvido para espécies neutras, *sweeping* [48, 49].

1.6 Hifenação de célula eletroquímica

Em técnicas de separação o acoplamento de células eletroquímicas é comumente direcionado a etapa de detecção [50-52]. Métodos ópticos são preferidos para esta tarefa, porém, há aplicações onde os detectores eletroquímicos são necessários ou cumprem melhor as exigências da análise. Neste contexto, a cromatografia de íons pode ser citada como exemplo onde um detector eletroquímico (condutométrico) é universalmente aplicado, permitindo a detecção de íons inorgânicos ou orgânicos independentemente de absorverem ou não radiação na região UV-Vis [40], sem a necessidade de aditivos ao eletrólito (cromóforo) ou derivatização.

Por sua sensibilidade, simplicidade e versatilidade, entre outros atributos, as técnicas eletroquímicas tem encontrado ampla utilização em combinação com outras técnicas, principalmente na etapa de detecção, mas também em etapas prévias [53-57]. Empresas como ESA Biosciences [58] e Antec [59] já disponibilizam equipamentos, células e acessórios específicos para este tipo de aplicação, o que vem motivando grupos de pesquisa com pouca experiência no desenvolvimento destas tecnologias a investirem em soluções baseadas neste conceito.

Exemplos do acoplamento de células eletroquímicas com outras técnicas analíticas englobam:

- Processos eletroquímicos de pré-concentração de metais sobre eletrodo com posterior redissolução e determinação por técnicas como absorção atômica [60, 61], ICP [62] e cromatografia de íons [63];
- Métodos de derivatização eletroquímica visando a conversão de íons metálicos em seus respectivos hidretos voláteis, o que permite separação destes hidretos de sua matriz e determinação por técnicas espectroscópicas [64, 65];
- Dissolução eletroquímica de ligas metálicas proporcionando um tipo de micro abertura de amostra com posterior determinação dos íons metálicos por técnicas espectroscópicas [66, 67];
- Derivatização eletroquímica pré- ou pós-coluna cromatográfica visando melhor separação ou a conversão do analito em uma espécie que permita melhor seletividade ou sensibilidade [55, 68-70];
- Derivatização eletroquímica em acoplamentos HPLC-EC-MS ou pré-injeção direta em espectrometria de massas (EC-MS) visando a conversão de espécies neutras em ionizáveis, o que aumenta a eficiência de ionização na fonte eletrospray e consequentemente reduz os limites de detecção da técnica [53, 69];
- Acoplamento com técnicas como infravermelho ou MS para estudo de processos de eletrodo ou rota de oxidação [70-74].

Estão descritos acima apenas alguns dos exemplos possíveis com este tipo de acoplamento. Artigos de revisão tratam do assunto e apontam este tipo de acoplamento como uma área muito fértil da ciência (principalmente quando o acoplamento é realizado com HPLC-MS) indicando aplicações direcionadas também ao estudo e simulação de processos enzimáticos ou metabólicos [53].

Como visto, são inúmeras as aplicações e perspectivas para o acoplamento de uma célula eletroquímica (EC, de *ElectroChemical*) com outros métodos analíticos. Em CE, este tipo de acoplamento (EC-CE) foi proposto pela primeira vez por Esaka e colaboradores [75] em um trabalho visando à detecção de radicais formados pela redução de quinonas em meio de acetonitrila (aprótico). Estes radicais são formados eletroquimicamente e são instáveis quando em contato com oxigênio ou em meio aquoso. Isso levou o autor a construir uma célula eletroquímica acoplada à entrada da coluna de separação do CE. Nesta célula, o O₂ foi removido por meio da saturação do meio com N₂, a eletrólise realizada e os produtos desta eletrólise injetados no CE e detectados por UV-Vis. Matysik e colaboradores também desenvolveram trabalhos nesta área, abordando aspectos conceituais sobre o estudo de processos de eletrodo e conversão de uma espécie neutra em um composto carregado, tendo utilizado o processo de oxidação de ferroceno como modelo [76, 77]. Posteriormente, Matysik e colaboradores basearam-se em trabalho publicado pelo grupo do professor Gutz [78, 79] para a definição da distância entre o eletrodo de trabalho e a entrada do capilar de separação do CE. Neste mesmo trabalho, nova instrumentação foi apresentada, baseada em um controlador mecânico por motor de passo [80] que permite o posicionamento do capilar entre uma célula eletroquímica de eletrólise (EC) e uma segunda célula, contendo o tampão de corrida, onde o potencial de separação é estabelecido. O acoplamento EC-CE, descrito por Matysik, é então unido a um espectrômetro de massas por tempo de voo (*TOF-MS*) e posteriormente a junção EC-CE-TOF-MS é aplicada ao estudo do processo de redução do 4-nitrotolueno sobre diferentes materiais de eletrodos [81]. Jian-Bo e colaboradores investiram também esforços no acoplamento

EC-CE, desenvolvendo um sistema baseado em uma célula de camada delgada com eletrodo de trabalho de grafite de elevada área ativa (8,5 x 8.5 mm). O sistema foi aplicado na oxidação de Quercetina com posterior separação e detecção dos produtos formados por UV-Vis. Ao menos 13 espécies foram observadas como produtos desta oxidação. Parâmetros como tempo de oxidação, potencial e pH do meio foram avaliados obtendo-se eficiência de oxidação próxima a 100% [82].

No grupo de pesquisa do orientador deste trabalho, os primeiros estudos com este acoplamento foram realizados por Antunes-Junior durante o desenvolvimento de sua tese de doutoramento [83, 84]. Outros trabalhos do grupo nesta área foram focados no aperfeiçoamento da instrumentação [79], aprimoramento e estudo detalhado da pré-concentração de metais [78], aplicação no estudo da rota de oxidação do glicerol [85] e derivatização eletroquímica de álcoois [86], sendo estes trabalhos descritos no decorrer desta tese.

2 OBJETIVOS

- Aperfeiçoar o sistema concebido e demonstrado por GUTZ e col. [84] implementando toda automatização necessária para o processo de pré-concentração e oxidação de álcoois;
- Combinar a análise de traços de espécies pré-concentráveis com a de espécies majoritárias concomitantes, que dispensam pré-concentração, tomando como exemplo, NH_4^+ , Na^+ e Ca^{2+} em amostras ambientais;
- Avaliar a aplicabilidade de processos de troca de matriz, *stacking* e *cleanup* e selecionar condições de trabalho;
- Realizar a oxidação (derivatização) de álcoois a ácidos carboxílicos visando sua separação por CE e detecção por C^4D , avaliando a correlação da área dos picos com a concentração inicial de álcoois (quantificação);
- Avaliar a utilidade da interface eletrodo/capilar tanto no estudo de processos eletroquímicos como de catálise por metais (eletrodo desligado), tomando como exemplo a oxidação do glicerol;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 introdução

O laboratório em que se desenvolveu o projeto dispõe de equipamentos comuns de laboratório como balança, espectrofotômetro, condutivímetros e pH-metros. Somado a isto, é complementado por oficina mecânica e de eletrônica com diversos tipos de equipamentos e ferramentas para a construção de circuitos e dispositivos requeridos para a automação do sistema. Para estudos envolvendo separação por CE, foi utilizado inicialmente um equipamento anteriormente projetado e construído pelo próprio grupo [87]. Este conta com detector do tipo C^4D e possui fonte de alta tensão monopolar que trabalha entre 0 e -30 kV. O software desenvolvido no projeto para controle do equipamento para EC-CE- C^4D possui características específicas, não tendo sido possível o aproveitamento do software disponível no equipamento de CE original.

Paralelamente as pesquisas pioneiras de EC-CE- C^4D por adaptação do equipamento já disponível no laboratório, desenvolveu-se um novo equipamento de CE aprimorado para EC-CE- C^4D , dispondo de fonte de alta tensão bipolar (até 30 kV), cuja descrição consta desta tese. Sistema eletrônico para controle do sistema de fluxo e potenciostato com proteção contra fugas de corrente em alta tensão foram também desenvolvidos, sendo que para o projeto das placas de circuito impresso utilizou-se software específico para esta função (DipTrace – Novarm).

3.2 Reagentes, soluções e amostras

Água deionizada (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtida com sistema de purificação Nanopure® (Barnstead) alimentado com água da rede pré-purificada por osmose reversa (Quimis) foi utilizada o preparo de soluções. Todos os reagentes empregados apresentam pureza analítica ou superior. Soluções concentradas de elevada pureza de ácido clorídrico (Suprapur 37%, m/v - Merck) e ácido nítrico (Suprapur 65%, m/v - Merck) foram utilizadas para o preparo de soluções diluídas destes ácidos. As soluções contendo os íons metálicos utilizados para separação direta por CE (sem o uso do sistema de pré-concentração) foram preparadas a partir de seus respectivos sais de grau PA, em geral, nitratos, obtidos das empresas Merck, Sigma Aldrich ou Synth. No restante das aplicações envolvendo a separação de metais foram utilizadas soluções padrão comercializadas para aplicações com técnicas espectroscópicas. Estas soluções foram obtidas das empresas Perkin Elmer, Sigma Aldrich e Merck. NaOH, ácido 2[N-morfolino]etanosulfônico (MES), histidina e ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) foram obtidos da Merck ou Sigma Aldrich. Glicerol, etanol, methanol, propanol, butanol e pentanol foram obtidos de empresas nacionais (Synth ou Vetec). Os padrões utilizados para os estudos envolvendo a oxidação de glicerol foram obtidos da Sigma Aldrich e Alfa Aesar.

3.3 Equipamentos

Equipamentos de usinagem ou corte, além de equipamentos eletrônicos de medida ou geração de sinais foram necessários para o desenvolvimento e construção da célula eletroquímica, potenciostato, equipamento de eletroforese e sistema de gerenciamento de soluções. Trabalhos mecânicos de usinagem e corte foram realizados por meio de fresa e torno mecânicos convencionais e máquina de corte a laser de CO₂ (Gravograph). Para medida de parâmetros elétricos utilizou-se osciloscópio com duplo canal (Agilent) ou multímetros digitais (Goldstar).

Um equipamento gerador de sinais (Agilent) foi utilizado para introdução de sinal senoidal (551 kHz e 3.4 V pico a pico) no C⁴D sempre que a versão do detector desenvolvido por Fracassi e do Lago foi utilizada [8]. Para os estudos aqui apresentados, que envolvam separações eletroforéticas, adaptou-se equipamento desenvolvido por Fracassi e do Lago [87] ou réplica modernizada [88], alocada ao laboratório de graduação de química analítica instrumental do IQ-USP.

Estudos voltamétricos foram conduzidos em equipamento μ Autolab III (Metrohm Autolab) provido de célula eletroquímica de três eletrodos, sendo Pt utilizada como eletrodo auxiliar, AgAgCl, KCl_{3mol L⁻¹} como referência e eletrodos de Pt, Au e Pd como trabalho

3.4 Bombas propulsoras

No decorrer do projeto, dois modelos de bomba de ar foram utilizados para deslocamento de fluidos por aumento ou redução da pressão atmosférica:

- Compressor de ar marca Beta, comumente utilizado para oxigenação de aquário. Possibilita exercer pressão de ~ 2 m de coluna d'água (~20 kPa) e pode ser adaptado para fazer sucção de ar (redução de pressão).
- Compressor de ar AJK-B3601 (Xiamen). Possibilita estabelecer pressão positiva de até 6 m de H₂O e possui conector específico para redução de pressão, possibilitando também esta função.

Para o transporte de soluções, três tipos de bombas foram avaliadas:

- Bomba piezoelétrica de diafragma modelo mp6 (Bartels Microtechnik GmbH). Possui dois atuadores piezo, consumo menor que 200 mW, reduzido tamanho (37 x 15 x 3,8 mm) e peso de 2 g (Figura 3.1). Esta bomba adéqua-se muito bem em aplicações que necessitam de dimensões reduzidas e baixo consumo de energia (*Lab on a chip* ou microfluídica de modo geral). Este modelo de bomba possibilita o transporte de líquido ou gases e necessita de um oscilador-controlador para o funcionamento. Aplicação de onda retangular de 100 Hz e 250 V de amplitude permite alcançar vazão de água de 7 mL min⁻¹. A vazão desta bomba depende da diferença de pressão entre a entrada e a saída, decrescendo linearmente a zero ao redor de 60 kPa.

Figura 3.1. Bomba piezoelétrica de duplo diafragma modelo mp6 (Bartels Microtechnik GmbH).

- Bomba peristáltica modelo Reglo MS-4/8 (Ismatec). Possui rotor com 8 roletes que acionam até 4 canais (simultaneamente, não independentes) e é alimentada pela rede (110 ou 220 Vac). Possibilita ajuste de rotação (1 a 100 rpm, possibilitando vazões de $2 \mu\text{L min}^{-1}$ a 35 mL min^{-1} , variando o diâmetro dos tubos) e sentido de deslocamento do fluido por controle manual sem a necessidade de um controlador adicional; dispõe de conector para controle externo das funções (p.ex., pelo computador); uso bastante difundido em química analítica; também permite o deslocamento de líquidos ou gases. Bombas peristálticas não tem peças em contato direto com o fluido, afora a tubulação flexível, escolhida segundo a inércia química requerida pela aplicação. As dimensões (190 x 100 x 135 mm) e a potência (75 W) desfavorecem o uso desta bomba em sistemas miniaturizados ou microfluídicos, aplicações para as quais há no mercado bombas peristálticas do tipo monocal canal com dimensões e consumo muito menor. Servem de exemplo a empresa Takasago-Fluidics (Figura 3.2).

Figura 3.2. Micro bombas peristáltica comercializadas pela empresa Takasago-fluidics (licença de uso de imagem disponível no site do fabricante — <http://www.takasago-fluidics.com/>).

- Bomba solenóide modelo 120SP (Biochem valve – Figura 3.3). Baseia-se no acionamento pulsado de um solenóide acoplado a um diafragma que aspira e depois expelle volume fixo de líquido (p.ex., 20 μ L) de uma câmara provida de uma válvula de entrada e outra de saída de fluido. O fluido (líquido ou gás) só é exposto a materiais de elevada inércia química (PTFE e PEEK) e o controle da vazão média se dá por meio da alteração da frequência de operação do solenóide (até 2 Hz, pulsos de 12 ou 24 V, ~1,2W) controlada por dispositivo adicional.

Figura 3.3. Bomba solenóide modelo 120SP (Biochem Valve).

3.5 Dispositivos de controle e aquisição de dados

Para o controle e aquisição de dados dois modelos de placa produzidas pela empresa National Instruments foram utilizadas:

- Interface NI-USB-6221, possui 16 portas analógicas de entrada com resolução de 16-bits e velocidade de aquisição de 250 kS/s. Para controle analógico, possui 2 saídas com resolução de 16-bits e taxa de atualização de 833 kSamples/s. Adicionalmente, esta placa possui ainda 24 portas digitais configuráveis como entrada ou saída e 2 contadores de eventos.
- Interface NI-6229, possui 32 portas analógicas de entrada com resolução de 16-bits e velocidade de aquisição de 250 kS/s. É equipada com 4 saídas analógicas com resolução de 16-bits e taxa de atualização de 833 kS/s. Possui ainda 48 portas digitais configuráveis como entrada ou saída e 2 contadores de eventos.

Para controle do detector desenvolvido por Francisco e do Lago [89] utilizou-se ainda uma interface microcontrolada de baixo custo (Teensy 2.0)

3.6 Programas e ferramenta de programação

O programa Peak Master [29] foi utilizado para simulação de eletroferogramas, para cálculos de pH, capacidade tamponante e distribuição de espécies em função do pH utilizou-se o programa CurTiPot [90], ambos distribuídos gratuitamente no site dos desenvolvedores. Para o desenvolvimento dos circuitos eletrônicos, projeto e impressão das placas contendo os componentes físicos, utilizou-se o programa DipTrace (Novarm). Uma versão simples deste programa, que permite o desenvolvimento de placas com até 300 pinos, é disponibilizada de forma gratuita no site da empresa desenvolvedora. A ferramenta gráfica LabView foi utilizada para elaboração dos softwares de controle e aquisição de dados dos equipamentos. Excel (Microsoft) e Origin (OriginLab) foram utilizados para o tratamento dos dados e elaboração de gráficos. Tanto para o LabView quanto para o Origin a Universidade de São Paulo possui licenças de uso distribuídas pelo CCE-USP.

4 DESENVOLVIMENTO, TESTES INICIAIS E APRIMORAMENTO DO SISTEMA EC-CE-C⁴D

4.1 Introdução

Neste capítulo, aspectos relacionados com a parte instrumental do projeto são apresentados. Apesar de se tratar de um projeto com foco principal na determinação de espécies por eletroforese capilar, apenas ao final do capítulo o desenvolvimento do equipamento de CE será discutido. Isso se deve ao fato de, na maior parte do projeto, ter-se utilizado um equipamento já em funcionamento no laboratório, cujo desenvolvimento se deu durante a tese de doutoramento de Fracassi da Silva [87].

4.2 Hardware: Desenvolvimento e avaliação

4.2.1 Célula eletroquímica

A célula eletroquímica desenvolvida para o projeto (Figura 4.1) possui grande similaridade com células eletroquímicas convencionalmente utilizadas em análise por injeção em fluxo ou HPLC com detecção amperométrica e é composta por um bloco de Kel-F[®] com dois eletrodos de disco de 3 mm embutidos (Au, Pt ou carbono vítreo - Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA). Um destes discos foi utilizado como eletrodo de trabalho da célula eletroquímica e o outro ora como

eletrodo auxiliar (durante a etapa voltamétrica), ora como eletrodo de baixa tensão (terra) do sistema eletroforético (durante a separação eletroforética).

Figura 4.1. Célula eletroquímica em fluxo. a: Parte superior da célula construída em acrílico; b: Mascara espaçadora polimérica; c: Bloco inferior da célula construído em Kel-F; d: Tubulação para entrada de solução; e: Septo de Tygon; f: Capilar; g: Eletrodo de pseudo-referência; h: Tubulação de saída de solução; i: Eletrodo auxiliar do sistema voltamétrico ou terra do CE; j: Eletrodo de trabalho; k: Parafusos para junção das partes que compõem a célula.

A parte superior da célula foi produzida em acrílico, nela sendo feitos quatro orifícios para: entrada de líquido; saída de líquido; introdução do capilar de separação eletroforética; e instalação de um fio de prata (0,5 mm de diâmetro), estes dois a menos de 1 mm entre si e centrados em relação ao eletrodo de trabalho do bloco inferior. O fio de prata embutido na peça serviu como eletrodo pseudo-referência após a deposição de um filme de AgCl. Esta geometria possibilitou

adequado controle de potencial (baixo erro por queda ôhmica) durante a utilização desta célula no acoplamento EC-CE-C⁴D. Como máscara espaçadora para junção dos dois blocos e definição da área exposta e do volume interno da célula (cerca de 4,5 µL) utilizou-se filme polimérico, no qual os cortes definindo o canal central e os furos para parafusos de fixação foram executados com máquina de corte a laser de CO₂ disponível no laboratório. Na Figura 4.2 é possível observar os blocos e o espaçador separados e, a seguir, a célula eletroquímica montada com o espaçador intercalado nos blocos, unidos com o auxílio de parafusos.

Figura 4.2. Célula eletroquímica utilizada no projeto. a: peça superior da célula contendo furação e tubulação para entrada e saída de solução, orifício para entrada do capilar (com bucha de Tygon) e eletrodo pseudo-referência; b: Espaçador polimérico; c: bloco inferior contendo os dois discos metálicos utilizados como eletrodos.

Outras células desenvolvidas durante o andamento do projeto utilizavam eletrodo de referência de Ag/AgCl, KCl_{sat.}, porém, quando a separação eletroforética era iniciada, parte do eletrólito do eletrodo de referência que difundia para o interior da célula eletroquímica em fluxo migrava para o capilar de separação eletroforética. Isto resultava em elevada variação da linha base do C⁴D e inviabilizava a análise (Figura 4.3). No início do projeto uma célula contendo fio de Ag de 2,5 mm (ao invés

de 1 mm) embutido no bloco de acrílico superior foi também utilizada em substituição ao eletrodo de referência. Isto estabilizou a linha base durante a corrida eletroforética, porém, o potencial do eletrodo de quase-referência dependia do meio (diferindo do Ag/AgCl, KCl_{sat}) e, dependendo do deslocamento que apresentava, o picos para os metais de interesse após o processo de pré-concentração deixavam de ser observados.

