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

MAURO SÉRGIO FERREIRA SANTOS

**Derivatização Eletroquímica de Álcoois num
Sistema em Fluxo para Determinação
Quantitativa por Eletroforese Capilar com
Detecção Condutométrica Sem Contato**

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/10/2012

MAURO SÉRGIO FERREIRA SANTOS

**Derivatização Eletroquímica de Álcoois num
Sistema em Fluxo para Determinação
Quantitativa por Eletroforese Capilar com
Detecção Condutométrica Sem Contato**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em*

Química

Orientador(a): Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

São Paulo
2012

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

S237d	<p>Santos, Mauro Sérgio Ferreira</p> <p>Derivatização eletroquímica de álcoois num sistema em fluxo para determinação quantitativa por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato / Mauro Sérgio Ferreira Santos. -- São Paulo, 2012.</p> <p>88p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.</p> <p>Orientador: Gutz, Ivano Gebhardt Rolf.</p> <p>1. Química analítica 2. Química eletroanalítica 3. Eletroforese capilar : Química analítica I. T. II. Gutz, Ivano Gebhardt Rolf, orientador.</p>
543	CDD

Dedicatória

*Aos meus pais, Antônio e Agnólia,
pelo Amor, Carinho e Dedicação
incondicionais a mim dispensados.*

*Por serem um exemplo vivo de
honestidade e seriedade. Tudo que
sou devo a vocês.*

*Ao meu tio Agnério, meu segundo
Pai, não só por me acolher em sua
casa, mas principalmente pelos
princípios e valores passados ao
longo desses anos. A você Tio, a
minha eterna gratidão.*

*Ao meu Prof. Ivano Gutz, pela
paciência, atenção e dedicação
oferecidas visando sempre a minha
formação. Meus agradecimentos pelos
ensinamentos científico e moral
compartilhados durante essa etapa.*

AGRADECIMENTOS

“A DEUS,

Pela minha existência, pela proteção e por toda a bênção derramada em minha vida, pois sem ele, eu não estaria aqui”.

A minha Família, a base de tudo, sem ela, a vida não tem sentido;

A minhas irmãs, Nara e Anne, por existirem em minha vida, pela amizade e compreensão, principalmente por entenderem minha ausência;

A minha Tia Elisa, por me acolher como filho, compreender minhas falhas e estar sempre disposta a ajudar;

A Lidiana, meu amor, pela maravilhosa companhia, nos momentos felizes e tristes, os quais ela sempre consegue torna-los felizes. Pelo apoio em minha jornada, e principalmente, pela compreensão, em tantos momentos que me ausentei devido aos estudos e trabalho;

A minha sogra Luciene, por me acolher e tratar como filho;

As minhas cunhadas Liliana e Luana, por tantos momentos maravilhosos durante esses anos de convivência;

Ao meu cunhado Washington, pelo companheirismo e ter se tornado um irmão;

Ao Professor Silvio Miranda Prada, pela amizade, companheirismo e ensinamentos dispensados, assim como pelo incentivo para minha inserção e continuidade na carreira acadêmica;

Aos Professores Lúcio e Claudimir, pela contribuição na minha formação durante as aulas ministradas, nas conversas informais no laboratório, e não podia esquecer, durante a especial “hora do café”;

Ao Fernando, pela essencial contribuição na elaboração desse trabalho, durante os experimentos e na revisão da dissertação. Pelas discussões científicas que, apesar de muitas vezes não chegarmos a um consenso, contribuíram significativamente para minha formação;

Aos colegas de laboratório Alexandre (peixe), André, Carlos, Denis (pimenta), Eric (pop), Fabiana (Fabis), Guilherme (splinter), Guilherme (Minoru), Iranaldo (Maranhão), Ivan, Lúcia, Luís (sensation), Marcelo (padre), Othon (jóóóvem), Paulo, Renata, Sueli, Thiago Nogueira (baby) e Thiago Gomes (carranca), pela contribuição científica, pelos momentos de descontração, onde reinava muita risada, pelas várias, mas várias idas ao café e principalmente, por fazer do laboratório (LAIA) um ambiente excepcional;

Aos especialistas Daniel e Simone, pela amizade e auxílio prestado durante esse período;

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

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Os livros têm os mesmos inimigos que o homem: o fogo, a umidade, os bichos, o tempo e o próprio conteúdo”.

Paul Ambroise Valery

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

Dalai Lama

“Não existe um caminho para a Felicidade. A Felicidade é o caminho”.

Mahatma Gandhi

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos caminhos paralelos para oxidação do etanol e o número de elétrons envolvidos em cada caminho34

Figura 2. Representação esquemática da célula eletroquímica em fluxo: a – bloco superior (PMMA), b – espaçador de teflon (200 μm), c – bloco inferior de Kel-F, d – entrada do fluxo, e – septo de silicone para posicionar o capilar, f – capilar de sílica fundida, g – fio de prata (eletrodo de Ag/AgCl *quase-referência.*), h – saída do fluxo, i – eletrodo auxiliar (Pt), j – eletrodo de trabalho (Pt) e k – parafusos[53]40

Figura 3. a – capilares de sílica após polimento em ângulos diferentes (22,6°, 15,5°, 7,9°, 3,2°), b – bloco de acrílico utilizado para realizar o polimento do capilar com ângulo de 15,5° [53]42

Figura 4. Representação esquemática do sistema EC-CE- C^4D : C^4D – detector condutométrico sem contato, HV – fonte de alta voltage, VP – bomba de vácuo, PP – bomba de pressão, RE – eletrodo de Ag/AgCl *quase-referência*, WE – eletrodo de trabalho, AE – eletrodo auxiliar, i/V – conversor de corrente voltage do CE, A/D – ponto de monitoramento da corrente obtida no CE; μPs – microbombas solenoide[54]43

Figura 5. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L^{-1} , eletrodo de platina, eletrólito suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + HNO_3 10 mmol L^{-1} , faixa de potencial: -0,35 a 1,45 V; velocidade de varredura: 0,1 V s^{-1} 48

Figura 6. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L^{-1} , eletrodo de platina, eletrólito suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} , faixa de potencial: -0,90 a 1,40 V; velocidade de varredura: 0,1 V s^{-1} 50

Figura 7. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de platina, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,95 a 0,85 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹51

Figura 8. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de ouro, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + HNO₃ 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,35 a 1,60 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹53

Figura 9. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de ouro, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, faixa de potencial: -1,00 a 1,60 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹54

Figura 10. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de ouro, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -1,10 a 1,20 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹55

Figura 11. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de paládio, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + HNO₃ 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,25 a 1,40 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹57

Figura 12. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de paládio, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, faixa de potencial: -0,40 a 1,35 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹58

Figura 13. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de paládio, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,80 a 1,30 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹59

Figura 14. Eletroferogramas para separação dos carboxilatos simulado através do PeakMaster. A: tampão MES/His. B: tampão TRIS/HCl. C: Tampão Li^+ /CHES. Comprimento do capilar: 45 cm (efetivo 25 cm), tensão: 30 kV, EOF: fluxo eletrosmótico, C5: pentanoato, C4: butanoato, C3: propanoato e C2: etanoato. A mobilidade do EOF para estas simulações foi ajustada conforme valores médios obtidos em experimentos reais63

Figura 15. Variação do potencial aplicado para oxidação dos álcoois (vs. Ag/AgCl, $\text{KCl}_{\text{sat.}}$). Tempo de injeção: 5 s, tempo de oxidação: 60 s. C5: ácido pentanóico, C4: ácido butanóico, C3: ácido propanóico, C2: ácido etanóico. Comprimento do capilar: 45 cm (25 cm efetivo), tampão de corrida: TRIS 30 mmol L^{-1} / HCl 10 mmol L^{-1} 66

Figura 16. Área sob os picos para cada álcool na Figura 15 em função do potencial aplicado para oxidação dos álcoois67

Figura 17. Variação do tempo de oxidação dos álcoois. Potencial de oxidação: 1,6 V vs. Ag/AgCl, $\text{KCl}_{\text{sat.}}$. Todos os outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 1568

Figura 18. Áreas dos picos do carboxilatos da Figura 17 em função do tempo de oxidação dos álcoois68

Figura 19. Eficiência de Conversão. Eletroferogramas para injeções de solução contendo 1 mmol L^{-1} dos padrões dos ácidos carboxílicos (sem oxidação) e dos álcoois (após oxidação). C3: ácido propanóico, C2: ácido etanoico e EOF: fluxo eletrosmótico. Comprimento do capilar: 45 cm (20 cm efetivo). Todos os parâmetros semelhantes aos da Figura 1769