Figura 4.3. Eletroferograma apresentando a deriva de linha base causada pelo vazamento de KCl do eletrodo de referência (problema solucionado com eletrodo de quase-referência).

4.2.2 Implementação e avaliação de sistemas de propulsão de fluidos

Um dos pontos de interesse do projeto é a possibilidade de controle autônomo do sistema. Para isto, sistemas de controle de fluxo baseado em bombas solenóide e piezoelétrica foram desenvolvidos e avaliados

Neste contexto, desenvolveu-se eletrônica e software para o controle e avaliação de bombas do tipo solenóide e piezoelétricas.

- Bomba do tipo piezoelétrica (fabricante Bartels e modelo mp6): Permite propulsão de apenas um fluido por bomba; possui custo menor que 10% da bomba peristáltica Ismatec; o baixo custo e reduzido tamanho possibilitam a inclusão de mais de uma bomba por sistema e, conseqüentemente, o controle independente de cada solução; possui restrição quanto ao bombeamento de soluções contendo também material particulado, o que pode danificar a bomba; a vazão é dependente da pressão exigida. Para que os cristais piezoelétricos da bomba oscilem deformando-se a ponto de promover a máxima movimentação de fluidos, precisam receber pulsos de potencial de até 250 V sob forma de onda retangular com frequência de até 100 Hz (ou 300 Hz, para gases). Para geração destes sinais recorreu-se a circuito eletrônico comercializado pela própria empresa Bartels. Este componente possui pinos de controle que possibilitam variação tanto da frequência de oscilação como da amplitude do sinal aplicado aos cristais. Um esquema eletrônico básico utilizando o driver comercializado pelo fabricante da bomba, que pode ser utilizado para o controle do modelo mp6, é ilustrado na Figura 4.4. Na porta denominada *CLOCK* (pino 2), aplica-se um sinal pulsado de baixa tensão (alternando entre 0 e 5 V) com o quádruplo da frequência selecionada para a operação da bomba. Para o controle de amplitude (0 a 250 V na saída do componente mp6), aplica-se sinal entre 0,5 e 1,3 V na porta 4 do componente.

A vazão pode ser ajustada tanto pelo controle de amplitude de oscilação do cristal como pela frequência, já que a vazão depende diretamente destes dois parâmetros. Assim, para facilitar o uso desta bomba, é possível fixar a frequência de operação em 100 Hz por meio da junção do pino 2 ao 3 (derivado do oscilador interno do dispositivo) e ajustar, com auxílio de um potenciômetro, apenas o

potencial de entrada na porta 4 do componente. Esta foi a configuração adotada para os testes e pode ser visualizada na Figura 4.4. Além de permitir a parada do fluxo de soluções por meio dos controles de frequência e potencial, este modelo de bomba possui ainda uma porta que desativa a bomba (/SHUTDOWN – pino 13), o que evita consumo desnecessário de energia, característica esta de grande importância em sistemas alimentados por baterias.

Figura 4.4. Esquema elétrico utilizando driver mp6 (Bartels) para controle da micro bomba piezoelétrica.

- Bomba do tipo solenóide (série 120SP - Bio-Chem Fluidics Inc - USA): Permite propulsão de apenas um fluido por bomba; possui custo menor que 15% da bomba peristáltica Ismatec; o baixo custo e reduzido tamanho possibilitam a inclusão de mais de uma bomba por sistema e consequentemente o controle independente de cada solução; possui perfil de propulsão pulsado (bombas de 5, 10, 20 ou 50 μL por pulso estão disponíveis comercialmente). O funcionamento desta bomba é bem simples, trata-se de um diafragma acionado por meio de um solenóide, que pode facilmente ser ativado por uma chave transistorizada controlada por um pulso de

potencial. Como a frequência de operação é baixa (até 2 Hz) o controle diretamente por software pode também ser realizado sem a necessidade de um oscilador. Para o controle de mais de uma bomba, ao invés de utilizar transistores independentes, pode-se optar pelo uso de um circuito integrado contendo uma série de transistores (Figura 4.5). Apenas três bombas solenóide foram utilizadas no projeto. Assim, as portas B4, B5, B6 e B7 do circuito ilustrado na Figura 4.5 foram utilizadas para controle de outros dispositivos como válvulas e relês.

Figura 4.5. A: Circuito eletrônico de controle das bombas solenóide; B: Imagem interna do ULN 200x apresentando a lógica de funcionamento do componente.

Estas bombas foram aplicadas em sistema de análise em fluxo (FIA) com detecção em célula amperométrica de três eletrodos (Pt, Pt e Ag/AgCl, $\text{KCl}_3 \text{ mol L}^{-1}$ atuando como eletrodos auxiliar, trabalho e referência, respectivamente) de linha única (vazão de 1 mL min^{-1}) para detecção de ferrocianeto em solução $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ [91]. Após realização dos experimentos, os sinais obtidos (picos) foram integrados e comparados para cada uma das bombas, sendo que estes indicaram pequena vantagem (maior integral do sinal) para a bomba solenóide em comparação com a piezoelétrica. Ou seja, caso estes sistemas de propulsão sejam utilizado para a deposição eletroquímica de metais (procedimento realizado sob fluxo), a bomba do tipo solenóide apresentaria maior eficiência de deposição quando comparada com a bomba piezoelétrica.

Com relação a bomba peristáltica, o modelo disponível no laboratório (Ismatec-Reglo) não possibilita o controle autônomo de soluções. Outros modelos de bomba peristáltica (de menor tamanho e valor) poderiam ser utilizados para o controle independente de soluções, porém, além da indisponibilidade no laboratório, experimentos em sistema FIA foram também realizados e os sinais amperométricos deste tipo de bomba apresentaram menor eficiência (menor integral de corrente para medidas em sistema amperométrico) quando comparados com a bomba solenóide.

Visto que a bomba solenóide possibilita o controle independente de soluções, possui custo acessível para inserção de mais de um dispositivo por equipamento e, quando comparada com a bomba piezoelétrica, apresenta menor dependência da vazão a variações de pressão em sua saída, optou-se por utilizar este modelo de bomba.

4.2.3 Potenciostato

A primeira versão do potenciostato foi baseada em circuito simples com dois amplificadores operacionais (Figura 4.6), tal como descrito em livros texto de análise instrumental [92], em que se mantém o eletrodo de trabalho em terra (virtualmente acoplado) por meio do amplificador operacional 2 enquanto o operacional 1 faz fluir entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar a corrente necessária para igualar o potencial medido pelo eletrodo de referência ao potencial desejado (no caso, programado no computador e aplicado via conversor D/A). Aplicar um potencial positivo ao eletrodo de referência frente ao de trabalho (aterrado) corresponde a ter o eletrodo de trabalho polarizado negativamente em relação à sua dupla camada elétrica (ou seja, no *software*, aplica-se a entrada do potenciostato $-1 \times E$).

Há outras configurações de potenciostato bem com circuitos mais elaborados, inclusive para compensar a queda de potencial eventualmente originada por valor significativo do produto $i \times R$ entre a extremidade do eletrodo de referência e o de trabalho (por ex. [93]), mas o circuito simples da Fig. 4.6. atendeu às necessidades atuais da EC-CE-C⁴D. Qualquer que seja a configuração, utiliza-se uma entrada de alta impedância (de $10^{12}\Omega$ a $10^{15}\Omega$, dependendo modelo) do amplificador operacional para conectar o eletrodo de referência, de modo a praticamente não deixar fluir corrente pelo eletrodo de referência. Quanto à medição da corrente que flui pelos eletrodos de trabalho e auxiliar, esta é convertida em potencial pelo amplificador 2 e este potencial, medido na saída do circuito com o auxílio de uma placa de aquisição de dados (A/D).

Figura 4.6. Diagrama elétrico da primeira versão do potenciostato utilizado.

A placa do potenciostato desenvolvido, onde é possível a visualização dos componentes utilizados no projeto, pode ser observada na Figura 4.7. Amplificadores operacionais opa 129, com impedância de entrada de até $10^{15} \Omega$, foram empregados no projeto. Relês foram utilizados para definição do ganho do potenciostato como também para desconectar os eletrodos durante a corrida eletroforética e aplicação da alta tensão.

Figura 4.7. Placa do circuito do potenciostato desenvolvido para o acoplamento FA-EC-CE-C⁴D.

Apesar do uso de relês para desconectar o potenciostato durante o estabelecimento da alta tensão utilizada na separação eletroforética, fugas de corrente em alta tensão ocasionalmente ocorriam pelos relês (quando da eventual

entrada ou formação de bolhas na célula eletroquímica), atingindo o circuito do potenciostato. É possível encontrar no mercado relês com isolamento elétrico para alta tensão, porém, optou-se por desenvolver novo circuito com proteção para estas fugas, como ilustrado na Figura 4.8. Este é um circuito simplificado demonstrando as estratégias utilizadas para impedir que estas fugas de corrente em alta tensão danifiquem o circuito do potenciostato.

Figura 4.8. Diagrama elétrico apresentando a estratégia utilizada para proteção contra fugas de corrente em alta tensão.

Observando-se a Figura 4.6, é possível notar que o único ponto de alta impedância ligado aos eletrodos é o ponto onde o eletrodo de referência está conectado. Assim, quando fora de uso, optou-se por conectar a saída de baixa

impedância do amplificador operacional juntamente com a entrada de alta impedância do eletrodo de referência. Adicionou-se ainda dois diodos zener de 15 V (D1 e D2) ligados ao terra e ao ponto de alta impedância para aumentar a segurança contra fugas. Neste circuito, fugas de corrente para os contatos dos eletrodos não são evitadas, mas direcionadas ao ponto de terra, o que inviabiliza o aumento de potencial acima do suportado pelo amplificador operacional e evita danos ao circuito.

Devido ao uso de uma célula de camada delgada no sistema em fluxo, desenvolve-se circuito eletrônico de forma a possibilitar a medida de potencial em eletrodos de referência em outros pontos (eletrodos adicionais), além do de quase-referência instalado acima do eletrodo de trabalho (ao lado do capilar para CE). O circuito necessário para este tipo de medida é baseado também em um amplificador operacional, como ilustrado na Figura 4.9.

Figura 4.9. Diagrama elétrico do circuito utilizado para a medida de potencial em eletrodos adicionais.

Baseado nos circuitos apresentados nas Figuras 4.6, 4.8 e 4.9 desenvolveu-se o circuito apresentado na Figura 4.10. O operacional opa606 é responsável pelo

estabelecimento e controle do potencial da célula, possui em sua saída um relê que, quando o potenciostato está fora de uso, conecta a saída do operacional opa606 ao pino 2 do operacional e aos diodos Zener ligados em série até o terra (proteção contra fuga de corrente em alta tensão). O operacional opa4134-1 (posteriormente substituído pelo tl084), por meio de um relê, está conectado ao eletrodo de trabalho em configuração de conversor corrente tensão, o que possibilita a medida da corrente que flui pelo sistema. Os amplificadores excedentes no chip opa4134 (2, 3 e 4) foram configurados como seguidores de tensão para possibilitar, p. ex., a medição de potencial em outros eletrodos de referência. Incluiu-se também o operacional opa129, como seguidor de tensão, para monitorar o potencial no eletrodo pseudo-referência utilizado na célula sem drenar corrente do mesmo. Os demais componentes do circuito não citados servem para o ajuste de ganho do potenciostato ou para a etapa de alimentação do circuito.

Figura 4.10. Diagrama elétrico geral do potenciostato equipado com proteção para fuga de alta tensão e circuito para medição de potencial de até três eletrodos de referência adicionais.

4.2.4 Avaliação do sistema em aplicações FIA

Para avaliação da funcionalidade destes dispositivos em conjunto (potenciostato, sistema de fluxo e célula eletroquímica), as bombas solenóide disponíveis foram montadas em conjunto com algumas válvulas solenóide de 3 vias (n-Research) para permitir a aplicação deste sistema em testes para uma análise de rotina por FIA com detecção amperométrica (Figura 4.11). Das 3 bombas solenóide instaladas, apenas duas foram necessárias nestes testes (B1 para propulsão do líquido transportador e B2 para preenchimento da alça de amostragem).

Figura 4.11. Ilustração esquemática do sistema em fluxo desenvolvido para avaliação do funcionamento do potenciostato, bombas solenóide, válvulas, célula eletroquímica e software.

O circuito do potenciostato foi acomodado em um gabinete metálico e fixado sobre uma base de acrílico visando sua proteção mecânica e elétrica. Uma segunda caixa contendo o circuito de controle das bombas foi afixada na parede lateral da caixa do potenciostato. Ainda sobre a base de acrílico, foram afixadas as bombas solenóide (Figura 4.12). As válvulas solenóide, necessárias apenas para estes testes com detecção amperométrica, não foram fixadas.

Figura 4.12. Foto do sistema em fluxo para determinações amperométricas. A: gabinete contendo o potenciostato e controle eletrônico das bombas solenóide; B: bombas e válvulas solenóide; C: célula eletroquímica.

Como exemplo de aplicação, selecionou-se as bem conhecidas determinações de ácido ascórbico e de paracetamol, separadamente. Como observado pelas Figuras 4.13 e 4.14, os sinais registrados apresentam repetibilidade satisfatória e as curvas de calibração mostram-se perfeitamente lineares. Na Figura 4.14, incluiu-se a tela gerada pelo programa desenvolvido para esta aplicação. Nota-se pequeno declínio da sensibilidade com o tempo nos registros de sinal, o que poderia estar relacionado com o envenenamento do eletrodo.

A programação de controle de todo o sistema e a aquisição de dados foi elaborada em LabView.

Figura 4.13. Resultados obtidos para determinação amperométrica de paracetamol. A: Diagrama obtido para a determinação de paracetamol em soluções padrão de concentração entre 20 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; B: Curva analítica obtida com a plotagem da altura de pico em função da concentração do analito. Vazão de 1,5 mL min^{-1} , alça de amostragem de 150 μL e potencial de 1V vs Ag/AgCl, KCl sat.

Figura 4.14. Resultados obtidos para determinação amperométrica de ácido ascórbico. A: Tela do programa desenvolvido apresentando diagrama obtido para a determinação de ácido ascórbico em soluções padrão de concentração entre 20 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$; B: Curva analítica obtida com a plotagem da altura de pico em função da concentração do analito. Vazão de 1,5 mL min^{-1} , alça de amostragem de 150 μL e potencial de 1V vs. Ag/AgCl, KCl sat.

Além dos testes com o sistema configurado no modo FIA com detecção amperométrica, o potenciostato desenvolvido, acompanhado de seu software, também foi utilizado em um projeto objetivando a determinação de sulfito em amostras de suco após separação em célula de difusão gasosa em fluxo. Este projeto foi desenvolvido em parceria com o grupo do professor Koiti Araki do Instituto de Química da USP, fez parte da tese de doutorado de um de seus alunos e tinha como foco o uso de eletrodos modificados por porfirinas em sistemas FIA automatizados [94]. Na Figura 4.15 vê-se a parte frontal do equipamento juntamente com a célula eletroquímica e, à direita, a tela do *software* de controle do potenciostato. Este *software* foi projetado para detecção automática de picos e para devolver ao analista o valor de concentração de sulfito na amostra, obtido diretamente pela comparação da altura de pico da amostra com a altura de pico de uma solução padrão injetada sequencialmente com o plugue de amostra (após comprovação de linearidade do sinal na região de corrente/concentração utilizada).

Figura 4.15. Foto do sistema FIA utilizado para determinação de sulfito em sucos utilizando membrana de difusão gasosa. A: Gabinete contendo circuitos eletrônicos; B: Célula eletroquímica equipada com membrana para difusão gasosa; C: PC onde é possível visualização da interface de controle e aquisição de dados do sistema [94].

4.2.5 Acoplamento FA-EC-CE-C⁴D

Após o desenvolvimento e testes dos dispositivos que comporiam o equipamento de *Flow Analysis — Electrochemistry — Capillary Electrophoresis — Contactless Conductivity Detection (FA-EC-CE-C⁴D)* realizou-se então o acoplamento destes. A parte frontal do equipamento desenvolvido, com a célula eletroquímica, o C⁴D, o capilar e a segunda semi-célula utilizada para a separação eletroforética pode ser observada pela Figura 4.16. Como já mencionado, um CE já disponível no laboratório foi aproveitado nesta montagem, assim como um detector

condutométrico desenvolvido por Fracassi e do [8]. O potenciostato e sistema de controle de fluxo, não visíveis na Figura 4.16B foram posicionados à direita, do CE.

Figura 4.16. Acoplamento EC-CE. Imagem frontal do equipamento adaptado. A: C⁴D; B: Semi-célula de alta tensão utilizada para a separação eletroforética; C: célula eletroquímica em fluxo.

Em CE, o diâmetro interno reduzido do capilar de separação (d.i. tipicamente entre 20 e 100 μm) dificulta o acoplamento desta técnica com células eletroquímicas [95, 96]. A distância entre o eletrodo de trabalho e a entrada do capilar de separação costuma ser ajustada entre 30 e 100 μm como condição de compromisso para evitar problemas como fugas de corrente do processo de separação pelo eletrodo de trabalho do sistema amperométrico (proximidade excessiva) ou baixa detectabilidade (distância elevada). Este ajuste crítico da distância costuma ser feito com auxílio de um microposicionador. Neste trabalho, porém, inventou-se outra solução para, com maior facilidade, manter distanciamento reproduzível. A forma pela qual a interface foi estabelecida pode ser observada na Figura 4.17, com esta

imagem é facilitado o entendimento do processo de definição da distância entre a entrada do capilar e o eletrodo de trabalho do sistema voltamétrico (Figura ilustrada da interface capilar eletrodo de trabalho). Nesta Figura, é possível ainda a visualização de um capilar com extremidade polida e distância definida de 50 μm entre o centro do capilar (entrada) e o eletrodo de trabalho.

Figura 4.17. Interface entre o sistema voltamétrico e o CE. A: Corte transversal da célula com ampliação da região em que a extremidade lapidada do capilar toca no eletrodo de trabalho (canal de fluxo perpendicular ao plano de corte); B: visão esquemática lateral da célula; a: corpo de acrílico; b: bucha (tubo capilar de Tygon); c: capilar de sílica fundida revestido de políimida; d: eletrodo de trabalho; e: espaçador; f: bloco de Kel-F; g: fio de Ag (eletrodo pseudo-referência onde AgCl pode ser depositado), h: eletrodo auxiliar e eletrodo terra do CE (selecionável entre o potenciostato e a fonte AT); i: fluxo de entrada; j: fluxo de saída; os blocos superior (a) e inferior (f) da interface são unidos por parafusos (não visíveis)[79].

O polimento em ângulo é conseguido por meio de um gabarito de acrílico (Figura 4.18A), onde a extremidade do capilar é inserida e fixada por um septo de

tygon. Isto permite que uma das extremidades do capilar de separação seja polida contra uma lixa pouco abrasiva (granulometria 1000 ou valor maior) de forma reprodutível. Para evitar o entupimento do capilar durante o polimento, água é propelida pelo interior deste. Ainda na Figura 4.18 (B e C) é possível a visualização da extremidade de alguns capilares obtidos após polimento quando inseridos em gabaritos com diferentes ângulos. Um capilar assim preparado, com a ponta em bixel, ao ser introduzido na célula eletroquímica até que a superfície do eletrodo de trabalho (WE) seja tocada acaba estabelecendo sempre a mesma distância entre a ponta mais saliente de sílica fundida recoberta por poliimida do capilar que está em contato com o WE e o orifício de entrada do capilar dentro do qual a separação ocorre. A distância é definida, pois, pelo ângulo do bixel obtido por polimento, sendo exemplos cobrindo o intervalo de 50 a 150 μm observados na Figura 4.18-B.

Figura 4.18. A: Gabarito para o polimento de capilar; B e C: Imagens apresentando algumas extremidades polidas em ângulo de capilares. Em “B” apresenta-se também a distância obtida entre o orifício de entrada do capilar e o eletrodo de trabalho para cada um dos polimentos apresentados.

Além do já exposto, bombas de ar (pressurização e redução de pressão) foram inseridas no sistema. Bombas para redução de pressão são comumente utilizadas em CE para o processo de introdução de amostras. Uma bomba de ar comercializada para oxigenação de aquários foi configurada para redução de pressão, ajustada em 10 cm H₂O por meio de uma coluna d’água e utilizada neste equipamento. A segunda bomba de ar permite elevar momentaneamente a pressão na extremidade do capilar oposta à da célula eletroquímica, forçando o fluxo em direção a esta célula para fins de limpeza do capilar e prevenção de admissão não desejada de soluções bombeadas através da célula. Uma ilustração geral do

sistema contendo potenciostato protegido contra fuga de corrente em alta tensão, célula eletroquímica, C⁴D, sistema de fluxo de soluções, sistema pneumático para introdução de amostras e limpeza do capilar, equipamento de eletroforese capilar e computador responsável pelo controle da interface NI-USB-6221 e software desenvolvido em LabView pode ser observada na Figura 4.19.