Figura 20. Conjunto de eletroferogramas variando a concentração dos álcoois. Identificação dos picos e condições semelhantes à Figura 15, potencial de oxidação: 1,6 V vs. Ag/AgCl, $\text{KCl}_{\text{sat.}}$ 71

Figura 21. Curvas de calibração obtida pelo sistema EC-CE-C⁴D para os álcoois: A: etanol, B: 1- propanol, C: 1- butanol e D: 1- pentanol71

Figura 22. Repetibilidade: 10 injeções consecutivas do padrão contendo 1 mmol L⁻¹ dos álcoois. Mesmas condições da Figura 2073

Figura 23. Eletroferogramas das amostras diluídas 100 vezes e 1000 vezes sem realizar a oxidação e a amostra diluída 1000 vezes após a oxidação por 60 s a 1,6V. Condições semelhantes as da Figura 1975

Figura 24. Um conjunto de eletroferogramas para amostra de cerveja (dil. 1000 vezes). Tempo de injeção: 5 s, tempo de oxidação: 1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} e potencial de oxidação: 60 s. C2: ácido etanóico (proveniente do etanol), HCO₃⁻: pico de sistema devido o CO₂ gerado durante a oxidação e absorvido do ar em pH 8,676

Figura 25. Repetibilidade da altura dos picos para as 40 injeções consecutivas da amostra nas condições da Figura 2477

Figura 26. Repetibilidade dos sinais de corrente na célula eletroquímica durante a oxidação análises consecutivas da amostra de cerveja no sistema EC-CE-C⁴D77

Figura 27. Conjunto de eletroferogramas variando a concentração de 1- propanol (1, 10 e 50 mmol L⁻¹) e mantendo constante a concentração de etanol (1 mmol L⁻¹). C3: ácido propanóico, C2: ácido etanoico, ambos obtidos após o processo de oxidação nas condições da Figura 2479

Figura 28. Curva de calibração para etanol utilizando 1-propanol como padrão interno. A: através da área do pico e B: através da altura do pico. Eletroferogramas obtidos nas condições da Figura 2481

Lista de Tabelas

Tabela 1. Coeficiente de correlação (R), Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os álcoois. O desvio padrão (s) do ruído da linha base foi de 0,00118 u.a.72

Tabela 2. Resultados obtidos para quantificação de etanol em cerveja por EC-CE-C⁴D e CG-FID com os respectivos desvios padrão81

RESUMO

Santos, M. S. F. ***Derivatização Eletroquímica de Álcoois num Sistema em Fluxo para Determinação Quantitativa por Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica Sem Contato***. 2012. 88p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica poderosa de separação que explora as diferenças na mobilidade de espécies iônicas sob efeito do campo elétrico. Não permite, contudo, separação de misturas de moléculas neutras, possível mediante formação de complexos com carga, derivatização química ou cromatografia eletrocínética micelar (MEKC). A derivatização eletroquímica tem sido usada em combinação com HPLC, entre outras técnicas, mas não ainda com CE e para fins quantitativos, como proposto e demonstrado nesta dissertação, em que se enfoca, como sistemas modelo, álcoois primários de cadeia curta e se recorre a sistema em fluxo designado de EC-CE-C⁴D, que consiste de uma célula eletroquímica acoplada com equipamento de eletroforese capilar provido de detector de condutividade sem contato direto com os eletrodos. O sistema EC-CE-C⁴D, inicialmente concebido para efetuar pré-concentração e redissolução eletroquímica de metais seguida de separação eletroforética, possibilitou também o monitoramento de produtos com carga, formados em processos eletrocatalíticos, fato que inspirou a investigação da aplicabilidade, também do sistema à derivatização eletroquímica de analitos neutros em iônicos ou ionizáveis. Inicialmente, a oxidação de etanol foi avaliada por voltametria cíclica em eletrodos de ouro, paládio e platina policristalinos, nos meios ácido, neutro e alcalino. Maior formação de ácido acético se deu sobre platina em meio ácido (pH = 2,3). Entre os tampões avaliados por simulação (*PeakMaster 5.1*) para a separação dos carboxilatos, o TRIS/HCl (pH = 8,6) foi favorável em termos de resolução, rapidez e sensibilidade. Após a eletrooxidação da amostra sobre Pt a 1,6 V vs. Ag/AgCl por 60 s seguida de transferência de nanolitros dos produtos formados para o capilar por injeção hidrodinâmica, o meio ácido é trocado pelo tampão de corrida com auxílio de microbombas controladas por computador. A eficiência da conversão eletroquímica dos álcoois em carboxilatos, de 16% para etanol e propanol nas condições adotadas, apesar de não muito eficiente, proporcionou boa repetibilidade e limites de quantificação ao redor de $5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ para etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol, ou seja, cerca de 20 vezes melhores que os reportados para MEKC. As curvas analíticas para os 4 álcoois apresentaram boa linearidade ($R > 0,996$) e a boa separação entre os picos permitindo determinações quantitativas simultâneas. Como exemplo de aplicação a amostras reais, demonstrou-se a determinação quantitativa de etanol

em cerveja Pilsen convencional (teor alcoólico 4,5% vol.) e sem álcool (teor alcoólico <0,5% vol.), diluídas de 1000 vezes e 100 vezes, respectivamente. A repetibilidade das análises foi muito boa (~6% DPR, $n = 40$), indicando a estabilidade do sistema automático e ausência de envenenamento da superfície do eletrodo. Resultados ainda melhores foram obtidos utilizando 1-propanol como padrão interno para a determinação de etanol. Comparação dos resultados da dosagem alcoólica obtida com o sistema EC-CE-C⁴D e por CG-FID não apresentou diferença significativa utilizando um intervalo de confiança de 95 %, demonstrando a efetividade e concordância da nova combinação de técnicas. Este trabalho pioneiro, aliando derivatização eletroquímica com a eletroforese para a quantificação de espécies neutras, abre perspectivas de pesquisa não só para aprofundamento e otimização da análise de álcoois, como para a derivatização de outras espécies neutras na faixa de pH comum em CE, como aldeídos e açúcares.

Palavras-chave: Derivatização eletroquímica, Análise de álcoois por eletroforese capilar, Quantificação de etanol em cerveja.

ABSTRACT

Santos, M. S. F. ***Electrochemical Derivatization of Alcohols in a Flow System for Quantitative Determinations by Capillary Electrophoresis and Contactless Conductivity Detection***. 88p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful separation technique which exploits the differences in the mobility of ionic species under the effect of electric field. However, it does not allow the separation of mixtures of neutral molecules, and alternatives like formation of charged complexes, chemical derivatization and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) have been proposed. Electrochemical derivatization has been combined before with HPLC, among other techniques, but not yet with CE and for quantitative purposes, as proposed and demonstrated in this Masters Thesis, focusing as model systems, short chain primary alcohols, using a flow system, designated EC-EC-C⁴D, composed of an electrochemical cell coupled with a capillary electrophoresis equipment provided with conductivity detector without direct contact with the electrodes. The EC-CE-C⁴D system, originally proposed to perform electrochemical pre-concentration and stripping of metals followed by electrophoretic separation, also enabled the monitoring of charged products formed in electrocatalytic processes, inspiring the application of the system to electrochemical derivatization of uncharged analytes into ionic or ionizable ones. Initially, the ethanol oxidation was evaluated by cyclic voltammetry on gold, palladium and platinum polycrystalline electrodes, in acid, neutral and alkaline medium. Larger formation of acetic acid was observed on platinum in acid medium (pH = 2.3). Among the buffers evaluated by simulation (*PeakMaster 5.1*) for separation of carboxylates, aiming to compromise between resolution, speed and sensitivity, TRIS / HCl (pH 8.6) was favorable. After the sample electrooxidation on Pt at 1.6 V vs. Ag/AgCl for 60 s is replaced automatically (by computer controlled micropumps) by running buffer, followed by the hydrodynamic injection into the capillary of products formed, the acid medium is replaced by running buffer with help of computer controlled micropumps. The efficiency of the electrochemical conversion of alcohols into carboxylates, 16% for ethanol and propanol at the given conditions, although not very efficient, but showed good repeatability and rendered quantification limits around $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ for ethanol, 1-propanol, 1-butanol and 1-pentanol the 4 alcohols, about 20 times better for MEKC. The analytical curves for the four alcohols, showed good linearity ($r > 0.996$) and the separation between peaks allowed simultaneous quantitative determinations. As an example of application to real samples, the quantitative determination of ethanol in Pilsen conventional beer (alcohol content 4.5% vol.) and non-alcoholic beer (alcohol content <0.5% vol.) was carried out after 1000-fold and 100 fold dilution, respectively. The repeatability of the analysis was very good

(~6% RSD, $n = 40$), indicating the stability of the system and no poisoning of the electrode. Even better results were obtained using 1-propanol as an internal standard for the determination of ethanol. Comparison of results obtained with the CE-CE-C⁴D system and by GC-FID showed no significant difference for a confidence interval of 95%, demonstrating the effectiveness and consistency of the new combination of techniques. This proof of concept work of the combination of electrochemical derivatization with electrophoresis for quantification of neutral species opens perspectives not only for the optimization of the analysis of alcohols, but for research on the derivatization of other neutral species in the pH range typical for CE, like aldehydes and sugars.