Figura 4.19. Imagem ilustrativa do sistema EC-CE-C⁴D. a: capilar; b: eletrodo de trabalho e α : ângulo de corte do capilar.

4.3 Software

Neste sistema recorreu-se ao uso da linguagem gráfica LabView (National Instruments — licença disponibilizada pelo CCE-USP) para o desenvolvimento do software de controle do sistema. O programa de controle foi desenvolvido de forma a proporcionar ao sistema a capacidade de operação autônoma. Para conversão dos comandos lógicos em físicos, portas digitais e analógicas da placa de controle e aquisição de dados USB-6229 (National Instruments) foram utilizadas. Para melhor entendimento sobre o funcionamento do sistema, foi montado um fluxograma contendo as etapas necessárias, por exemplo, para a implementação do sistema de pré-concentração eletroquímica acoplado ao CE (Figura 4.20).

Neste fluxograma, uma visão simplificada é apresentada, servindo apenas para entendimento da lógica de controle do equipamento. É necessário lembrar, porém, que cada uma das etapas acima apresentadas é composta por uma série de ações e comandos programados em software e executados por dispositivos elétricos ou eletromecânicos. Tomando como exemplo a etapa definida como “limpeza de eletrodos e célula”, uma bomba solenóide é pulsada em uma dada frequência (definida pela vazão estabelecida pelo analista) pelo tempo necessário para dispensar o volume total programado. Nesta mesma etapa, o eletrodo de trabalho é submetido a um potencial (escolhido pelo analista) enquanto se realiza a limpeza do capilar de separação por meio da ativação de uma bomba de pressão conectada ao reservatório de eletrólito de corrida (lado oposto ao da célula eletroquímica).

Figura 4.20. Fluxograma apresentando as etapas controladas pelo software quando o sistema é utilizado para o método de pré-concentração (para estudos de processos de eletrodo ou derivatização eletroquímica algumas das etapas são substituídas e a sequência, alterada).

Com relação ao sincronismo de acionamento dos dispositivos que compõe o sistema, em resposta à execução do *software* (fluxograma da Figura 4.20), montou-se diagrama que ilustra em qual das etapas cada um dos subsistemas deve ser acionado (Figura 4.21). Durante o processo de pré-concentração, o potencial do eletrodo de trabalho é alterado de acordo com a necessidade da etapa em questão. Dispositivos como bombas de solução (μ Ps), bombas de ar (VP e PP) e fonte de alta tensão do equipamento de CE são também controlados conforme necessidade. Mais detalhes sobre os valores de potencial e variações na sequência e tempo de

acionamento de cada dispositivo serão discutidos nos capítulos referentes às aplicações, apresentando-se aqui apenas dados de caráter instrumental.

Figura 4.21. Ilustração com a sequência de acionamento dos dispositivos utilizados pelo software desenvolvido em LabView, correspondente à implementação do método de pré-concentração (para estudos de processos de eletrodo ou derivatização eletroquímica algumas etapas são substituídas e a sequência alterada). A duração típica de cada etapa está marcada sobre a barra superior da tabela. E1, E2 e E3: potenciais distintos aplicados ao eletrodo de trabalho. μP1, 2 e 3: micro-bombas solenóide. VP e PP: bombas de injeção de amostra e de limpeza do capilar. CE-HV representa a aplicação de alta tensão ao capilar de separação eletroforética.

Com base no apresentado, a realização de uma análise utilizando o sistema pode parecer um tanto quanto trabalhosa ou desafiadora para um novo usuário do sistema. É necessário, porém, levar em conta que estas Figuras se referem a uma visão do ponto de vista do desenvolvedor do sistema. Detalhes instrumentais normalmente não ficam acessíveis ao usuário comum, como visto pela tela de controle do *software* desenvolvido (Figura 4.22). Nesta interface com o usuário, são utilizadas abas onde, além de indicadores de dados como do detector ou fonte de

alta tensão, são disponibilizados controles para execução das etapas apresentadas no fluxograma. Basta ao usuário conhecer o tipo de análise que deseja realizar.

Partindo do modo simplificado, por meio de um único botão, é possível desativar por software o potenciostato e sistema de fluxo. Assim, a remoção da célula eletroquímica em fluxo e substituição desta por um reservatório convencional comumente utilizado em CE possibilita a realização de uma separação, como em qualquer outro equipamento de CE. Pensar no sistema de forma a dividir as etapas em sub-procedimentos é outra abordagem que torna o entendimento simples. Neste caso, deve-se pensar em um sistema voltamétrico em fluxo que servirá para realizar um processo de oxidação ou redução de um dado analito, o que é bastante explorado na literatura. Após esta etapa utilizando o potenciostato, segue-se a separação eletroforética convencional. Além dos parâmetros usuais em qualquer separação eletroforética e estudo voltamétrico, o usuário precisa, essencialmente, acrescentar a definição do volume (e vazão) de amostra ou padrão a bombear pela célula. Após o processamento eletroquímico e separação eletroforética, os dados obtido são automaticamente salvos em disco e também apresentados nos gráficos posicionados ao lado direito da tela do programa.

Figura 4.22. Imagem obtida da tela do software de controle, desenvolvido em LabView.

4.4 Aprimoramento do sistema

Como mencionado, o projeto foi conduzido utilizando-se um equipamento de CE desenvolvido por Fracassi e do Lago, tal como o detector C⁴D [87]. Esta versão antiga do detector depende de um gerador de sinais externo (equipamento volumoso e de custo elevado, comparado ao restante do detector) para excitação do eletrodo indutor do detector que mede a admitância da célula. Em 2009, Francisco e do Lago aprimoraram o C⁴D e adicionaram o circuito do gerador de onda senoidal ao do conversor de corrente em tensão, retificador de onda completa, amplificador e conversor A/D, tudo em um único dispositivo [89]. Desenvolveram e adicionaram também *firmware* para uma interface microcontrolada de baixo custo, o que

possibilitou então a comunicação deste detector com o computador por meio de uma porta USB.

A fonte de alta tensão disponível no equipamento adotado inicialmente para os estudos possui a restrição de permitir apenas a aplicação de potenciais negativos ao extremo mais próximo ao detector. Isso porque, para prevenir acidentes e danos com a alta tensão, o terminal de baixa tensão da fonte é que deve ser conectado ao extremo do capilar interfaceado com a célula eletroquímica em fluxo. Consequentemente, a separação de espécies aniônicas com maior mobilidade é dificultada ou inviabilizada.

Para superar as limitações descritas, incorporar os avanços e dimensionar as partes e componentes já visando o interfaceamento objeto desta tese, um novo equipamento de CE foi projetado e construído. Além de uma fonte bipolar (CZE-2000 – Spellman Corporation), o equipamento faz uso de dois detectores C^4D da nova versão de Francisco e do Lago [8], e possui 4 bombas solenóide para transporte de fluidos. A célula eletroquímica foi também aprimorada e pode ser visualizada na Figura 4.23. Nesta, substituiu-se o bloco comercial com o eletrodo de trabalho por outro construído no laboratório, reduziu-se também o diâmetro do disco que compõe o eletrodo de trabalho de 3 para 2 mm, ainda suficiente para injeção no capilar dos produtos gerados.

Figura 4.23. Célula eletroquímica em fluxo do novo equipamento. A: Bloco superior contendo orifícios para entrada e saída de solução, posicionamento do capilar e eletrodo pseudo-referência; B: Espaçador polimérico; C: Bloco inferior contendo eletrodo de trabalho (disco de 2 mm de diâmetro). O eletrodo auxiliar, não apresentado, consiste num tubo de aço inoxidável que também serve para a saída de solução.

O posicionamento reproduzível do capilar no interior da nova célula foi alcançado de forma distinta da original. Como se verá bem mais à frente (Figura 5.13), a distância de 50 μm entre o orifício do capilar e o plano do eletrodo de trabalho se mostrou a mais satisfatória, não havendo necessidade, portanto, de dispor de capilares lapidados em diferentes ângulos (Figuras 4.16 e 17). Sendo assim, conclui-se ser mais prático efetuar em ângulo a perfuração no bloco superior da célula, pela qual se insere o capilar, e polir a extremidade deste de forma a se ter um plano perpendicular ao eixo definido pelo seu orifício. Por consequência, no corte exibido ao lado da fotografia da célula em fluxo, também incluída na Figura 4.24, verifica-se que quando a borda do capilar inserido pelo orifício inclinado toca no eletrodo de trabalho tem-se, tal como na versão original da interface, um distanciamento fixo e reproduzível entre o orifício do capilar e o plano do eletrodo de disco.

Figura 4.24. A: Foto frontal do equipamento apresentando célula eletroquímica e detector; B: Foto das placas eletrônicas que compõe o C⁴D [89]; C: Ilustração apresentando o posicionamento do capilar no interior da célula frente ao eletrodo de trabalho.

Ainda na Figura 4.24, é possível observar o capilar passando pelo primeiro detector, posicionado a 7 cm acima da célula eletroquímica (8,5 cm do ponto exato de detecção), destinado a apresentar resposta para os analitos ainda no início da separação. A parte frontal deste primeiro C⁴D não possui nenhuma proteção, exceto o silicone transparente utilizado para imobilização, sendo possível então a visualização das placas de circuito impresso que o compõem.

Quanto às demais placas eletrônicas deste novo equipamento, além das fontes de alimentação, foram também desenvolvidos circuitos para o controle de

temperatura, controle da tensão aplicada pela fonte de alta tensão e controle geral de acionamento do equipamento, bombas e demais dispositivos.

O circuito eletrônico desenvolvido para o controle geral do equipamento a partir do computador via portas digitais configuradas como saída no módulo National NI-USB-6229 pode ser visualizado na Figura 4.25. Estas portas lógicas tem capacidade de corrente limitada a alguns mA (permite acender um LED) e, para a aplicação pretendida, dependem de amplificação da corrente, por exemplo, por pares de transistores em configuração Darlington, tal como os existentes nos dois circuitos integrados ULN2003 representados na figura, que permitem chavear dispositivos com correntes de até 0,6 A e tensões de até 95 V em cada uma das 7 portas. Serviram, pois, para ativação das fontes de alimentação e acionamento geral das bombas solenóide (diretamente) ou de ar (indiretamente, por meio do acionamento de um relê).

Figura 4.25. Diagrama elétrico da placa de controle geral do equipamento, incluindo controle de bombas de propulsão de fluídos ou ar.

Na Figura 4.26 se vê as bombas solenóide do sistema, posicionadas logo atrás da célula eletroquímica em fluxo. São 4 bombas com deslocamento de $10 \mu\text{L}$ por pulso e frequência de pulsação (recomendada pelo fabricante) de até 2 Hz , o que resulta em vazão nominal máxima de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 4.26. Imagem apresentando o posicionamento das bombas solenóide no interior do equipamento.

Na Figura 4.27 pode ser visualizado o circuito de controle da fonte bipolar de alta tensão, simplificado por serem os sinais lógicos do circuito da fonte compatíveis com os da interface de comunicação do módulo NI-USP-6229 da NI, comandada por software. Para medição da corrente eletroforética, recorreu-se a um amplificador operacional para conversão de corrente em tensão entre a fonte e uma entrada de conversão analógico/digital. Por segurança, adicionou-se também um sensor

magnético indicando a abertura da porta frontal do equipamento e desabilitando a aplicação da alta tensão.

Figura 4.27. Diagrama elétrico da placa utilizada para o controle da fonte de alta tensão.

Para a medida de temperatura, um sensor bastante popular em instrumentação, por sua resposta linear de tensão de saída relativa à temperatura (LM35) foi utilizado. O valor referência da temperatura é definido por software e disponibilizado via porta D/A da interface NI para um amplificador operacional, que

Para injeção de amostra no capilar, uma bomba de ar para redução de pressão (AJK-B3601 - Xiamen) foi conectada a uma coluna d'água de 20 cm (serve como limitador/estabilizador de pressão pois, o ar que vence a pressão da coluna escapa borbulhando na água) e afixada na lateral do equipamento. Na Figura 4.29 uma vista frontal/lateral do equipamento (onde a coluna d'água está fixada) pode ser observada, a bomba de ar está posicionada no interior do equipamento. Para limpeza do capilar (*flush*), recorreu-se a mesma bomba, porém, ao invés entrada de ar, conectou-se a saída de pressurização ao sistema e dispensou-se a restrição de pressão por coluna d'água, ou seja, apenas uma bomba de ar é utilizada no sistema.

O direcionamento de ar é gerenciado por meio de duas válvulas solenóide posicionadas no interior do equipamento.

Figura 4.29. Imagem apresentando a lateral do equipamento onde se posiciona a coluna d'água utilizada para definição da pressão exercida (redução de pressão) para introdução da amostra.

Nas Figuras 4.29 e 4.30 visualiza-se também uma chapa metálica com a qual o capilar se encontra em contato. Esta placa é construída em alumínio perfurado e serve para dissipar o calor gerado pela passagem de corrente durante o processo de separação (efeito Joule).

O mesmo potenciostato aprimorado durante o início do projeto foi também utilizado neste novo equipamento. A descrição detalhada, características e

funcionamento deste podem ser consultadas na seção 4.2.3. Este potenciostato foi afixado do lado direito do gabinete maior (CE) e possui cabo para conexão dos três eletrodos do sistema voltamétrico, pinos banana para conexão de eletrodos de referência adicionais (seção 4.2.3), além de conector para o eletrodo de baixa tensão do CE, todos saindo da parte frontal da caixa do potenciostato (Figura 4.30).

Figura 4.30. Imagem da lateral direita do equipamento apresentando o posicionamento do potenciostato.

Na Figura 4.31 distingue-se melhor que na figura anterior as 4 células eletroquímicas presentes no sistema: duas condutométricas (um C^4D próximo ao início do capilar e outro, próximo ao final, ambos logo abaixo da placa de dissipação de calor), uma voltamétrica para tratamento de amostra (lado direito, a 1/3 da altura do gabinete) e outra para a separação eletroforética, subdividida em semi-célula à

direita (aproveita-se o eletrodo auxiliar da célula voltamétrica) e semi-célula da esquerda, onde se aplica a alta tensão.

Figura 4.31. Vista frontal do equipamento apresentando o posicionamento das duas semi-células (célula em fluxo e célula de alta tensão do CE), detectores e capilar de separação.

Na Figura 4.32, a parte traseira do equipamento é apresentada, este espaço ficou reservado para as borneiras da placa de comunicação da NI e para uma placa microcontrolada (Teensy 2.0, responsável por controlar e receber os dados dos dois C⁴D via USB).

Figura 4.32. Foto obtida da parte traseira do equipamento, onde se pode visualizar as borneiras da placa de aquisição de dados NI-6229 (ponto onde a maioria dos cabos de controle para aquisição de dados e controle são conectados) e a interface microcontrolada utilizada para controle dos dois C⁴D.

5 Pré-concentração eletroquímica seguida de separação eletroforética dos metais

5.1 Introdução

O preparo de amostras é etapa crucial em muitos métodos analíticos. Sempre que determinações diretas não são viáveis, o tratamento de amostra torna-se necessário. Entre outras técnicas aplicáveis, figuram as eletroquímicas, de grande versatilidade e que permitem, por exemplo, a concentração (acumulação) de íons metálicos sobre um eletrodo, com posterior redissolução dos metais acompanhada de registro voltamétrico para determinação quantitativa.

Os ganhos típicos de sensibilidade e limite de detecção dos métodos de pré-concentração eletroquímicos aplicados em quantificações por voltametria são de duas ordens de grandeza. Na voltametria de redissolução anódica (ASV – *anodic stripping voltammetry*), íons metálicos são acumulados por alguns minutos, sob convecção, no próprio eletrodo de trabalho, num potencial fixo em que ocorre a redução destes íons ao metal ou amálgama. O voltamograma é registrado em seguida, com varredura no sentido positivo do potencial registrando-se os picos de corrente anódica. A acumulação de íons ou moléculas pode dar-se, também, por adsorção ou precipitação com redissolução catódica (CSV) [97].

A instrumentação necessária para este tipo de tratamento de amostra é relativamente simples; recorre-se a um potenciostato ou galvanostato, ou seja, o

mesmo equipamento que serve para a determinação. Basta apenas configurar o software disponível no equipamento para que a tratamento prévio da amostra por acumulação do analito seja realizado.

A implementação da ASV e CSV é particularmente favorável em sistemas em fluxo como o desenvolvido neste projeto, com convecção reprodutível em eletrodos estacionários montados em células de pequeno volume e facilidade de troca da matriz da amostra, usada na acumulação, por um eletrólito livre de interferentes na redissolução. Sistemas em fluxo também oferecem maior frequência operacional e repetibilidade que o controle manual das amostras e reagentes, além de simplificar a utilização de um sistema prévio de separação ou tratamento da amostra, p. ex. degradação fotocatalítica de materiais orgânicos e consequente liberação de íons metálicos complexados [54, 98].

Outro ponto importante na prática é a facilidade da passagem da etapa de tratamento de amostras para a de determinação dos analitos. Tratamentos eletroquímicos, quando não seguidos de voltametria, frequentemente permitem o acoplamento (ou hifenização) com outras técnicas de determinação, sendo a transferência facilitada em sistemas em fluxo.

Apesar das vantagens do uso da pré-concentração eletroquímica em quantificações por voltametria, esta técnica não está livre de problemas, como picos não resolvidos ou picos deformados ou desdobrados quando há formação de compostos intermetálicos [99], situações que podem ocorrer quando múltiplos metais são determinados. Eventualmente, combinações com outras técnicas podem levar à solução destes problemas, além de abrir outras possibilidades. Exemplos incluem a cromatografia e espectroscopia [56, 63]. Em CE os primeiros estudos

envolvendo este acoplamento para fins de pré-concentração de amostras foram realizados por Antunes-Jr. durante o desenvolvimento de sua tese de doutorado [84]. Nestes estudos Antunes-Jr. apresenta o novo conceito e chega a resultados exploratórios que evidenciam a potencialidade deste acoplamento EC-CE para pré-concentração de íons metálicos em sistema automatizado em fluxo.

Neste capítulo, dados sobre a utilização do sistema na pré-concentração de metais são apresentados. Inicia-se pela apresentação de resultados voltamétricos, prossegue-se com estudo eletroforético da separação de metais e, por fim, passa-se aos estudos realizados com o uso da célula eletroquímica acoplada ao equipamento de CE-C⁴D, acoplamento este denominado de EC-CE-C⁴D. O objetivo dos estudos iniciais é a familiarização com o comportamento de íons metálicos frente às duas técnicas (voltamétrica e eletroforética) para então proceder o desenvolvimento de aplicações em EC-CE-C⁴D.

5.2 Avaliação do comportamento voltamétrico de metais

Visando familiarização com a determinação de metais por stripping e a seleção de eletrólitos compatíveis com os sistemas de pré-concentração e eletroforético, alguns estudos exploratórios foram conduzidos com os metais Zn²⁺, Tl⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ em uma célula eletroquímica convencional (*in batch*) utilizando um potenciostato MicroAutolab III (Metrohm-Pensalab). Como eletrodo de trabalho escolheu-se carbono vítreo (disco de 4 mm de diâmetro); um eletrodo de Ag/AgCl, KCl_{sat} serviu como eletrodo de referência e um fio de Pt, como eletrodo auxiliar.

Em estudos voltamétricos, objetivando-se a minimização da corrente de migração dos analitos e a redução da queda ôhmica (IR), é comum o uso de eletrólitos com força iônica na faixa de 0,01 a 0,1 mol L⁻¹. Em CE, porém, a utilização de eletrólitos de alta condutividade pode trazer efeitos não desejados durante a aplicação da alta tensão. Um exemplo simples é a formação de bolhas no interior do capilar devido ao efeito Joule. Assim, visando compatibilizar as necessidades das duas técnicas, optou-se pela realização de testes voltamétricos (Figura 5.1) utilizando-se um eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de MES (Ácido 2-N-[Morfolino] etanosulfônico) e 30 mmol L⁻¹ de Histidina (His), eletrólito este comumente utilizado em separações por CE. Este eletrólito apresenta valor de pH = 6, que possibilitaria a hidrólise de alguns metais, não fosse a capacidade complexante dos seus constituintes, promovendo a estabilização destes metais em solução.