Keywords: Electrochemical derivatization, Analysis of alcohols by capillary electrophoresis, Quantification of ethanol in beer.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Eletroforese Capilar	19
1.2. Detecção Condutométrica em Eletroforese Capilar	23
1.3. Análise de Espécies Neutras por Eletroforese Capilar	24
1.3.1. Cromatografia eletrocínética micelar	25
1.3.2. Derivatização	27
1.4. Álcoois	30
2. OBJETIVOS	36
3. PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1. Reagentes e Soluções	37
3.2. Instrumentação	37
3.2.1. Voltametria	37
3.2.2. Eletroforese capilar	38
3.2.3. Cromatógrafo a gás	38
3.2.4. Célula eletroquímica	39
3.2.5. Posicionamento do capilar	41
3.2.6. Sistema EC-CE-C ⁴ D	42
3.3. Procedimento	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Estudos Voltamétricos	45
4.1.1. Escolha do eletrólito suporte	46
4.1.2. Eletrooxidação de etanol em eletrodo de platina	47
4.1.3. Eletrooxidação de etanol em eletrodo de ouro	52
4.1.4. Eletrooxidação de etanol em eletrodo de paládio	56
4.2. Estudos Eletroforéticos	60
4.3. Aplicação do Sistema EC-CE-C⁴D	64
4.3.1. Composição do eletrólito para eletrooxidação dos álcoois	64
4.3.2. Avaliação do potencial aplicado para eletrooxidação	64
4.3.3. Escolha do tempo de oxidação	67
4.3.4. Eficiência de conversão	69

4.3.5. Curva de calibração	70
4.3.6. Repetibilidade	72
4.3.7. Aplicação à amostra real	74
4.3.8. Uso do padrão interno	78
4.4. Determinação Quantitativa de Etanol em Cerveja	79
4.4.1. Amostra	79
4.4.2. Determinação de etanol em cerveja utilizando o sistema EC-CE-C ⁴ D	80
5. CONCLUSÕES	82
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
<i>Curriculum Vitae</i>	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eletroforese Capilar

A eletroforese, técnica de separação baseada na velocidade de migração diferenciada de espécies carregadas sob ação de um campo elétrico, foi proposta na década de 1930 pelo químico sueco Tiselius, que demonstrou a separação parcial de algumas proteínas do soro sanguíneo[1]. Com o desenvolvimento da técnica passou-se a utilizar papel ou placas gelatinosas que, devido à sua porosidade, servem de meio e suporte para separação, e possuem aplicação até os dias atuais para separações de compostos biológicos. A elevada seção transversal e a alta concentração de eletrólito ocasionam a passagem de corrente de magnitude tal que a dissipação ineficiente e desigual do calor produzido (efeito Joule) pode aumentar a dispersão de bandas devido ao movimento convectivo e, em caso extremo, provocar degradação da amostra.

Em meados da década de 60, Hjerten[2], buscando minimizar o aquecimento durante as separações, realizou pela primeira vez a técnica utilizando um tubo sob rotação, permitindo a aplicação de potenciais de separação mais elevados. Sua contribuição foi o primeiro passo para o desenvolvimento da eletroforese capilar, qual se conhece hoje.

Aproveitando-se do aumento da eficiência de dissipação do calor com a redução do diâmetro interno (d.i.) do tubo devido ao aumento da relação entre a área de contato com as paredes e o volume interno, Jorgenson e Lukacs[3], na década de 1980, apresentaram as potencialidades da técnica para aplicação analítica, utilizando pela primeira vez, tubos capilares de 75 μm (d.i.). Essa

implementação marcou o início da utilização da técnica nos laboratórios de pesquisa, na modalidade de eletroforese capilar de zona (CZE – capillary zone electrophoresis) ou simplesmente eletroforese capilar (CE – capillary electrophoresis).