Figura 5.1. Voltamogramas em onda quadrada para os metais Zn²⁺, Tl⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺ (separadamente) em eletrólito MES e Histidina 20mM + HIBA 4mM. Concentração dos metais 1 mg·L⁻¹, eletrodo de trabalho de carbono vítreo com disco de 4 mm de diâmetro.

Pelos resultados acima expostos, em tampão MES/Histidina, comprovou-se a efetiva deposição e redissolução dos metais em estudo sobre eletrodo de carbono vítreo. Apesar da determinação não simultânea destes metais ser possível, é sabido que um experimento em conjunto para estes metais por voltametria de redissolução anódica (ASV), em certas condições, pode apresentar limitações referentes não só a formação de compostos intermetálicos [100], mas também a sobreposição de picos. Os voltamogramas apresentados na Figura 5.2, obtidos em tampão MES/histidina são referentes à deposição simultânea/redissolução consecutiva de metais sobre carbono vítreo e evidenciam a presença de picos deformados e com potencial deslocado frente ao obtido para os metais em separado, atribuível à formação de compostos intermetálicos.

Figura 5.2. Voltamogramas em onda quadrada para redissolução dos metais Zn^{2+} , Tl^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em eletrólito MES e Histidina 30 mM. Concentração dos metais $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, eletrodo de trabalho de carbono vítreo com disco de 4 mm de diâmetro. Tempo de deposição de 30 segundos, sob convecção, em potencial de -1,3 V.

Há de se considerar que a formação de compostos intermetálicos não é um fenômeno causado pelo eletrólito, apesar da influência que a complexação exerce

sobre o potencial de deposição/redissolução dos metais e sobre a composição dos produtos intermetálicos. Para comprovar isto, foram realizados experimentos em um eletrólito comumente utilizado em experimentos voltamétricos, tampão ácido acético/acetato pH 4.7. Os resultados destes experimentos são apresentados nas Figuras 5.3 e 5.4.

Figura 5.3. Voltamogramas em onda quadrada para redissolução dos metais Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em tampão acetato pH 4,7 . Demais condições idênticas às da Figura 5.2.

Figura 5.4. Voltamogramas em onda quadrada para redissolução dos metais Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em tampão acetato pH 4,7. Demais condições idênticas às da Figura 5.2.

É possível observar que nestas condições, também em tampão acetato ocorre a formação de compostos intermetálicos sobre o eletrodo. Uma das estratégias para redução da interferência de intermetálicos é a utilização de eletrodos modificados, por exemplo, pela deposição de um filme de Hg sobre carbono vítreo. Assim, para verificar a funcionalidade da técnica quando na utilização do filme de Hg, foram realizados experimentos de *stripping* para os metais em estudo. Com base nos resultados obtidos (Figura 5.5), pode-se afirmar que, com filme de Hg, a formação de composto intermetálico é mantida apenas para o par $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, os demais metais depositam-se como composto intermetálico com o próprio Hg (amalgama). O eletrodo de Hg em gota pendente é também comumente aplicado para este tipo de determinação. Como neste caso há maior volume de Hg permitindo difusão para o interior da gota, as concentrações dos metais são

menores (mas também o sinal, no *stripping*) atenuando, mas não eliminando a formação do intermetálico $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.

Figura 5.5. Voltamogramas de redissolução pela técnica de onda quadrada para os metais Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em tampão acetato pH 4,7. Concentração dos metais $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de Hg. Experimento iniciado com o metal Zn^{2+} . Tempo de deposição de 30 segundos, sob convecção, em potencial de -1,25 V.

5.3 Avaliação do comportamento eletroforético dos metais

Este tópico apresenta o comportamento eletroforético dos íons de alguns metais quanto à sua separação eletroforética. Para isto, iniciou-se a separação destes íons utilizando-se um tampão contendo MES e Histidina (pH 6,1). Este eletrólito, porém, não foi suficiente para a separação de todos os metais em estudo. Melhora foi alcançada mediante adição de um segundo complexante (Ácido α -Hidroxiisobutírico - HIBA) (Figura 5.6), complexante este de comum uso em separação de metais por CE [30, 31, 101].

Figura 5.6. Separação eletroforética de metais pesados em tampão MES/Histidina 20 mmol L⁻¹ + HIBA. Capilar de 75 µm com 81 cm (70 cm efetivo). Injeção eletrocinética por 5 s a 20 kV.

O tampão MES/Histidina pH 6 é comumente utilizado em CE-C⁴D, sendo que o aminoácido histidina atua como complexante para alguns metais. Devido à reduzida mobilidade dos componentes deste tampão a solução obtida apresenta baixa condutividade, o que evita linha base elevada e com deriva por efeito Joule. A adição de HIBA foi realizada como complexante auxiliar para promover a separação de Zn²⁺/Co²⁺/Cu²⁺, não possível com a utilização apenas de MES/Histidina. Com capilar de separação com comprimento inferior a 50 cm, a adição de HIBA é também necessária para a separação do par Zn²⁺/Cu²⁺.

Apesar da possibilidade de separar todos estes metais, é preciso lembrar que o estudo é dirigido ao acoplamento de um método de pré-concentração eletroquímico com a CE. Em um único procedimento não há como realizar uma pré-concentração eletroquímica para todos estes metais. Os metais Co²⁺ e Ni²⁺, por exemplo, são pré-concentrados por adsorção sobre Hg em um processo que

envolve a adição de um ligante (dimetilglioxima) e posterior determinação por stripping catódico. Já o Mn^{2+} , é comumente oxidado e depositado sobre o eletrodo na forma de óxido, o que exige a adoção de um potencial positivo para a pré-concentração, não condizente com os parâmetros utilizados para os demais metais. Optou-se então por restringir o estudo aos metais pré-concentráveis em potencial negativo e que são normalmente determinados por ASV. Juntamente com estes metais, buscou-se por incluir na separação outras espécies catiônicas que dispensam acumulação, dada a sua concentração em amostras, por exemplo, ambientais, tais como NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e Li^+ ; adicionalmente, íons de Tl^+ ou o Li^+ foram considerados para o papel de padrão interno (Figura 5.7).

Com a adição do K^+ e NH_4^+ a separação não foi eficiente, a mobilidade destas duas espécies é muito próxima à do Tl^+ . Na tentativa de resolver esta separação adicionou-se 18-Crown-6 ao eletrólito de corrida. É comum o uso desta espécie para a separação do par K^+ e NH_4^+ [28]. Como o Tl^+ possui mobilidade próxima a do K^+ , e também carga positiva unitária, imaginou-se que este também pudesse ser complexado pelo 18-Crown-6, o que poderia conferir resolução adequada à separação. Como observado na Figura 5.7, as constantes de formação dos complexos K^+/Crown e Tl^+/Crown parecem ser próximas, dado o deslocamento semelhante para as duas espécies em função da concentração de 18-Crown-6.

Figura 5.7. Separação de metais pesados com alcalinos, alcalinos terrosos e amônio em eletrólito MES/Hist (30/30 mmol L⁻¹). Avaliação da adição do éter coroa 18-Crown-6 ao eletrólito. Picos: 1: NH₄⁺, 2: K⁺, 3: Tl⁺, 4: Ca²⁺, 5: Na⁺, 6: Mg²⁺, 7: Li⁺, 8: Pb²⁺, 9: Cd²⁺, 10: Zn²⁺, 11: Cu²⁺.

Nesta sequência da figura é possível notar também que a resolução do par Na⁺/Mg²⁺ foi prejudicada devido ao aumento do tempo de migração do Na⁺ em função da elevação da concentração de 18-Crown-6. Por último, optou-se por aumentar o tempo de separação por meio da adição de etanol ao eletrólito [102], com possível efeito também sobre o grau de solvatação das espécies (Figura 5.8 – A e B).

Figura 5.8. Separação de metais pesados com alcalinos, alcalinos terrosos e amônio em eletrólito MES/Hist/18-Crown-6 (30/30/4 mmol L⁻¹). A: avaliação da adição de etanol ao eletrólito; B: Melhor separação obtida.

É conhecida a alteração da mobilidade do fluxo eletroosmótico (EOF) por aditivos [102], neste exemplo o etanol. Com a redução da mobilidade do EOF, o tempo de permanência das espécies no interior do capilar é aumentado e estas

podem alcançar melhor separação, porém, maior alargamento dos picos ocorre, o que acaba por prejudicar então a eficiência de separação. A melhor separação para este grupo de espécies foi conseguida com a adição de 4 mmol L⁻¹ de 18-Crown-6 e 2,5% de etanol ao eletrólito contendo MES/Hist 30/30 mmol L⁻¹. É possível notar que o etanol não apenas reduziu a mobilidade do EOF, mas também alterou a mobilidade do Na⁺ (provavelmente pela alteração da solvatação deste íon), possibilitando melhor separação do par Na⁺/Mg²⁺.

Um ponto também recorrente para o aumento de sensibilidade e resolução em separações por CE, o *stacking* [15, 16, 103], foi considerado durante os estudos. Para isto, foram realizadas separações onde a amostra era diluída em H₂O e posteriormente em soluções contendo concentrações variadas do eletrólito de corrida (Figura 5.9).

Figura 5.9. Diluição dos padrões de metais pesados em diferentes matrizes e separação eletroforética em tampão MES/Histidina 20 mmol L⁻¹ para a avaliação do efeito de *stacking*. Capilar de 75 µm com 60 cm (50 cm efetivo).

Neste estudo, é possível comprovar a compactação dos analitos em função da menor condutividade relativa do plugue de líquido contendo amostra, resultando em maior campo elétrico, com migração acelerada até a fronteira com o eletrólito de corrida. Do ponto de vista analítico (resolução do par crítico $\text{Pb}^{2+}/\text{Cd}^{2+} \geq 1,5$), a proporção de eletrólito de corrida no plugue de amostra é tolerável até o limite de 25%, acima da qual a eficiência de separação é drasticamente prejudicada. Como o eletrólito de corrida utilizado neste experimento foi MES/Hist 20/20 mmol L⁻¹, a concentração final possível para diluição da amostra foi de MES/Hist 5/5 mmol L⁻¹. Obviamente, caso a concentração do BGE seja alterada, a condutividade permitida para a amostra será 25% do novo valor.

O objetivo deste estudo foi encontrar uma condição adequada para a redissolução dos metais, para posterior adoção no sistema em fluxo com possibilidade de troca de matriz da amostra após a pré-concentração. Considerando-se apenas a CE, a melhor condição seria a redissolução dos metais em água pura, porém, a queda ôhmica seria muito elevada e o controle potencioestático poderia não funcionar. Assim, a concentração do eletrólito utilizado para redissolução dos metais nos experimentos de pré-concentração deve ser sempre a máxima permitida, ou seja, a solução de redissolução foi preparada pela diluição de 4x da solução utilizada para a separação (BGE).

5.4 Pré-concentração seguida de separação por CE

Neste capítulo, condições, resultados e discussão referentes à deposição eletroquímica em fluxo seguida de separação eletroforética são apresentadas. O procedimento para realização dos experimentos corresponde ao apresentado nas Figuras 4.20 e 4.21, sendo os parâmetros como tempo de deposição, vazão de soluções e potenciais indicados nas legendas das Figuras a seguir.

Inicialmente, o processo de pré-concentração acoplado ao CE foi realizado com uma célula eletroquímica equipada com um eletrodo de referência Ag/AgCl KCl_{sat}. Porém, a utilização deste eletrodo muito próximo ao de trabalho mostrou-se inviável porque o eletrólito, KCl, que difundia da junção líquido-líquido para o interior da célula, acabava migrando para o interior do capilar durante a separação eletroforética (Figura 4.3), resultando em intensa deriva de linha base. Como alternativa, passou-se a avaliar e empregar uma célula com eletrodo de pseudo-referência sob forma de disco de Ag de 2 mm de diâmetro recoberto com AgCl (trata-se da seção de um fio de Ag embutido no bloco superior, como descrito na seção 4.2.1).

Eletroferogramas obtidos após a deposição de cobre por tempos crescentes seguida de redissolução e separação eletroforética, são apresentados na Figura 5.10. A quantidade de cobre depositada no eletrodo de trabalho a partir de solução em fluxo é diretamente proporcional ao tempo de acumulação, fato comprovado pela determinação da altura e da área dos picos voltamétricos de redissolução. Como a redissolução é promovida rapidamente e com o fluxo interrompido, é de se esperar

que a concentração de íons de cobre no pequeno volume de eletrólito delimitado pela camada delgada acima do eletrodo de trabalho seja diretamente proporcional ao tempo de acumulação, vez que a dispersão gradual por difusão no perímetro do eletrodo é lenta). Decorre daí que também a alíquota aspirada desta região para o interior do capilar (injeção da amostra) venha a produzir sinal com área do pico diretamente proporcional não só à concentração original de cobre como ao tempo de acumulação do metal, como se verifica na Figura 5.11, quadrante superior direito.

Figura 5.10. Pré-concentração eletroquímica em -1 V de íons Cu^{2+} $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ solubilizados em eletrólito MES/His 30 mmol L^{-1} (BGE) seguida de redissolução em potencial de 1,3 V em BGE diluído 4 vezes, injeção hidrodinâmica no capilar e separação eletroforética (20 kV). Eletrodo de trabalho e auxiliar de carbono vítreo (discos de 3 mm de diâmetro), eletrodo pseudo-referência de disco de Ag de 2 mm recoberto com AgCl. Vazão de $150 \mu\text{L min}^{-1}$ de amostra durante a pré-concentração. Capilar de $75 \mu\text{m}$ com 40 cm de comprimento (27 cm até o detector). Os tempos de pré-concentração são apresentados na Figura.

Nos experimentos iniciais, o potencial selecionado para a redissolução do cobre depositado sobre o eletrodo foi de 1,3 V frente ao eletrodo de pseudo-referência. Nesta condição, além do sinal referente ao Cu^{2+} , três picos adicionais foram observados nos eletroferogramas, como ilustrado na Figura 5.11. Distintamente do metal, a área destes picos A, B e C não aumenta de forma linear com o tempo de acumulação. Outras diferenças importantes: os picos A, B e C não aparecem se a redissolução é feita em potencial inferior a 0,6 V ou ainda se não houver cobre algum na solução inicial. Há, pois, indícios de que se trata de produtos de oxidação do próprio eletrólito, constituído de tampão MES/His e, como as novas espécies separadas e detectadas apresentam tempo de migração curto (saem antes do EOF), se tratam de espécies catiônicas.

Aparentemente o metal sobre o eletrodo de carbono vítreo atua como um catalisador da oxidação antes de ser redissolvido. Apesar de as espécies detectadas não terem sido identificadas e estudadas no decurso da tese, estas observações inspiraram trabalhos apresentados no capítulo 6, onde o sistema EC-CE é utilizado como ferramenta para investigação de processos de oxidação sobre eletrodo seguida de separação eletroforética.

Figura 5.11. Deposição de Cu^{2+} em superfície de carbono vítreo seguida de redissolução ($\sim 1\text{V}$ vs. Ag/AgCl , KCl sat.) em solução tampão MES/Histidina. Picos A, B e C, decorrentes da oxidação do eletrólito, guardam relação não linear com com quantidade de cobre sobre o eletrodo.

Sendo possível a visualização de sinal para o íon Cu^{2+} , testes foram conduzidos para a avaliação do sistema na determinação deste metal quando na presença de concentração elevada de metais como K^+ ou Na^+ (comumente encontrados em amostras reais, como ambientais). Para isto, uma solução contendo

1 mg·L⁻¹ de Cu²⁺ solubilizado em tampão MES/Hist 30/30 mmol L⁻¹ contendo também 10 mmol L⁻¹ de KCl foi injetada diretamente no capilar. O metal Cu²⁺ proveniente desta solução foi novamente injetado no capilar da CE, porém, antes da injeção, este metal foi depositado sobre eletrodo com posterior troca de matriz (propulsão da solução matriz contendo MES/Hist e KCl para fora da célula eletroquímica com substituição desta por uma solução contendo apenas tampão MES/Hist diluído) e redissolução. É possível a visualização dos dados destes experimentos na Figura 5.12, onde antes da troca de matriz (ou *cleanup*), verifica-se intenso pico para o K⁺.

Figura 5.12. Efeito do procedimento de pré-concentração e *cleanup* sobre o sinal do cobre em uma separação eletroforética. Condições como na Figura 5.10.

É possível notar nos eletroferogramas da Figura que não só houve ganho de sinal com a acumulação do Cu^{2+} como, após a realização do procedimento de *cleanup*, o pico referente ao potássio foi drasticamente reduzido. O pico proveniente do registro do EOF também sofreu alteração, passou de um pico positivo para um vale, ou seja, a condutividade do plugue de amostra passou a ser inferior à do eletrólito de corrida, enquanto que antes da realização da troca de matriz (*cleanup*) era superior.

Como já explicado na seção e ilustrado na Figura 4.17, mediante a lapidação da extremidade do capilar em bisel com diferentes ângulos, foi possível definir o distanciamento médio de 25, 50, 75, 100 e 150 μm entre as partes (orifício do tubo capilar/eletrodo de trabalho). Experimentos de determinação de Cu^{2+} em cada uma destas condições produziram os dados de área de pico representados na Figura 5.13, evidenciando ser mais favorável o distanciamento de 50 μm , adotado no restante da tese. Matysik também escolheu o afastamento de 50 μm em trabalhos publicados [76, 77], porém, não descreveu o motivo pelo qual escolheu esta distância.

Figura 5.13. Avaliação de intensidade de sinal (área de pico) frente o distanciamento entre a entrada do capilar e o eletrodo de trabalho para experimentos envolvendo o uso do sistema EC-CE-C⁴D na deposição de Cu²⁺. Condições como na Figura 5.10.

Para avaliação do melhor momento para realização da injeção no capilar de separação do material redissolvido, o procedimento de deposição/redissolução/injeção no CE foi realizado com o metal Cu²⁺, porém, imediatamente após o início da redissolução e previamente a injeção, aguardou-se um período para que o metal redissolvido pudesse difundir no interior da célula. Os dados referentes a estes experimentos, assim como os eletroferogramas, são apresentados na Figura 5.14.

Figura 5.14. Avaliação de intensidade do sinal (área de pico de Cu^{2+} $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) vs. tempo de difusão (tempo entre o início do processo de redissolução e o início da injeção no capilar de separação do CE. Condições como na Figura 5.10, exceto tamanho de capilar ($75 \text{ }\mu\text{m d.i.} \times 55 \text{ cm} \times 37 \text{ cm}$ efetivo). Injeção hidrodinâmica de 30 s e $20 \text{ cm H}_2\text{O}$.

Os dados obtidos indicam que, após a redissolução do metal, o material deve ser imediatamente injetado no capilar. Com o uso de eletrólito suficiente, capilar de Luggin, realimentação positiva para compensar iR e potenciostato com alta complância e capacidade de corrente, o tempo necessário para redissolução de metal sobre eletrodo pode ser da ordem de ms ou menos. Embora estes requisitos não sejam atendidos aqui, deve-se considerar que o tempo de injeção (30 s) é muito superior ao necessário para a reoxidação. Com a entrada do capilar à distância de $50 \text{ }\mu\text{m}$ do eletrodo de trabalho, aguardar tempo adicional possibilita que o material difunda para regiões mais distantes do ponto de injeção e com isso seja introduzida solução com concentração menor no capilar. Assim, o sinal obtido apresentou redução de intensidade de até $2/3$ quando comparado com o resultado de um experimento onde o processo de injeção foi iniciado simultaneamente com a redissolução.

Com base nos experimentos realizados, condições experimentais para o sistema EC-CE-C⁴D foram ajustadas e a deposição de Pb²⁺ e Cd²⁺, separadamente, foram realizadas (Figuras 5.15 e 5.16).

Figura 5.15. Avaliação de intensidade do sinal com o sistema EC-CE-C⁴D (área de pico para o metal Pb²⁺ 1 mg·L⁻¹) vs. tempo de pré-concentração. Condições como na Figura 5.10.

Figura 5.16. Avaliação do efeito do tempo de pré-concentração de Cd²⁺ 1 mg·L⁻¹. Sistema EC-CE-C⁴D operado nas condições como na Figura 5.10, exceto tamanho de capilar, alterado para 60 cm (40 cm até o detector).

Apesar dos resultados apresentados na Figura, o sistema se mostrou pouco reprodutível. Em alguns experimentos, o sinal dos metais sequer era observado. Ao

se tentar a deposição conjunta dos três metais, não se detectou sinal durante separação eletroforética.

Com os resultados acima, o foco foi então direcionado para o aperfeiçoamento da célula visando controle mais preciso do potencial do eletrodo de trabalho sob operação potencioestática. As principais alterações introduzidas foram a redução do diâmetro do eletrodo pseudo-referência de 2 para 0,5 mm de diâmetro e o posicionamento deste o mais próximo possível da extremidade do capilar no bloco superior da célula, conseqüentemente, mais próximo do centro do eletrodo de trabalho embutido no bloco inferior (Figura 4.1). Como apresentado na Figura 5.17, foram realizados experimentos com a célula eletroquímica aperfeiçoada para a pré-concentração e separação eletroforética de Cu^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} , simultaneamente, observando-se correlação linear entre a área dos picos e o tempo de pré-concentração dentro da faixa avaliada. Como será apresentado a seguir, o mesmo comportamento foi observado nas demais aplicações. Assim, esta nova célula foi utilizada durante o desenvolvimento do restante dos trabalhos aqui apresentados.

Figura 5.17. A: Eletroferogramas obtidos após pré-concentração eletroquímica dos metais Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} sobre eletrodo de carbono vítreo por tempos que variaram de 1 a 10 min em potencial de -1,2V, seguido de redissolução em $E = 0,4\text{V}$; B: Reta construída com as áreas dos picos resultantes da separação; C: Voltamograma em onda quadrada dos três metais Pb^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} no mesmo eletrodo, mostrando a deficiência de separação dos picos.

Na Figura 5.17 inseriu-se ainda, para efeito de comparação, um voltamograma obtido em experimento realizado *in batch* com eletrodo de carbono vítreo para os três metais em estudo. É importante citar que a deposição dos metais continua resultando na formação de compostos intermetálicos sobre o eletrodo, como evidenciado pelo perfil do voltamograma, mas isto em nada afetou a separação eletroforética. Antes da injeção no capilar, estes intermetálicos são totalmente oxidados aos seus respectivos íons metálicos pela escolha de potencial suficientemente positivo, podendo ser separados por CE e não interferindo assim nos dados obtidos pelo C⁴D.

Apesar de as retas ajustadas aos dados da Figura 5.17 apresentarem coeficiente de correlação acima de 0,997 para os três metais, com tempo de pré-concentração superior a 10 min certo desvio de linearidade pode ser observado (Figura 5.18) sem, todavia, inviabilizar o uso da curva analítica nesta região, se necessário para ganhar sensibilidade. Não se investigou qual o limite de linearidade para concentrações menores dos metais, o que poderia ajudar a esclarecer se o desvio ocorre devido à saturação do eletrodo com os metais ou algum outro fenômeno.

Figura 5.18. Correlações de área de pico vs. tempo de pré-concentração para os metais Pb²⁺, Cd²⁺ e Cu²⁺ 1 mg·L⁻¹ solubilizados em MES/Histidina 30/30 mmol L⁻¹ + HCl 10 mmol L⁻¹. Vazão de amostra de 0,15 mL min⁻¹. Capilar de 75 µm 45 cm de comprimento e potencial de 20 kV. Potencial de deposição de -1,2 V e red. de 0,4 V. Corrida em MES/Histidina 30/30 mmol L⁻¹. Demais condições como na Figura 5.10.

Experimentos para avaliação do sinal em função da concentração para a deposição simultânea dos três metais foram também realizados e os resultados, reunidos nas Figuras 5.19 - A e B.

Figura 5.19. A: Eletroferogramas obtidos para os metais Pb²⁺, Cd²⁺ e Cu²⁺ em concentrações crescentes; B: Curva analítica apresentando de área de pico vs. concentração para os mesmos metais solubilizados em MES/Histidina 30/30 mmol L⁻¹ + HCl 10mmol L⁻¹ — vazão de amostra de 0,75mL min⁻¹ e tempo de pré-concentração de 6 min. Capilar de 75um 45cm de comprimento e potencial de 20kV. pot. de deposição de -1,2V e red. de 0,4V. Corrida em MES/Histidina 30/30 mmol L⁻¹. Demais condições como na Figura 5.10.

É possível observar na Figura que os picos apresentam-se bem resolvidos (resolução maior que 1,5). As curvas analíticas resultantes são lineares, exceto para maiores concentrações de Cd²⁺ (1.0 mg·L⁻¹) e Cu²⁺ (0.5 mg·L⁻¹), todas com coeficiente linear bem próximo a origem e coeficiente de correlação maior que 0,998. Replicatas no meio da curva, com n = 5 e sem o uso de padrão interno, apresentaram desvio padrão relativo de não mais que 5% para todos os metais.

Ante os resultados favoráveis com soluções contendo Cu^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} , passou-se a acrescentar íons de Tl^+ e Zn^{2+} . Inicialmente avaliou-se o comportamento destes metais sobre eletrodos de Pt, Au e carbono vítreo. Os eletroferogramas obtidos com cada um destes eletrodos são apresentados na Figura 5.20. Os eletrodos de carbono vítreo e Au foram efetivos para a acumulação/redissolução dos 5 metais, com pequena diferença entre os sinais, enquanto o eletrodo de Pt só funcionou bem para Tl.

Figura 5.20. Eletroferogramas obtidos para os metais Tl^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ solubilizados em MES/Histidina $30/30 \text{ mmol L}^{-1}$ + HCl 10 mmol L^{-1} – vazão de amostra de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de pré-concentração de 6 min. Pré-concentração em $-1,2 \text{ V}$ sobre eletrodos de Pt, Au e carbono vítreo (GC). Redissolução em $0,4 \text{ V}$ em eletrólito diluído 4 vezes. BGE: 30 mmol L^{-1} MES + 30 mmol L^{-1} HIS and 5 mmol L^{-1} HIBA. Capilar de 80 cm (69 cm efetivo) e potencial de separação de 30 kV.

Devido às dimensões reduzidas da célula eletroquímica em fluxo (figura 4.1), que acomoda somente cerca de $4,5 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de condutância relativamente baixa no canal entre os eletrodos auxiliar e de trabalho (discos de 3 mm de diâmetro,

coplanares e afastados 3 mm um do outro), os desvios da condição de superfície isopotencial do eletrodo de trabalho podem se acentuar com o aumento da densidade de corrente durante a pré-concentração e, especialmente, na redissolução “potenciostática” simultânea dos metais. A “sombra” ou “blindagem” do capilar para eletroforese, que é colocado em contato com o eletrodo de trabalho também pode contribuir para a não uniformidade de potencial. Observando a Figura 4.18 fica evidente que basta girar o capilar para orientar o orifício na ponta lapidada em bisel em diferentes direções. Para averiguar se a composição da amostra introduzida no capilar (mediante aspiração de alguns nanolitros da solução a cerca de 50 μm do eletrodo) é influenciada por esta orientação, efetuou-se uma série de experimentos diferindo somente no ângulo de rotação do capilar, variado em quatro incrementos de 90°. Os dados deste experimento são apresentados na Figura 5.21, revelando o direcionamento do orifício do capilar para o eletrodo auxiliar como sendo a melhor opção.

Figura 5.21. Áreas dos picos dos metais em função do direcionamento do orifício no corte em bisel da extremidade do capilar (orifício voltado para o eletrodo auxiliar, tal como representado na Figura 4.18, foi definido como ângulo de 0°). Pré-concentração em eletrodo de carbono vítreo. Demais condições como na Figura 5.19.

Para os metais com potencial de redução menos negativo do grupo (p. ex. Cu^{2+}), pouca alteração do sinal em função desta variável foi observada, porém, para o metal de potencial de redução mais negativo do grupo (Zn^{2+}), a variação é acentuada ao ponto de, para o ângulo de 180° , não se observar o sinal (inferior ao LD). Por ser o zinco, entre os metais presentes, o mais difícil de reduzir e o mais fácil de re-oxidar, infere-se que na região do eletrodo de trabalho mais distante do eletrodo auxiliar, o potencial não é suficientemente negativo para promover a redução eficiente. Todavia, como já se observa elevação de corrente por concomitante formação de hidrogênio, para evitar a formação de bolhas, não se pode aplicar potencial mais negativo. Assim, para os demais experimentos apresentados nesta tese, foi adotada a orientação de 0° , ou seja, exatamente como representada na Figura 4.18.

Ainda como etapa de avaliação de condições satisfatórias para realização dos experimentos, apresenta-se na Figura 5.22 dados de área de pico em função da vazão utilizada para propelir a amostra pela célula eletroquímica durante o processo de deposição.

Figura 5.22. Avaliação da área de pico em função da vazão de amostra para os metais Tl⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺ 1 mg·L⁻¹. Bomba solenóide de 5 µL por pulso foi utilizada para propulsão da amostra. Demais condições como na Figura 5.19.

Experimentos comprovando a compactação dos picos eletroforéticos causada pelo efeito de *stacking* foram já apresentados no capítulo 5 seção 1.3, mas sem o auxílio da pré-concentração eletroquímica (a solução contendo os íons de interesse apresentava concentração suficientemente elevada para quantificação por C⁴D). Resultados com o sistema EC-CE-C⁴D completo em operação são apresentados na Figura 5.23. Nestes experimentos, a redissolução dos metais foi feita no próprio eletrólito de corrida (eletroferograma a) e em um eletrólito de corrida diluído de 4 vezes (eletroferograma b), deixando patentes os benefícios do *stacking* observado em b.

Figura 5.23. Avaliação do efeito de *stacking* sobre o sinal dos metais TI^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. a: redissolução realizada no eletrólito de corrida; b: redissolução realizada no eletrólito de corrida diluído de 4 vezes. Demais condições como na Figura 5.19.

Entre as qualidades do sistema EC-CE- C^4D tem-se a facilidade de alteração de parâmetros e controle independente das técnicas disponíveis, proporcionando elevada flexibilidade ao sistema e permitindo vislumbrar outras aplicações além da pré-concentração eletroquímica ou de *cleanup* seguido de separação por CE. O próprio potenciostato com célula em fluxo pode funcionar como uma primeira etapa de separação, vez que os metais, com base em seus potenciais de redução, podem ser depositados ou redissolvidos seletivamente, sendo ainda possível alterar a ordem dos potenciais condicionais de redução mediante escolha de complexantes. Neste contexto, partiu-se para a demonstração experimental da aplicação desta estratégia em separações bidimensionais. A idéia deste tipo de experimento é buscar por mais um mecanismo de separação durante uma análise. Isto pode ampliar a aplicabilidade da técnica a amostras complexas na pesquisa e em

laboratórios para análise de rotina, a exemplo do que já acontece com acoplamentos de outras técnicas com CG-CG, CG-IMS, CG-MS e HPLC-MS.

Um conjunto de eletroferogramas obtidos após a deposição eletroquímica em potenciais decrescentes (de $-0,6$ a $-1,6$ V) é apresentado na Figura 5.24. Neste experimento, a separação dos metais Zn^{2+} , Tl^+ , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} foi realizada em conjunto com alguns metais alcalinos e alcalinos terrosos (Ba^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e Li^+). Pensando em um sistema bidimensional, a primeira dimensão é dada pela variação do potencial de deposição na célula voltamétrica, proporcionando uma separação prévia a eletroforética. Dependendo do potencial, promove-se a deposição de algumas espécies, enquanto as demais são mantidas em solução e transportadas para fora da célula. Após a deposição seletiva, os metais podem ser redissolvidos na própria matriz da amostra ou noutra solução, dependendo da aplicação, como evidenciado na Figura 5.24, em que somente para obtenção do primeiro eletroferograma houve troca de eletrólito (sem os metais alcalinos e alcalino terrosos) antes da redissolução.

Figura 5.24. Avaliação do sistema em separações bidimensional de metais. Potencial de deposição variado entre -0,6 e -1,6V. Potencial de redissolução de 0,4V. Demais condições como na Figura 5.19.

Quando a deposição foi efetuada em -0,6 ou -0,7 V é verificado sinal eletroforético apenas para o metal Cu^{2+} . À medida que o potencial de deposição é deslocado no sentido negativo, os demais metais são visualizados nos eletroferogramas. A sequência de deposição Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Tl^{+} e Zn^{2+} corresponde à prevista com base nos seus respectivos potenciais de meia onda. Comparação dos eletroferogramas obtidos com deposição em -1,6V com e sem troca de matriz ilustra a efetividade desta estratégia de *cleanup*, ao definir um método analítico.

O sistema de controle de soluções automatizado facilita a programação da redissolução dos metais depositados sobre o eletrodo na matriz original (todos os eletroferogramas exceto o primeiro da Figura 5.24) ou em uma segunda matriz livre de interferentes. Obviamente, pode-se também programar o tempo de deposição

dos metais em mais de um potencial, caso o(s) mais facilmente eletroreduzível(eis) esteja(m) em menor concentração, ou ainda, deixar desligada a célula eletroquímica e obter um eletroferograma revelando apenas as espécies presentes acima do limite de detecção, ou seja, tirando proveito da flexibilidade de programação do sistema também no modo FIA-CE-C⁴D. A separação bidimensional pode ser obtida também pela variação do potencial de redissolução dos metais. Neste caso (Figura 5.25), ao término da deposição em potencial suficientemente negativo para promover a redução de todos os metais acessíveis e de interesse sobre o eletrodo de trabalho, opta-se por realizar a redissolução controlada de alguns em potenciais intermediários ao da redissolução de todos os metais. Para redissolução apenas de Zn²⁺, por exemplo, basta realizar a redissolução em potencial onde os demais metais permaneçam sobre o eletrodo na forma metálica e não sejam redissolvidos em solução. Após a redissolução seletiva e injeção dos íons formados no capilar de separação eletroforética, realiza-se a redissolução total dos metais e limpeza da célula eletroquímica através da passagem de eletrólito de corrida. Isto é necessário, pois, caso o depósito metálico permaneça sobre o eletrodo de trabalho, durante a separação, os metais são quimicamente oxidados (e.g., não se procedeu à remoção de oxigênio dissolvido) e migram para o interior do capilar de separação promovendo perturbação na linha de base registrada pelo C⁴D.

Figura 5.25. Avaliação do sistema em separações bidimensional de metais. Potencial de redissolução variado entre -1,4 e 0,2V. Potencial de deposição de -1,6V. Demais condições como na Figura 5.21.

Assim como apresentado para a Figura 5.24, a ordem de visualização dos metais nos eletroferogramas (Zn²⁺, TI⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺) pode ser prevista por seus respectivos potenciais de meia onda, porém, deve-se lembrar que neste caso a ordem é prevista por meio da avaliação do potencial de redissolução e não de deposição. Não se pode ignorar a possibilidade de formação de compostos intermetálicos, como os ilustrados na Figura 5.2, nesta modalidade de separação bidimensional que, aliás, pode ser de grande utilidade para elucidar estudos da composição destes mesmos compostos intermetálicos.

A tabela 5.1 apresenta valores de fator de pré-concentração, LD, desvio padrão relativo e coeficiente de correlação para um experimento de pré-concentração de solução padrão contendo 0,8 mg·L⁻¹ dos metais TI⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺ e 0,4 mg·L⁻¹ of Cu²⁺. Estes dados foram obtidos pela pré-concentração destes

metais por 6 minutos sob vazão de amostra de 1 mL min⁻¹. Nestas condições, fator de pré-concentração em torno de 50 vezes foi obtido para todas as espécies, exceto Zn²⁺ (16 vezes).

Tabela 5.1. Figuras de mérito para experimentos em EC-CE-C⁴D com os metais Zn²⁺, TI⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺.

Metal	LD (µg L ⁻¹) (3 δ)	Fator de pré-concentração	DPR % 7 replicatas	r ²
TI ⁺	1,8	46	3,78	0,993
Pb ²⁺	3,1	55	3,7	0,996
Cd ²⁺	2,7	52	1,85	0,998
Zn ²⁺	3,8	16	0,95	0,998
Cu ²⁺	1,5	48	3,34	0,999

Dados calculados a partir de uma solução contendo 0.8 mg·L⁻¹ de TI⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ e Zn²⁺ e 0.4 mg·L⁻¹ de Cu²⁺. Tempo de pré-concentração de 6 min, fluxo de amostra de 1,0 mL min⁻¹ [78]. Demais condições como na Figura 5.21. Experimentos realizados com tempo de pré-concentração de 10 min. apresentaram fator de pré-concentração de até duas ordens de grandeza [79] para alguns dos metais.

Curvas de calibração obtidas para a determinação simultânea destes 5 metais (Figura 5.26) apresentaram perfil linear para concentração de até 1 mg·L⁻¹ para todos os metais, exceto Cu²⁺ (0,5 mg·L⁻¹). Experimentos para concentrações superiores não foram realizados, nestes casos, basta injeção direta da amostra sem a necessidade de pré-concentração. Pode-se também optar pela diluição da amostra.

Figura 5.26. Curvas de calibração obtidas pelo sistema EC-CE-C⁴D para os metais Zn²⁺, TI⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ e Cu²⁺. Condições como na Figura 5.22.

6 Aplicação do sistema EC-CE-C⁴D em processos de oxidação de álcoois

6.1 Introdução

Este capítulo destina-se a evidenciar a potencialidade do sistema EC-CE-C⁴D como ferramenta de investigação e monitoramento de espécies geradas durante processo de oxidação eletroquímica, assim como para a definição de métodos analíticos fundamentados nestes processos. O sistema foi aplicado na derivatização de álcoois de cadeia curta visando a separação e detecção dos respectivos carboxilatos formados durante a oxidação, o que possibilita separação e quantificação indireta de espécies neutras como álcoois em amostras reais. Outra vertente do trabalho consistiu no acompanhamento dos produtos formados na oxidação de glicerol.

Pensando na formação de espécies carregadas pela oxidação química de álcoois, é preciso levar em conta que este tipo de oxidação depende da adição em excesso de reagentes oxidantes fortes, o que aumenta o número de espécies químicas a serem separadas. Já a derivatização por oxidação eletroquímica representa uma alternativa mais limpa, pois requer apenas a adição de eletrólito para favorecer a manutenção do potencial e passagem de corrente.

A oxidação eletroquímica de álcoois apresenta-se, pois, como alternativa frente aos processos químicos ou enzimáticos. Neste contexto, a voltametria é

universalmente utilizada para avaliação de processos sobre eletrodo [97], sendo também muitas vezes auxiliada por técnicas como amperometria, coulometria, etc. Embora o uso destas técnicas eletroquímicas seja amplamente difundido, todas apresentam limitações, principalmente com relação à resolução e à velocidade de resposta. Diferentes espécies podem apresentar o mesmo perfil de sinal, dificultando a identificação de intermediários de reação e produtos formados no eletrodo, ensejando a utilização de técnicas complementares para este propósito bem como para acompanhar os seus perfis de concentração ao longo do tempo.

Com relação à identificação dos produtos formados, é comum realizar o processo de oxidação eletroquímica em batelada com posterior identificação dos produtos por espectrometria de massas (MS). Porém, a relação área de eletrodo de trabalho pelo volume de solução para processos em batelada pode ser desfavorável, tornando o processo relativamente lento quando comparado a processos de oxidação em camada delgada (comumente utiliza-se tempo de oxidação maior que 1 hora para que a eficiência de conversão seja aumentada em processos em batelada). Intermediários com tempo de meia vida de alguns minutos ou menor podem, pois, passar despercebidos. O acoplamento direto entre a célula eletroquímica e o MS é também utilizado, servindo de exemplo a DEMS (Differential Electrochemical Mass Spectroscopy) [104, 105]. Esta técnica envolve o uso de uma membrana microporosa de teflon permeável a gás posicionada entre o eletrodo de trabalho e a área de pressão reduzida do espectrômetro. Espécies de baixa polaridade, desde que gasosas ou voláteis, são aspiradas através da membrana de teflon para a região de baixa pressão do MS, volatilizadas, introduzidas no MS e então detectadas. Devido ao caráter hidrofóbico da membrana, a passagem da fase

aquosa, assim como espécies hidrofílicas, pelos microporos é impedida ou minimizada. Como no processo o MS é acoplado diretamente com a célula voltamétrica, é possível obter dados do MS durante o decorrer de um voltamograma. Técnicas espectroscópicas (p.ex.: absorção no IV [106-108] e Raman [109]) são também utilizadas para este propósito.

A eletroforese capilar (CE) com detecção espectrofotométrica ou eletroquímica vem competindo com as técnicas cromatográficas de separação em vários campos de aplicação, mas raramente, como etapa subsequente a processos eletroquímicos [75-78, 81, 82, 85, 86]. Neste contexto, o sistema desenvolvido e apresentado no capítulo 4 permite alteração de parâmetros tanto eletroforéticos e voltamétricos como de controle de fluxo, sendo que a oxidação pode ser realizada em microescala e em tempos relativamente curtos.

Com relação ao processo de derivatização, considerando-se um álcool primário, o processo para oxidação levando ao correspondente carboxilato envolve a remoção de 4 elétrons, mas, durante a oxidação, espécies como aldeídos ou CO_2 podem também ser formadas. Como exemplo, a Figura 6.1 apresenta espécies formadas durante a oxidação do etanol e o número de elétrons envolvidos em cada etapa.

Figura 6.1. Possíveis espécies formadas a partir da oxidação do etanol acompanhadas do número de elétrons envolvidos em cada etapa [110].

Há de se considerar também a oxidação de álcoois secundários ou poliálcoois. Neste contexto, optou-se por utilizar o glicerol como composto modelo.

O glicerol é uma molécula que tem despertado muito interesse nos últimos anos, principalmente devido ao aumento significativo da sua oferta como um subproduto excedente da fabricação do biodiesel [111]. O desenvolvimento de estratégias para a conversão deste composto em outras espécies de maior valor agregado é um campo de pesquisa ativo, sendo sua oxidação uma estratégia de conversão amplamente utilizada [112] e capaz de gerar espécies úteis como intermediários ou produtos para a indústria. Avaliando a estrutura do glicerol é possível afirmar que o processo de conversão por oxidação pode gerar um grande número de espécies, dentre estas alguns ácidos carboxílicos de 1, 2 ou 3 carbonos.

Na Tabela 6.1, reuniu-se a fórmula estrutural e dados de pKa e mobilidade iônica do glicerol e de possíveis compostos gerados na oxidação desta molécula. Como o foco deste trabalho é a separação eletroforética envolvendo apenas mecanismos de mobilidade iônica dos compostos gerados, não se incluiu espécies neutras possivelmente geradas durante a oxidação; todavia, estas podem ser separadas por eletroforese capilar por meio de derivatização química ou técnicas envolvendo o uso de micelas (MEKC), estratégias estas fora do escopo deste trabalho.

Tabela 6.1 – Glicerol e espécies ionizáveis com possibilidade de formação durante o processo de oxidação desta molécula.

Espécie	Estrutura química	pKa (s)	Mobilidade (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)
Glicerol		Neutra	Neutra
Ácido Glicérico		3,74	36,4
Ácido Tartrônico		2,37/4,74	36/68,3

Ácido Hidróxipirúvico		2,57*	?
Ácido Mesoxálico		1,82/3,52*	?/?
Ácido Glioxílico		3,34	39,6
Ácido Glicólico		3,89	42,4
Ácido Oxálico		1,27/4,27	42,4/77
Ácido Fórmico		3,75	56,6

Ácido Carbônico		6,35/10,33	46,1/71,8
Valores de pKa e mobilidade obtidos da tabela disponível no programa PeakMaster [29] (baseado na tabela de Takeshi Hirokawa [113]). * Valores obtidos pelo Website Chemicalyse [114].			

6.2 Estudos de avaliação da queda ôhmica para correção de potencial

Para os experimentos envolvendo a pré-concentração de metais sobre a superfície de eletrodos seguida de redissolução, pouca importância foi dada à imprecisão no controle da diferença de potencial na interface eletrodo de trabalho/solução. Isto porque no processo de deposição bastava aplicar um potencial suficientemente negativo (obtido experimentalmente) para que todos os metais em questão fossem depositados no eletrodo; da mesma forma, a redissolução de todos os metais era promovida simultaneamente num potencial escolhido experimentalmente, sem a necessidade de conhecer o exato potencial vs. Ag/AgCl, KCl_{sat.} de interface.

Nos experimentos que serão apresentados a seguir, a queda de potencial no interior da célula foi avaliada. Isto foi realizado devido à necessidade de se conhecer em que condição o processo de oxidação dos álcoois se inicia, além de se obter dados de seletividade deste em função do potencial aplicado. Para isto, fez-se uso da célula eletroquímica em fluxo, já aplicada para o processo de pré-concentração

dos metais, em um experimento onde as condições de oxidação dos álcoois foram simuladas. Neste experimento o capilar de separação não foi introduzido na célula, ou seja, realizou-se todo o processo de oxidação, porém, a introdução de amostra no capilar do CE e o processo de separação não foram realizados. No lugar do capilar, um eletrodo de referência (Ag/AgCl , $\text{KCl}_{3\text{mol L}^{-1}}$) foi introduzido. Além deste eletrodo posicionado no lugar da entrada do capilar de separação, outro eletrodo de referência foi inserido na tubulação utilizada para saída de solução da célula eletroquímica (Figura 6.2). Medidas de potencial ($i = 0 \mu\text{A}$) entre os dois eletrodos de referência adicionais utilizados apresentaram diferença menor que 5 mV.

Figura 6.2. Célula eletroquímica em fluxo apresentando a disposição dos eletrodos utilizados para correção de potencial devido ao efeito de queda ôhmica. ER1: Eletrodo pseudo-referência Ag/AgCl ; ER2: Eletrodo de referência (Ag/AgCl , $\text{KCl}_{3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}}$) posicionado no orifício comumente utilizado para inserção do capilar; ER3: Eletrodo de referência (Ag/AgCl , $\text{KCl}_{3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}}$) posicionado no orifício utilizado para saída de solução.

O eletrodo de referência posicionado sobre o eletrodo de trabalho possui adequada representatividade do potencial de interface da célula, vez que ocupa o mesmo lugar onde o capilar é posicionado. A inserção do segundo eletrodo de referência foi realizada para avaliação deste como eletrodo para correção do potencial durante um experimento real de oxidação (capilar inserido no orifício sobre o eletrodo de trabalho).

Para medida de potencial destes eletrodos, utilizou-se dois dos três amplificadores operacionais sobressalentes incluídos no circuito do potenciostato (Figura 4.10), configurados como seguidores de tensão, na qual apresentam alta impedância de entrada. As saídas destes amplificadores foram conectadas a entradas de conversão A/D da placa NI-USB-6221, para monitoramento de sinal pelo computador.

Na Figura 6.3 (A1 e B1) são apresentados registros de potencial em função do tempo de eletrólise do glicerol para o eletrodo de trabalho frente ao de pseudo-referência (ER1, controlado pelo potenciostato). O posicionamento dos demais eletrodos (ER2 e ER3) utilizados é ilustrado na figura 6.2, sendo que se utilizou espaçador com espessura de 0,2 mm para junção das duas partes da célula eletroquímica.

Figura 6.3. Avaliação de potencial em vários pontos da célula eletroquímica durante a oxidação do glicerol $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ solubilizado em eletrólito contendo 5 mmol L^{-1} de LiOH. A1: degrau de potencial de 0 para $0,98 \text{ V}$ vs. pseudo-referência; B1: degrau de potencial de 0 para $1,58 \text{ V}$ vs. pseudo-referência. ER1 corresponde ao potencial ajustado pelo potenciostato com base no eletrodo pseudo-referência, ER2 corresponde ao potencial medido por um eletrodo de referência no ponto onde o capilar é inserido durante o processo de oxidação e ER3 ao eletrodo de referência externo à célula eletroquímica. Concentração de glicerol de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em LiOH 5 mmol L^{-1} .

Verifica-se que o potencial medido em função do tempo no ponto onde o capilar é posicionado difere do potencial ajustado pelo potenciostato (ER1 vs. ER2), principalmente para as medidas realizadas em potencial de $1,6 \text{ V}$. A diferença entre o potencial ajustado (pseudo-referência) e o potencial medido nos eletrodos de referência indica a amplitude da queda de potencial somada a diferença de potencial apresentada pelo pseudo-referência frente ao eletrodo de referência Ag/AgCl, $\text{KCl}_3 \text{ mol L}^{-1}$ e pode ser utilizada para correção do potencial imposto ao eletrodo de trabalho nesta célula. A maior queda ôhmica obtida no experimento a $1,6 \text{ V}$ deve-se a elevação de corrente nesta condição. Esta elevação da corrente pode tanto estar relacionada com maior taxa de oxidação do glicerol quanto a um aumento na ocorrência de reações paralelas (p. ex. oxidação da água), não sendo possível

assim correlação apenas com o estado de oxidação do glicerol. O decaimento da corrente de oxidação em função do tempo a partir da aplicação do degrau de potencial pode ser observado por meio da Figura 6.4 (A2 e B2). Combinando dados desta figura com os da Figura 6.3, foram obtidos os gráficos da Figura 6.4 (A3 e B3) apresentando a queda de potencial em função da corrente. Apesar de previsto uma reta para os dados apresentados na Figura 6.4 (A3 e B3), é preciso lembrar que, localmente, o processo de oxidação pode promover alterações na condutividade da solução, sem considerar a queda de potencial não compensada pelo potenciostato entre o quase-referência e o eletrodo de trabalho e a contaminação do meio pelo KCl que difunde da junção líquida do eletrodo de referência. Assim, duas variáveis são alteradas em função do tempo (corrente e condutividade do meio) resultando em um gráfico com perfil não linear para maior tempo de oxidação (região de menor corrente).

Figura 6.4. A2 e B2: Variação de corrente em um experimento simulado de oxidação de glicerol. Dados obtidos para potenciostato ajustado em 0,98 (A) e 1,58 V (B) vs. pseudo referência de Ag/AgCl; A3 e B3: Gráficos apresentando o comportamento do potencial (vs. eletrodo de referência de Ag/AgCl, $\text{KCl}_{3\text{mol L}^{-1}}$) frente variações de corrente de oxidação, medido no ponto onde o capilar é inserido. A3: Experimento realizado a 0,98 V; B3: Experimento realizado a 1,58 V.

O erro de potencial frente a um eletrodo de referência Ag/AgCl, $\text{KCl}_{3\text{mol L}^{-1}}$ foi determinado experimentalmente nas condições de oxidação de álcoois investigadas e as devidas correções foram aplicadas no restante deste capítulo.

6.3. Aplicação do sistema em processos de oxidação de álcoois

A sequência de operações adotada no procedimento de oxidação eletroquímica com o sistema EC-CE-C⁴D é similar ao definido para fins de pré-concentração, sendo que apenas algumas etapas foram alteradas no *software* de controle. Um fluxograma das etapas experimentais programadas é apresentado na Figura 6.5.

Figura 6.5. Fluxograma de operação do sistema EC-CE-C⁴D aplicado ao estudo de processos de eletro-oxidação.

Cada uma das etapas apresentadas na Figura 6.5 pode ser composta por procedimentos para controle de fluxo de solução (BGE, amostra ou uma terceira solução), aumento ou redução de pressão (realizada por duas bombas de ar) e

controle de potencial no eletrodo de trabalho (WE). Para os resultados apresentados neste capítulo, em cada uma das etapas apresentadas na Figura 5.5 os seguintes parâmetros foram utilizados: (i) Limpeza do sistema (fluxo de eletrólito de corrida pelo capilar, $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ por 60 s, WE em 0 V); (ii) Inserção da amostra na célula (bombeamento da amostra até o WE, $300 \text{ }\mu\text{L}$ em 18 s, WE em 0 V); (iii) eletrooxidação (fluxo parado, potencial e tempo de oxidação especificados em cada experimento); (iv) admissão de amostra por aspiração para o interior do capilar ($5,0 \text{ kPa}$ por 10 s, WE desligado); (vi) troca de eletrólito da célula por BGE ($300 \text{ }\mu\text{L}$, 18 s); (vii) aplicação de alta tensão (AT) e registro do sinal do detector (3 a 6 min). Repetições são realizadas a partir de (i), como replicata ou com alteração de parâmetros. Etapa de regeneração/condicionamento eletroquímico e/ou químico do eletrodo (não representado no fluxograma), se necessária, pode ser programada por *software*, precedendo a etapa (i).

Uma forma simplificada de apresentação do funcionamento do sistema pode ser visualizada na Figura 6.6. O analito entra em contato com a superfície do eletrodo e é oxidado, sendo convertido em uma espécie ionizável. Após oxidação, a solução contendo as espécies formadas é aspirada pelo capilar e a separação é iniciada. Neste exemplo simplificado, os álcoois etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol são determinados indiretamente por seus respectivos carboxilatos (etanoato, propanoato, butanoato e pentanoato). Ao final da corrida o sinal apresentado pelo C^4D pode, por exemplo, ser integrado e utilizado em estudos quantitativos.

Figura 6.6. Ilustração simplificada apresentando as principais etapas do processo, que inicia com a derivatização eletroquímica seguida de separação eletroforética. Ao fim os dados obtidos pelo C⁴D são apresentados [86].

Deu-se início a este tipo de aplicação investigando exatamente a oxidação das espécies apresentadas na Figura 6.6 (etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol). Para exemplificar, apresenta-se na Figura 6.7 os eletroferogramas obtidos para solução contendo os quatro álcoois após tempos de eletrólise entre 5 a 90 s à potencial constante (1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl sat.). Neste exemplo foi avaliado o efeito do tempo de oxidação sobre a sensibilidade.

Figura 6.7. Avaliação de sensibilidade (eficiência do processo de derivatização) em função do tempo de oxidação (5, 10, 30, 60 e 90s). Identificação dos picos (ácido carboxílico correspondente): C5: 1-pentanol; C4: 1-butanol; C3: 1-propanol; C2: etanol. Eletrólito de corrida em CE: Tris/HCl, 30/10 mmol L⁻¹. Eletrólito de oxidação dos álcoois: HNO₃ 5 mmol L⁻¹ e HCl 1 mmol L⁻¹. Concentração dos álcoois: 1 mmol L⁻¹. Eletrodo de trabalho: Pt. Alta tensão: 30 kV. Comprimento do capilar: 45 cm (25 cm efetivo) [115].

Como eletrólito de corrida optou-se pelo tampão composto por Tris/HCl, 30/10 mmol L⁻¹, de utilização frequente em CE-C⁴D quando requerido tamponamento ao redor de pH 8, ou seja, próximo ao pKa do Tris. Devido à baixa mobilidade desta espécie, seu tampão confere estabilidade de linha base ao C⁴D. Com relação ao HCl, este cumpre dois papéis: i) possibilitar a formação do tampão com a base Tris; ii) favorecer a detecção dos carboxilatos, que apresentam mobilidade bem menor que a do cloreto. Para melhor entendimento desta segunda função cumprida pelo HCl, há de se considerar que o C⁴D possui sensibilidade baseada na diferença de mobilidade entre o analito e seu co-íon [10, 11].

Para o processo de oxidação, a amostra foi solubilizada em solução contendo HNO_3 5 mmol L^{-1} e HCl 1 mmol L^{-1} . A utilização destes ácidos visa tanto à incorporação de um eletrólito que suporte a corrente de migração quanto à estabilização do potencial do eletrodo pseudo-referência pela presença de concentração constante de cloreto.

Obteve-se nestes experimentos eficiência de conversão ao redor de 16% para conversão dos álcoois em carboxilatos. Apesar deste baixo valor, a eficiência se manteve constante, independentemente da concentração dos analitos, tanto que as curvas de calibração construídas apresentaram valor de $R > 0,995$ para os quatro álcoois determinados. Os valores estimados de LD e LQ foram de 72 e 240 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o etanol e de 46 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para pentanol, significativamente melhores que os publicados para detecção destas espécies por MEKC- C^4D ($\sim 1 \text{ mmol L}^{-1}$) [45].

A repetibilidade dos resultados obtidos com o sistema foi avaliada efetuando 40 replicatas consecutivas do procedimento analítico automatizado para determinação de etanol em amostra de cerveja diluída 100 vezes. A Figura 6.8 comprova a repetibilidade de corrente eletroforética em 27 separações consecutivas dos produtos de oxidação do eletrodo. Integração dos sinais para etanoato nos 40 eletroferogramas revelou que a área dos picos se mantém constante mostrando a repetibilidade de todo o sistema e, em especial, a estabilidade do eletrodo de trabalho, que não apresenta tendência a progressivo bloqueio de sua superfície (envenenamento).

Figura 6.8. Corrente eletroforética obtida durante 27 separações eletroforéticas consecutivas. Os períodos onde a corrente apresenta valores próximos a zero correspondem ao tempo em que o sistema executa tarefas de limpeza da célula, *flush* do capilar, oxidação da amostra e injeção no capilar de separação.

Quanto à oxidação de glicerol, a sequência de operações é idêntica à adotada para o processo de derivatização de álcoois de cadeia curta.

Tomando como base apenas as espécies ionizáveis formadas pela oxidação do glicerol (Tabela 6.1), relatos da literatura indicam rota de oxidação que passa por compostos como ácido glicérico, ácido tartrônico e, caso a oxidação do carbono secundário ocorra em etapa inicial, ácido hidroxipirúvico. A literatura não registra a formação de compostos ionizáveis de 3 carbonos contendo a função aldeído [116-120]. Isso se deve principalmente à facilidade de oxidação destes compostos frente aos álcoois. Como o potencial necessário para oxidação de álcoois é, comumente,

similar ou mais positivo que o necessário para a oxidação dos aldeídos, a oxidação normalmente prossegue direto para a formação do ácido carboxílico correspondente.

O ácido meso-oxálico apresenta estado de oxidação elevado para os três carbonos presentes na molécula, e por este motivo é formado em etapas subsequentes da oxidação., Acredita-se, pois, que este seja formado em baixa escala devido ao reduzido tempo de oxidação utilizado nos experimentos (tempo de oxidação de 120 s).

Outra rota de oxidação pode seguir pela quebra da ligação C—C, isto resulta na produção dos íons com cadeia de dois carbonos apresentados na Tabela 6.1, bem como a formação do ácido fórmico que, posteriormente, tal como os ácidos oxálico e meso-oxálico, podem resultar na produção de CO₂ após oxidação.

Para comprovação dos picos apresentados durante a separação, utilizou-se injeção dos ânions, quando disponíveis, e a obtenção de dados simulados no programa Peak Master, com construção das curvas de mobilidade. O programa Peak Master, distribuído gratuitamente no site do autor [29], baseia seus cálculos nos dados de mobilidade e pKa da espécie em estudo juntamente com dados do meio em que se dá a separação (pH e força iônica) e condições eletroforéticas (dados do capilar, do detector e amplitude da alta tensão) para calcular a velocidade de migração dos íons no interior do capilar e o tempo que estes levarão para serem detectados.

O comportamento dos ácidos carboxílicos é bastante previsível em CE. Devido a isto, eletroferogramas simulados pelo programa apresentam grande similaridade com resultados experimentais e podem ser utilizados como ferramenta

auxiliar no procedimento de comprovação dos picos apresentados pelo C⁴D. A Figura 6.9 apresenta um eletroferograma simulado de algumas das espécies formadas durante o processo de oxidação. Dados precisos sobre os ácidos mesoxálico e hidroxipirúvico não foram encontrados e por este motivo não constam na simulação.

Figura 6.9. Eletroferograma obtido de simulação realizada no programa Peak Master (BGE composto de MES/HIS 30/30 mmol L⁻¹ e EOF invertido). Identificação dos picos: 1: Oxalato; 2: Tartronato; 3: Formiato; 4: Glicolato; 5: Glioxilato; 6: Glicerato; 7: Bicarbonato.

No caso do meso-oxalato, dispunha-se de padrão desta espécie, mas não dos dados de mobilidade (para simulação). Assim, eletroferogramas obtidos experimentalmente (Figura 6.10B) possibilitaram inferir sobre a mobilidade aproximada desta espécie, permitindo prever que seu pico se encontra entre os do glicolato e do formiato (quando necessário, dados mais precisos de mobilidade

podem ser obtidos realizando eletroferogramas em distintas forças iônicas e extrapolando-se o valor para diluição infinita). Glicolato, glicerato, glioxilato, e formiato, assim como meso-oxalato, foram também injetados no capilar e separados por CE (Figura 6.10B). Para verificar a validade das simulações por meio do uso do Peak Master para as espécies em questão, compara-se na Figura 6.10 um eletroferograma simulado com o programa com dados experimentais da separação eletroforética de uma solução padrão contendo as espécies acima citadas. Nesta separação, todas as espécies apresentam igual concentração, porém, é possível notar que o pico referente ao glioxilato apresenta menor intensidade quando comparado aos demais íons. A concordância é muito boa tanto quanto ao tempo de eletromigração como no que concerne à área dos picos, afora o sinal experimental do íon glioxilato, que apresentou intensidade bem inferior a simulada. A explicação provém da interação deste íon com o surfactante utilizado para reversão do fluxo eletroosmótico na parede do capilar [121, 122].

Figura 6.10. A: Dados obtidos de uma separação simulada utilizando o programa Peak Master; B: Eletroferograma real de uma mistura padrão contendo os íons formiato, mesoxalato, glicolato, glioxilato e glicerato. Capilar de 75 μm com 80 cm de comprimento (70 cm até o detector); Eletrólito MES/HIS 30/30 mmol L^{-1} + 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CTAB.

Uma das virtudes da simulação é que se pode estimar rapidamente o efeito da variação de diversos parâmetros sobre a sensibilidade, resolução e tempo de

corrida. Para misturas de ácidos fracos, como os carboxilatos, se apresentarem pKas distintos, redução do pH do tampão irá desacelerar de forma diferenciada as espécies presentes (desaceleração dependente do pKa) fornecendo, por vezes, meios para resolver picos sobrepostos. Curvas de mobilidade para algumas das possíveis espécies formadas pela oxidação do glicerol são apresentadas na Figura 6.11. Através destas curvas é possível verificar o comportamento dos ácidos em função do pH. Sabendo-se o pKa e mobilidade do ácido que se deseja identificar e realizando-se alguns experimentos, é possível, por meio destas curvas de mobilidade, comprovar a presença do íon de interesse em solução (desde que dentro do LD). É possível notar também que para as faixas de pH entre 5,5 a 6,5, 8 a 9 e entre 11,5 a 12,5 (valores aproximados), todas as espécies encontram-se separadas, o que facilita a identificação.

Figura 6.11. Curvas de mobilidade em função do pH para as possíveis espécies ionizáveis formadas durante o processo de oxidação do glicerol.

Experimentos envolvendo o uso do sistema EC-CE-C⁴D para a oxidação de glicerol foram realizados com o processo de oxidação conduzido em meio de LiOH 5 mmol L⁻¹. Solução 0,1 mol L⁻¹ de glicerol foi utilizada como amostra. Na Figura 6.12, eletroferogramas obtidos após oxidação em potenciais entre 0,61 e 1,27 V são apresentados. Estes dados foram obtidos após oxidação por 120 s em eletrodo de filme de Au depositado sobre carbono vítreo fosco (lixado). Utilizou-se como BGE solução contendo 10 mmol L⁻¹ de LiOH e efetuou-se a separação sem a utilização de CTAB (inversor de EOF) e com polaridade positiva no ponto de injeção. Nestas condições, ânions que migram lentamente em contra-fluxo são arrastados pelo EOF e alcançam o detector enquanto que os de maior mobilidade escapam do capilar ou permanecem em seu interior sem serem detectados. Prioriza-se, pois, a detecção de ânions de baixa mobilidade, em detrimento dos de maior mobilidade. O pico atribuído ao carbonato tanto pode ser decorrente exclusivamente do CO₂ absorvido do ar pelas soluções, como pode ter sido incrementado no processo de oxidação eletrocatalítica do glicerol. Experimentos com exclusão de CO₂ das soluções (tarefa difícil) auxiliariam na distinção da origem do carbonato.

Figura 6.12. Avaliação do efeito do potencial aplicado ao WE na oxidação de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de glicerol em 5 mmol L⁻¹ de LiOH. Eletrooxidação por 120 s em superfície de Au. BGE: LiOH 10 mmol L⁻¹ (pH ~ 12); AT: 30 kV; capilar de 20 μm (d.i.) e 50 cm de comprimento (comprimento efetivo de 20 cm). 1: glicerato; 2: glicolato; 3: formiato.

O pico não identificado no eletroferograma é originado por um ânion que apresenta relação raio iônico hidratado/carga maior que a do glicerato. O hidroxipiruvato, também reportado na literatura como produto da oxidação do glicerol, poderia explicar este sinal. Porém, devido à indisponibilidade dos valores de mobilidade e do padrão desta espécie, maior número de experimentos (ou detecção por espectrometria de massas) se faria necessário para a identificação da presença deste ânion.

Experimentos idênticos aos apresentados na Figura 6.12 foram realizados para eletrodos de Pt e Pd. Como se verifica na Figura 6.13, em termos de seletividade, os resultados obtidos em Pt pouco diferem dos observados em Au.

Figura 6.13. Avaliação do efeito do potencial aplicado ao WE na oxidação de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de glicerol em 5 mmol L^{-1} de LiOH. Eletrooxidação de 120 s em superfície de Pt. BGE: LiOH 10 mmol L^{-1} (pH ~ 12); AT = 30 kV; capilar de $20 \text{ }\mu\text{m}$ (d.i.) e 50 cm de comprimento (comprimento efetivo de 20 cm). 1: glicerato; 2: glicolato; 3: formiato.

Para superfície de Pd, entretanto, produtos de oxidação foram observados em potencial de 0 V ou mesmo com o eletrodo desconectado. Experimentos comparativos similares de oxidação química (eletrodo desligado) de glicerol sobre em superfícies de Au e Pt foram realizados e não revelaram produtos detectáveis. A hipótese da atuação do Pd como catalisador (em circuito aberto) da oxidação química do glicerol foi fortalecida por meio de experimentos em duas concentrações distintas de O_2 dissolvido. Conclui-se através dos dados obtidos deste experimento (Figura 6.14) que há aumento na concentração de glicerato e glicolato formados e que o formiato se torna detectável ao se aumentar a concentração de O_2 disponível (de qualquer modo, baixa, frente ao glicerol).

Figura 6.14. Separação por CE de produtos da oxidação catalítica de glicerol por O_2 dissolvido, em superfície de Pt, Pd e Au (eletrodos desligados). Glicerol $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de glicerol em LiOH 5 mmol L^{-1} . Sobre Pd, duas concentrações de O_2 foram testadas: $[O_2]$ Baixa: oxigênio dissolvido em solução e em equilíbrio com o ar atmosférico (tal como para os eletrodos de Au e Pt); $[O_2]$ Alta: borbulhamento de O_2 na solução. Exceto para o potencial de separação (20 kV) e para o tempo de oxidação (10 s) as condições são as mesmas da Figura 6.13. O eletroferograma branco foi obtido com o catalisador coberto com um filme de PVC. 1: Glicerato, 2: Glicolato e 3: Formiato.

A hipótese levantada para explicar a acentuada deriva de linha base observada no eletroferograma denominado como “ $[O_2]$ Baixa” foi de que se tratava de lenta dessorção de espécies adsorvidas na superfície do Pd provenientes da oxidação do glicerol, eventualmente, com continuidade da oxidação de glicerol adsorvido e intermediários à medida que ocorria reposição do O_2 dissolvido após a troca da solução pelo BGE isento de glicerol. Durante a separação dos ânions injetados, espécies dessorvidas estariam migrando para o interior do capilar (cátions) ou sendo aspiradas continuamente pelo EOF (ânions de baixa mobilidade).

A minimização da deriva no eletroferograma denominado como “[O₂] Alta” indicaria que o aporte de O₂ teria sido suficiente para oxidação e dessorção do material adsorvido no catalisador antes do início da corrida.

Para demonstrar essa hipótese, realizou-se experimentos em que, após a oxidação química e injeção da amostra no capilar (antes da separação eletroforética), a superfície do catalisador foi submetida a um procedimento de limpeza eletroquímica. A Figura 6.15 mostra os efeitos da escolha de diferentes potenciais com o objetivo de promover a limpeza do catalisador. Em 0 V persiste a deriva de linha base, mas em 0,5 e 0,82 V a deriva é reduzida, provavelmente devido à oxidação e/ou dessorção das espécies interferentes, solubilizadas no BGE que preenche a célula durante a limpeza e é renovado antes do início da separação.

Figura 6.15. Separação eletroforética de produtos da oxidação catalítica em Pd de glicerol (0.1 mol L⁻¹) por O₂, com limpeza eletroquímica do Pd entre a injeção dos produtos no capilar e a efetivação da separação. Condições idênticas à da Figura 6.14, eletroferograma “[O₂] Baixa”, afora aplicação do potencial indicado por 20 s ao eletrodo de Pd durante a limpeza efetuada com a célula preenchida de BGE.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Um sistema completo, todo baseado em fenômenos eletroquímicos (tratamento de amostra, injeção eletrocinética de amostra, *stacking*, migração eletroforética e eletroosmótica e detecção), foi desenvolvido e aprimorado com sucesso. Etapas analíticas de preparo de amostra, como pré-concentração, *cleanup* e derivatização são facilmente realizadas neste sistema com o auxílio de ferramentas de análise em fluxo.

Inicialmente, o acoplamento FA-EC-CE-C⁴D desenvolvido foi aplicado na separação de 9 metais e mostrou-se eficiente em todas as propostas aqui discutidas. Apesar de a instrumentação apresentar um número elevado de componentes e a sequência de operações envolver muitas etapas, a automatização do sistema tornou o procedimento de análise uma tarefa simples e facilmente reprogramável, mediante especificação de parâmetros como tempo de deposição, potenciais a serem utilizados e vazão das soluções, além dos usuais em CE. O sistema FA-EC-CE-C⁴D soluciona problemas de formação de compostos intermetálicos que prejudicam a voltametria de redissolução e pode melhorar o limite de determinação por CE de metais pré-concentráveis em eletrodos (entre os quais, metais pesados tóxicos), bem como suprimir a interferência de cátions que, frequentemente, apresentam concentrações superiores em várias ordens de magnitude, por exemplo, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e NH₄⁺. Estes últimos podem ser

determinados com o mesmo sistema, sem pré-concentração ou após diluição apropriada em fluxo.

A sinergia obtida pelos sistemas FA-EC-CE-C⁴D resultou em LDs que atendem a normas ambientais quanto à presença de metais pesados [123], sendo ainda possível a redução destes limites por meio do uso de maior tempo de pré-concentração ou maior volume de amostra injetado (aumento da vazão).

Ao lado da pré-concentração de metais, a estratégia desenvolvida para separação prévia de metais numa célula eletroquímica em fluxo sob controle potencioestático representa um avanço no campo de acoplamentos visando aplicações em separações bidimensionais. O já conhecido comportamento eletroquímico dos metais para processos de oxi-redução em eletrodos foi explorado com sucesso para esta tarefa, proporcionando pré-concentração ou redissolução seletiva de metais com consequente separação prévia a eletroforética destas espécies. O sistema também propiciou a deposição de metais no eletrodo seguida de redissolução em nova matriz, com ganho de seletividade frente aos metais não depositáveis sobre eletrodo, que são expelidos da célula antes da injeção de amostra no capilar.

Quando comparada com a espectroscopia atômica de emissão ou absorção, não se espera que a FA-EC-CE-C⁴D venha a competir quanto aos limites de detecção, estando seus atrativos no baixo custo da instrumentação, portabilidade, operação à temperatura ambiente (sem chamas ou fornos) e na aplicabilidade também a espécies como NH₄⁺ e compostos orgânicos, simultaneamente ou não. Frente à análise direta por voltametria de acumulação (*stripping* anódico ou catódico), esta não possibilita a determinação conjunta de cátions cuja análise é

usualmente requerida, como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e NH_4^+ e, como já dito, está sujeita a interferência resultantes da formação de compostos intermetálicos.

O eletrólito MES/Histidina funcionou bem para FA-EC e na CE- C^4D e quando aditivado, possibilitou boa resolução de todos os analitos considerados, afora a sobreposição parcial dos picos K^+ e Ti^+ , sendo que o Ti^+ não é uma espécie usual. Pode-se vislumbrar, pois, que a FA-EC-CE- C^4D poderá vir a ocupar posição relevante na análise de metais pré-concentráveis fora do alcance da CE- C^4D , ao lado de outros já rotineiramente analisados por eletroforese.

Assim como o método para determinação de metais tem como concorrente uma técnica de elevada eficiência, a espectroscopia atômica, a determinação de álcoois por EC-CE- C^4D tem a cromatografia gasosa (CG) como principal técnica concorrente, especialmente para determinação de álcoois de baixo peso molecular. A técnica CG, além de ser bem estabelecida e adotada em métodos oficiais, não requer processo de derivatização para estes álcoois. Outros fatores em favor da CG incluem a possibilidade de análise de amostras complexas por meio de técnicas de amostragem reconhecidamente eficazes e amplamente utilizadas, como *headspace* e SPME. Porém, assim como exposto para o método para determinação de metais, há de se considerar aplicações onde, além de espécies orgânicas voláteis, tenha-se como objetivo a determinação de outras espécies não voláteis ou termicamente instáveis. Neste contexto, CE é uma técnica bastante abrangente na qual a separação simultânea de íons orgânicos e/ou inorgânicos é prática comum. Agora, com auxílio da EC-CE- C^4D , há a possibilidade adicional de determinação de espécies neutras em conjunto com as demais já realizadas por CE. Os primeiros resultados qualitativos para esta metodologia foram apresentados em 2011 [115] e

indicaram perspectiva de evolução para métodos analíticos quantitativos. Os dados apresentados aqui são apenas resultados preliminares dessa nova vertente de pesquisa. Após verificação da funcionalidade do sistema também para fins de derivatização, esta linha passou a ser desenvolvida por outro pós-graduando do mesmo orientador com colaboração do autor desta tese, tendo já originado uma dissertação de mestrado [110] e um artigo em revista de alta relevância na área [86].

O sistema desenvolvido também tem potencialidade para estudos de avaliação de eficiência de catalisadores, como mostrado na oxidação (catalítica ou eletrocatalítica) de glicerol, mediante observação de produtos (e reagentes) desde que iônicos ou ionizáveis e estáveis por alguns minutos. O sistema possibilitou automação das etapas de processamento catalítico ou eletrocatalítico da amostra, separação e detecção de íons formados. O processo de eletrólise ou catálise com observação *in-situ* por CE pôde ser realizado em tempo relativamente curto (em menos de 10 min.) com variação programada de parâmetros experimentais, facilitando o estudo de condições e materiais para uma oxidação seletiva e eficiente. Estudos de longa duração para avaliação da estabilidade ou envenenamento do catalisador e de meios de reativação também são possíveis.

Os dados apresentados demonstram a aplicabilidade do sistema para confirmação de espécies formadas durante processo de oxidação (eletroquímica ou química catalisada por metal). Apesar da possibilidade do uso deste acoplamento EC-CE-C⁴D para tal finalidade, é necessário levar em conta mais que apenas dados de mobilidade obtidos em um único eletroferograma. O conhecimento da rota de oxidação ou mesmo dos produtos formados, pKa das espécies envolvidas e dados das curvas de mobilidade, ou mesmo simulação dos eletroferogramas para acelerar

a seleção de parâmetros experimentais, auxiliam no processo de identificação e devem ser utilizados sempre que necessário e possível.

O procedimento para avaliação de oxidação de glicerol descrito nesta tese é apenas uma prova de conceito da utilização do sistema para detecção de espécies geradas durante um processamento eletroquímico. É evidente que a metodologia apresenta limitações, a eficiência de oxidação ainda é baixa e a necessidade do uso de baixas concentrações de eletrólito durante o processo de oxidação causa problemas de controle rigoroso do potencial relacionados com a queda ôhmica. O reduzido volume interno da célula eletroquímica reduz o tempo necessário para oxidação da amostra contida e fornece volume mais que suficiente para CE, porém, também dificulta o controle de potencial e a uniformidade do mesmo em toda a área do eletrodo de trabalho que, todavia, poderia ser reduzida no futuro. Imprecisões no controle de potencial não inviabilizam, contudo, avaliações comparativas de materiais de eletrodo e não estão presentes em ensaios a circuito aberto de oxidação química catalisada por metal (com ou sem limpeza/ativação eletroquímica entre ensaios).

Limitações de separação e detecção de espécies neutras podem ser contornadas, em casos favoráveis, sem recorrer à MECK como vem sendo estudada pelo grupo em um trabalho que utiliza o íon borato como complexante para permitir a determinação de glicerol, gliceraldeído e di-hidroxiacetona, com resultados promissores em eletrólito contendo 60 mmol L^{-1} de ácido bórico e 10 mmol L^{-1} de LiOH em uma separação realizada em contrafluxo. Quanto à aplicação do sistema na sua forma atual em estudos de seletividade em função do potencial do eletrodo de trabalho em meios de baixa condutividade, é necessário aplicar correção (pré-

determinada com eletrodo de referência extra, como foi mostrado) no valor do potencial programado antes da disponibilização dos dados.

Para o procedimento de identificação das espécies nos eletroferogramas, a usual adição de padrão à própria amostra (fortificação ou *spiking*) nem sempre é aplicável devido à possibilidade de eletro-oxidação do padrão antes da injeção no CE.

Além das aplicações descritas, tópicos estudados com relação ao desenvolvimento da célula eletroquímica (p.ex. queda ôhmica) podem ser utilizados como base não apenas para o desenvolvimento de sistemas como o aqui apresentado, mas também na construção de sistemas de análise em fluxo com detecção amperométrica para sistemas microfluídicos. A estratégia utilizada para a interface eletrodo de trabalho/eletroforese capilar, com o polimento da extremidade do capilar em ângulo definindo o distanciamento entre as partes, é simples o bastante para ser reproduzida em qualquer laboratório e já há exemplo de adoção desta estratégia na literatura [80].

O breve estudo comparativo de dispositivos para propulsão de líquidos em sistemas em fluxo, conduzido em colaboração com um doutorando do grupo e divulgado em congresso [91], levou à conclusão de que, para o sistema EC-CE-C⁴D, as bombas do tipo solenóide são as mais indicadas. Bombas do tipo piezoelétricas, cuja vazão é dependente a pressão (resistência hidrodinâmica) do circuito em fluxo, são mais apropriadas para sistemas microfluídicos, enquanto as bombas peristálticas de múltiplos canais possuem limitação quanto ao controle independente de vários fluídos.

O potenciostato simples, com proteção para fuga de corrente em alta tensão desenvolvido para a interface EC-CE mostrou-se apropriado também em aplicações convencionais de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. As estratégias adotadas para construção deste potenciostato podem ser úteis em qualquer tipo de acoplamento que envolva um sistema elétrico com um ponto de alta tensão (p.ex. fontes de ionização por eletrospray para espectrometria de massa). As três entradas de alta impedância incluídas no circuito para medição de potencial de sensores potenciométricos, usadas com dois eletrodos de referência (além do de quase-referência conectado ao potenciostato) podem ser aproveitadas em sistemas em fluxo com detecção potenciométrica com múltiplos eletrodos. Com relação ao circuito galvanostático simples incluído no equipamento e que não serviu para pré-concentração em fluxo, poderá ser útil para desenvolvimento de sistemas coulométricos a corrente controlada.

Quando não requerido em pesquisas por FA-EC-CE-C⁴D, o sistema completo desenvolvido na tese pode ser aproveitado como equipamento convencional de eletroforese capilar, bastando trocar o sistema em fluxo com célula acoplada ao potenciostato por uma célula convencional.

Cabe destacar ainda todo o processo de elaboração de software. Este foi desenvolvido de forma a se tornar bem flexível, funcionando também sem a etapa de tratamento de amostra, para automação da eletroforese por acoplamento com análise em fluxo de até 4 canais. Isto levaria ao consumo de uma quantidade maior de amostra e reagentes, mas atribuiria ao sistema certo nível de automatização, especialmente com o acréscimo de um trocador de amostras.

8 REFERÊNCIAS

1. Zimm, B.H. and S.D. Levene, *Problems and Prospects in the Theory of Gel-Electrophoresis of DNA*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1992. **25**(2): p. 171-204.
2. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Transactions of the Faraday Society, 1937. **33**(1): p. 0524-0530.
3. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries*. Analytical Chemistry, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
4. Dolnik, V., S.R. Liu, and S. Jovanovich, *Capillary electrophoresis on microchip*. Electrophoresis, 2000. **21**(1): p. 41-54.
5. Tavares, M.F.M., *Capillary electrophoresis: Basic concepts*. Quimica Nova, 1996. **19**(2): p. 173-181.
6. Landers, J.P., ed. *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. 3^o ed. 2007, CRC Press. p. 1592.
7. Weston, A., ed. *HPLC and CE: Principles and Practice*. 1997, Academic Press. p. 280.
8. da Silva, J.A.F. and C.L. do Lago, *An oscillometric detector for capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(20): p. 4339-4343.
9. da Silva, J.A.F., N. Guzman, and C.L. do Lago, *Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis - Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency*. Journal of Chromatography A, 2002. **942**(1-2): p. 249-258.
10. Brito-Neto, J.G.A., et al., *Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals*. Electroanalysis, 2005. **17**(13): p. 1198-1206.
11. Brito-Neto, J.G.A., et al., *Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics*. Electroanalysis, 2005. **17**(13): p. 1207-1214.
12. Cheng, Y.F. and N.J. Dovichi, *Subattomole Amino-Acid Analysis by Capillary Zone Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence*. Science, 1988. **242**(4878): p. 562-564.
13. Wu, S.L. and N.J. Dovichi, *High-Sensitivity Fluorescence Detector for Fluorescein Isothiocyanate Derivatives of Amino-Acids Separated by Capillary Zone Electrophoresis*. Journal of Chromatography, 1989. **480**: p. 141-155.

14. Quirino, J.P. and S. Terabe, *Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2000. **902**(1): p. 119-135.
15. Beckers, J.L. and P. Bocek, *Sample stacking in capillary zone electrophoresis: Principles, advantages and limitations*. Electrophoresis, 2000. **21**(14): p. 2747-2767.
16. de Moraes, M.D.L., et al., *Preconcentration Strategies in Capillary Electrophoresis (Ce). Part 1. Manipulation of the Analyte Electrophoretic Velocity*. Quimica Nova, 2009. **32**(4): p. 1041-1046.
17. de Moraes, M.D.L., M.F.M. Tavares, and E.A. Pereira, *Preconcentration Strategies in Capillary Electrophoresis. Part 2. Manipulation of the Disperse/Secondary Velocity*. Quimica Nova, 2010. **33**(2): p. 466-470.
18. Tavares, M.F.M., *Separation mechanisms in capillary electrophoresis*. Quimica Nova, 1997. **20**(5): p. 493-511.
19. Grahame, D.C., *The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity*. Chemical Reviews, 1947. **41**(3): p. 441-501.
20. Wang, W., et al., *Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2007. **1170**(1-2): p. 1-8.
21. Tsuda, T., *Modification of Electroosmotic Flow with Cetyltrimethylammonium Bromide in Capillary Zone Electrophoresis*. Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications, 1987. **10**(11): p. 622-624.
22. Katayama, H., Y. Ishihama, and N. Asakawa, *Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(24): p. 5272-5277.
23. Katayama, H., Y. Ishihama, and N. Asakawa, *Stable capillary coating with successive multiple ionic polymer layers*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(11): p. 2254-2260.
24. Colombara, R., M.F.M. Tavares, and S. Massaro, *Simultaneous determination of anions by capillary electrophoresis: Characteristics and applications*. Quimica Nova, 1997. **20**(5): p. 512-518.
25. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Capillary Zone Electrophoresis*. Science, 1983. **222**(4621): p. 266-272.
26. Jorgenson, J.W., et al., *Capillary Zone Electrophoresis of Proteins*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1986. **191**: p. 5-Anyl.
27. Klampfl, C.W. and W. Buchberger, *Determination of low-molecular-mass organic acids by capillary zone electrophoresis*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 1997. **16**(4): p. 221-229.
28. Schmitt-Kopplin, P., ed. *Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*. 2008, Humana Press.

29. Gas, B., et al., *PeakMaster - A freeware simulator of capillary zone electrophoresis*. Lc Gc Europe, 2005. **18**(5): p. 282-+.
30. Shi, Y.C. and J.S. Fritz, *Separation of Metal-Ions by Capillary Electrophoresis with a Complexing Electrolyte*. Journal of Chromatography, 1993. **640**(1-2): p. 473-479.
31. Macka, M. and P.R. Haddad, *Determination of metal ions by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 1997. **18**(12-13): p. 2482-2501.
32. Huang, X.H., et al., *Quantitative-Analysis of Low-Molecular Weight Carboxylic-Acids by Capillary Zone Electrophoresis Conductivity Detection*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(7): p. 766-770.
33. Tavares, M.F.M., R. Colombara, and S. Massaro, *Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis - Evaluation of electrolyte systems for anion analysis*. Journal of Chromatography A, 1997. **772**(1-2): p. 171-178.
34. Oliveira, M.A.L., et al., *Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Quimica Nova, 2003. **26**(6): p. 821-824.
35. Johns, C., et al., *Simultaneous separation of anions and cations by capillary electrophoresis with high magnitude, reversed electroosmotic flow*. Journal of Chromatography A, 2004. **1050**(2): p. 217-222.
36. Kuban, P., P. Kuban, and V. Kuban, *Simultaneous determination of inorganic and organic anions, alkali, alkaline earth and transition metal cations by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection*. Electrophoresis, 2002. **23**(21): p. 3725-3734.
37. Mai, T.D. and P.C. Hauser, *Simultaneous separations of cations and anions by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection employing a sequential injection analysis manifold for flexible manipulation of sample plugs*. Journal of Chromatography A, 2012. **1267**: p. 266-272.
38. Kuban, P., et al., *Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection*. Journal of Chromatography A, 2002. **964**(1-2): p. 227-241.
39. Bardelmeijer, H.A., et al., *Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 1997. **18**(12-13): p. 2214-2227.
40. Snyder, L.R., ed. *Practical HPLC Method Development*. 2^o ed. 1997. p. 745.
41. Beck, W. and H. Engelhardt, *Capillary Electrophoresis of Organic and Inorganic Cations with Indirect Uv Detection*. Chromatographia, 1992. **33**(7-8): p. 313-316.
42. Peres, R.G., et al., *Rapid method for the determination. of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection*. Food Control, 2009. **20**(6): p. 548-552.

43. Kuhr, W.G. and E.S. Yeung, *Optimization of Sensitivity and Separation in Capillary Zone Electrophoresis with Indirect Fluorescence Detection*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(23): p. 2642-2646.
44. Terabe, S., et al., *Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries*. Analytical Chemistry, 1984. **56**(1): p. 111-113.
45. da Silva, J.A.F. and C.L. do Lago, *Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector*. Electrophoresis, 2000. **21**(7): p. 1405-1408.
46. Tuma, P., et al., *The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for monitoring of glycerol in adipose tissues during a sporting performance*. Electrophoresis, 2010. **31**(12): p. 2037-2043.
47. Artur, V., ed. *Vogel: análise inorgânica quantitativa*. 1986, Editora Guanabara. p. 690.
48. Osbourn, D.M., D.J. Weiss, and C.E. Lunte, *On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2000. **21**(14): p. 2768-2779.
49. Simpson, S.L., J.P. Quirino, and S. Terabe, *On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 504-541.
50. Vandaveer, W.R., et al., *Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2004. **25**(21-22): p. 3528-3549.
51. Holland, L.A. and A.M. Leigh, *Amperometric and voltammetric detection for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2002. **23**(21): p. 3649-3658.
52. Baldwin, R.P., *Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999. **19**(1-2): p. 69-81.
53. Jahn, S. and U. Karst, *Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry-Current state and future perspectives*. Journal of Chromatography A, 2012. **1259**: p. 16-49.
54. Daniel, D. and I.G.R. Gutz, *Microfluidic cell with a TiO₂-modified gold electrode irradiated by an UV-LED for in situ photocatalytic decomposition of organic matter and its potentiality for voltammetric analysis of metal ions*. Electrochemistry Communications, 2007. **9**(3): p. 522-528.
55. Meyer, J., et al., *Liquid chromatography with on-line electrochemical derivatization and fluorescence detection for the determination of phenols*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(4): p. 922-926.
56. Bulska, E., *Analytical advantages of using electrochemistry for atomic spectrometry*. Pure and Applied Chemistry, 2001. **73**(1): p. 1-7.
57. Ferreira, S.L.C., et al., *Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques*. Journal of Hazardous Materials, 2007. **145**(3): p. 358-367.

58. ESA Biosciences, http://www.esainc.com/docs/spool/70-6734P_5030_EC_Cell.pdf, acessado em 26 de Julho de 2014.
59. Antec web site, <http://www.myantec.com/>, acessado em 26 de julho de 2014.
60. Zhou, F.M., *Electrochemistry combined on-line with atomic mass spectrometry and related techniques for trace-metal analysis and electrode-reaction studies*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(3): p. 218-227.
61. Pereira, M.D. and M.A.Z. Arruda, *Trends in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques*. Microchimica Acta, 2003. **141**(3-4): p. 115-131.
62. Baca, A.J., et al., *Anodic stripping voltammetry combined on-line with inductively coupled plasma-MS via a direct-injection high-efficiency nebulizer*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(10): p. 2507-2511.
63. Hissner, F., J. Mattusch, and G. Werner, *Determination of metal ions by ion chromatography with precolumn electrochemical preconcentration*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1996. **354**(5-6): p. 718-721.
64. Laborda, F., E. Bolea, and J.R. Castillo, *Electrochemical hydride generation as a sample-introduction technique in atomic spectrometry: fundamentals, interferences, and applications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **388**(4): p. 743-751.
65. Bolea, E., et al., *Electrochemical hydride generation for the simultaneous determination of hydride forming elements by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 2004. **59**(4): p. 505-513.
66. Gervasio, A.P.G., et al., *On-line electrolytic dissolution of alloys in flow injection analysis - Determination of iron, tungsten, molybdenum, vanadium and chromium in tool steels by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2000. **405**(1-2): p. 213-219.
67. Bergamin, H., et al., *Online Electrolytic Dissolution of Alloys in Flow-Injection Analysis .1. Principles and Application in the Determination of Soluble Aluminum in Steels*. Analytica Chimica Acta, 1986. **190**(1): p. 177-184.
68. Saitoh, K., et al., *On-line electrochemical redox derivatization for enhancement of separation selectivity of liquid chromatography*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 2007. **80**(5): p. 951-956.
69. Chen, H., et al., *Application of on-line electrochemical derivatization coupled with high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for detection and quantitation of (p-chlorophenyl)aniline in biological samples*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(7): p. 2413-2421.
70. Tong, W., et al., *Quantitation of Parent Drug and Its Unstable Metabolites by in Situ Coulometric Oxidation and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(24): p. 10251-10257.

71. Li, J.W., H.D. Dewald, and H. Chen, *Online Coupling of Electrochemical Reactions with Liquid Sample Desorption Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(23): p. 9716-9722.
72. Iwasita, T. and F.C. Nart, *In situ infrared spectroscopy at electrochemical interfaces*. Progress in Surface Science, 1997. **55**(4): p. 271-340.
73. Bockris, J.O. and B. Yang, *A Thin-Layer Flow Cell for Insitu Infrared Reflection Absorption Spectroscopic Measurements of the Electrode Electrolyte Interphase*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1988. **252**(1): p. 209-214.
74. Habib, M.A. and J.O. Bockris, *Ft-Ir Spectrometry for the Solid-Solution Interface*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1984. **180**(1-2): p. 287-306.
75. Esaka, Y., et al., *Electrophoretic analysis of quinone anion radicals in acetonitrile solutions using an on-line radical generator*. Electrophoresis, 2003. **24**(10): p. 1635-1640.
76. Matysik, F.M., *Electrochemically assisted injection - a new approach for hyphenation of electrochemistry with capillary-based separation systems*. Electrochemistry Communications, 2003. **5**(12): p. 1021-1024.
77. Scholz, R. and F.M. Matysik, *A novel approach for the separation of neutral analytes by means of electrochemically assisted injection coupled to capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Analyst, 2011. **136**(8): p. 1562-1565.
78. Lopes, F.S., L.H.G. Coelho, and I.G.R. Gutz, *Automated two-dimensional separation flow system with electrochemical preconcentration, stripping, capillary electrophoresis and contactless conductivity detection for trace metal ion analysis*. Electrophoresis, 2011. **32**(8): p. 939-946.
79. Lopes, F.S., O. Antunes, and I.G.R. Gutz, *Fully electrochemical hyphenated flow system for preconcentration, cleanup, stripping, capillary electrophoresis with stacking and contactless conductivity detection of trace heavy metals*. Electrochemistry Communications, 2010. **12**(10): p. 1387-1390.
80. Palatzky, P. and F.M. Matysik, *Development and characterization of a novel semiautomated arrangement for electrochemically assisted injection in combination with capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry*. Electrophoresis, 2012. **33**(17): p. 2689-2694.
81. Palatzky, P., et al., *Electrochemically Assisted Injection in Combination with Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (EAI-CE-MS) - Mechanistic and Quantitative Studies of the Reduction of 4-Nitrotoluene at Various Carbon-Based Screen-Printed Electrodes*. Electroanalysis, 2013. **25**(1): p. 117-122.
82. He, J.B., et al., *A chip-type thin-layer electrochemical cell coupled with capillary electrophoresis for online separation of electrode reaction products*. Analytica Chimica Acta, 2013. **786**: p. 159-165.
83. Antunes Jr., O.; Gutz, I.G.R. *Pré-concentração eletroquímica em fluxo acoplada à eletroforese capilar*. Poços de Caldas-MG: Livro de Resumos da 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.

84. Antunes Jr., O, *Novos Dispositivos de Microextração e Pré-Concentração para Eletroforese Capilar Utilizando Membranas Microporosas ou Processos Eletroquímicos e sua Potencialidade na Análise de Aminas e Metais*. Tese de Doutorado. Instituto de Química - USP 2008.
85. Lopes, F.S., et al., *Capillary Electrophoresis Assisted Flow System for In Situ Analysis of Products of Heterogeneous Electrocatalytic and Catalytic Processes: Application to the Oxidation of Glycerol*. *Electroanalysis*, 2011. **23**(11): p. 2516-2519.
86. Santos, M.S.F., et al., *From Sample Processing to Quantification: A Full Electrochemical Approach for Neutral Analyte Derivatization, Capillary Electrophoresis Separation, and Contactless Conductivity Detection*. *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(18): p. 7599-7602.
87. da Silva, J. A. F., *Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínica*, Instituto de Química - Instituto de Química - USP, 2001.
88. Saito, R.M., et al., *Ionic mobility of the solvated proton and acid-base titration in a four-compartment capillary electrophoresis system*. *Analytical Methods*, 2010. **2**(2): p. 164-170.
89. Francisco, K.J.M. and C.L. do Lago, *A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector*. *Electrophoresis*, 2009. **30**(19): p. 3458-3464.
90. Web Site: allchemistry.iq.usp.br, acessado em 26 de Julho de 2014.
91. Batista, G. L., Lopes, F. S. Gutz, Coelho, L. H. G., I.G.R. Propulsores para sistemas amperométricos em fluxo: Comparação e tratamento de sinal por FFT, 16º Encontro Nacional de Química Analítica, São Paulo, 2011.
92. Skoog, D.A., ed. *Princípios de Análise Instrumental*. 5º ed. 2002. p. 836.
93. Website: <http://www.bank-ic.de/encms/downloads/potstae2.pdf>, acessado em julho de 2014.
94. Martins , P. R. *Preparação de Hidróxidos Mistos Nanoestruturados de Níquel/Cobalto e Desenvolvimento de Sensores FIA Amperométricos*, Tese de Doutorado, Instituto de Química - USP, 2012.
95. Garcia, C.D. and C.S. Henry, *Coupling capillary electrophoresis and pulsed electrochemical detection*. *Electroanalysis*, 2005. **17**(13): p. 1125-1131.
96. Richter, E.M., et al., *Disposable twin gold electrodes for amperometric detection in capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(17): p. 2965-2969.
97. BRETT, C.M.A.B.a.A.M.O., ed. *ELECTROCHEMISTRY: Principles, Methods, and Applications*. 1993, Oxford University Press Inc. p. 427.
98. Baccaro, A.L.B. and I.G.R. Gutz, *Novel photoelectrocatalytic approach aiming at the digestion of water samples, estimation of organic matter content and stripping analysis of metals in a special UV-LED irradiated cell with a TiO₂-*

- modified gold electrode*. *Electrochemistry Communications*, 2013. **31**: p. 28-30.
99. Jovic, V.D., et al., *Identification of Intermetallic Compounds in Thin-Layers of Electrodeposited Cu-Cd Alloys Using Electrochemical Techniques*. *Materials Science and Technology*, 1991. **7**(11): p. 1021-1029.
 100. Wang, J., et al., *Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **434**(1): p. 29-34.
 101. Sun, Y., *Detailed study on simultaneous separation of rare earth elements by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1048**(2): p. 245-251.
 102. Harakuwe, A.H. and P.R. Haddad, *Control of separation selectivity in capillary zone electrophoresis of inorganic anions*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **834**(1-2): p. 213-232.
 103. Burgi, D.S. and R.L. Chien, *Optimization in Sample Stacking for High-Performance Capillary Electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1991. **63**(18): p. 2042-2047.
 104. Iwasita, T. and E. Pastor, *A Dems and Ftir Spectroscopic Investigation of Adsorbed Ethanol on Polycrystalline Platinum*. *Electrochimica Acta*, 1994. **39**(4): p. 531-537.
 105. Wolter, O. and J. Heitbaum, *Differential Electrochemical Mass-Spectroscopy (Dems) - a New Method for the Study of Electrode Processes*. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, 1984. **88**(1): p. 2-6.
 106. Bolzan, A.E. and A.J. Arvia, *Adsorption and electro-oxidation of N-alkyl and N,N '-dialkyl thioureas on gold electrodes in acid solutions. A combined FTIRRAS and voltammetry study*. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2008. **12**(5): p. 529-543.
 107. Bolzan, A.E., T. Iwasita, and A.J. Arvia, *Combined voltammetry and in situ infrared spectroscopy of tetramethylthiourea on gold in aqueous acid solutions*. *Electrochimica Acta*, 2005. **51**(6): p. 1044-1058.
 108. de Lima, R.B., et al., *On the electrocatalysis of ethylene glycol oxidation*. *Electrochimica Acta*, 2003. **49**(1): p. 85-91.
 109. de Santana, H., et al., *In situ UV-vis and Raman spectroscopic studies of the electrochemical behavior of N,N '-diphenyl-1,4-phenylenediamine*. *Synthetic Metals*, 2006. **156**(1): p. 81-85.
 110. Santos, M. S. F., *Derivatização eletroquímica de álcoois num sistema em fluxo para determinação quantitativa por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato*, *Dissertação de Mestrado, Instituto de Química - USP, 2012*.
 111. Mota, C.J.A., C.X.A. da Silva, and V.L.C. Goncalves, *Glycerochemistry: New Products and Processes from Glycerin of Biodiesel Production*. *Quimica Nova*, 2009. **32**(3): p. 639-648.

112. Behr, A., et al., *Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol*. Green Chemistry, 2008. **10**(1): p. 13-30.
113. Hirokawa, T., et al., *Table of Isotachophoretic Indexes .1. Simulated Qualitative and Quantitative Indexes of 287 Anionic Substances in the Range Ph 3-10*. Journal of Chromatography, 1983. **271**(2): p. D1-D106.
114. Website Chemicalyse, <http://www.chemicalize.org/>, acessado em julho de 2014.
115. Lopes F. S., Santos, M. S. F., Vidal, D. T. R., do Lago, C. L., Gutz, I. G. R., *Derivatização de álcoois por oxidação eletroquímica: Uma nova estratégia para viabilização da análise de espécies neutras por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato*, Livro de Resumos 16º Encontro Nacional de Química Analítica, São Paulo, 2011.
116. Kwon, Y. and M.T.M. Koper, *Combining Voltammetry with HPLC: Application to Electro-Oxidation of Glycerol*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(13): p. 5420-5424.
117. Roquet, L., et al., *Kinetics and Mechanisms of the Electrocatalytic Oxidation of Glycerol as Investigated by Chromatographic Analysis of the Reaction-Products - Potential and Ph Effects*. Electrochimica Acta, 1994. **39**(16): p. 2387-2394.
118. Simoes, M., S. Baranton, and C. Coutanceau, *Electro-oxidation of glycerol at Pd based nano-catalysts for an application in alkaline fuel cells for chemicals and energy cogeneration*. Applied Catalysis B-Environmental, 2010. **93**(3-4): p. 354-362.
119. Ciriminna, R., et al., *One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA*. Tetrahedron Letters, 2006. **47**(39): p. 6993-6995.
120. Zhang, Z.Y., L. Xin, and W.Z. Li, *Electrocatalytic oxidation of glycerol on Pt/C in anion-exchange membrane fuel cell: Cogeneration of electricity and valuable chemicals*. Applied Catalysis B-Environmental, 2012. **119**: p. 40-48.
121. Ghosal, S., *The effect of wall interactions in capillary-zone electrophoresis*. Journal of Fluid Mechanics, 2003. **491**: p. 285-300.
122. Schure, M.R. and A.M. Lenhoff, *Consequences of Wall Adsorption in Capillary Electrophoresis - Theory and Simulation*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(21): p. 3024-3037.
123. WebSite CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE); <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>. Acessado em julho de 2014.