Em CZE, a separação de íons ou compostos ionizáveis é realizada no interior de um tubo capilar, também por diferenças na sua eletromigração, como ocorre na eletroforese em papel ou em gel, porém, mais rápida por permitir a utilização de um campo elétrico da ordem de 200 a 700 V cm⁻¹. Os capilares utilizados são confeccionados geralmente em sílica fundida e possuem diâmetro interno na ordem de dezenas de µm, sendo os mais utilizados entre 50 - 100 µm. Quanto ao comprimento, apesar da possibilidade de trabalhar com um amplo intervalo, 50 cm é um valor típico. Para alcançar o gradiente de potencial desejado, os equipamentos permitem aplicar diferenças de potencial da ordem de 10 a 30 kV entre as extremidades do capilar[1]. Devido à elevada dureza e fragilidade dos tubos de sílica, estes possuem seu exterior revestido por um filme de poliimida, garantindo-lhes não só proteção mecânica, mas também flexibilidade.

Uma importante característica da CE é o fluxo eletrosmótico (EOF). Por ser o capilar feito de sílica, a parede interna possui um caráter ácido (pKa médio = 5,9), proveniente dos grupos silanol. Em meio aquoso com pH igual, por exemplo, ao do pKa ocorre a dissociação de íons H⁺ de cerca de metade dos grupos silanol deixando a parede interna do capilar carregada negativamente. Nesse caso, a região adjacente a superfície interna do capilar se comporta como a dupla camada elétrica descrita pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern-Grahame[4], pelo qual íons (no caso, cátions) são atraídos eletrostaticamente para a superfície, ou

seja, ocorre adsorção. Dependendo do balanço energético das interações envolvidas frente à energia de hidratação, o íon pode ou não perder parte da sua bainha de hidratação. No primeiro caso, aproxima-se da superfície a uma distância que define o plano interno de Helmholtz (IHP). No segundo caso, o plano que passa pelo centro desses é denominado plano externo de Helmholtz (OHP). A concentração de íons com carga oposta à superfície vai diminuindo conforme aumenta a distância da superfície do capilar, até atingir a concentração do âmago (*bulk*) da solução, sendo essa região de transição definida como camada difusa. Sob o efeito do campo elétrico, ao ser aplicado o potencial de separação, esse cátions próximos à interface negativamente carregada do vidro migram para o eletrodo de carga oposta (cátodo), arrastando consigo o restante do líquido contido no fino capilar num processo designado de fluxo eletrosmótico (EOF). A partir de pH 2,5 já há EOF detectável e o aumento do pH da solução aumenta a dissociação dos grupos silanol e eleva proporcionalmente a velocidade do EOF, de forma mensurável, até pH 7,9.

Esse mecanismo eletrosmótico de transporte gera um perfil radial linear, minimizando os efeitos de dispersão das bandas observados em fluxo com perfil parabólico, característico de propulsão realizada por pressão, como em HPLC. Devido à soma vetorial do EOF com a migração de cada espécie, cátions têm seu deslocamento acelerado em direção ao cátodo (e ao detector, se posicionado neste extremo, como seria usual) enquanto espécies carregadas negativamente só podem chegar ao detector se possuírem um vetor velocidade inferior ao EOF. Já as espécies neutras acompanham o EOF, sem que haja separação entre duas ou mais.

Devido ao diâmetro interno dos capilares empregados em CE, o volume de amostra necessário para análise é pequeno, cerca de alguns μL , sendo que cada injeção utiliza entre 1 a 10 nL. O consumo de eletrólito também é reduzido, o que resulta em uma baixa geração de resíduos. Além disso, frente às técnicas de separação em fase líquida como cromatografia de íons (IC – ion chromatography) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – high performance liquid chromatography), a CE apresenta algumas vantagens. O equipamento trabalha a pressão atmosférica, dispensando bombas de alta pressão. O tempo necessário para separação é geralmente menor e a capacidade de resolução dos picos, superior à da HPLC, chegando a um milhão de pratos teóricos.

Quanto à detecção, em CE é possível utilizar os mesmos detectores empregados em HPLC, como por exemplo, os espectrométricos (por exemplo, absorção, fluorescência, Raman e massas) ou eletroquímicos (como condutividade, potenciometria e voltametria). Com a redução do volume injetado, reduz-se também o número de mols do analito disponível para detecção. Como consequência, os limites de detecção (LDs) são geralmente menos favoráveis que os alcançados por HPLC ou outras técnicas na análise de compostos em baixas concentrações, como por exemplo, metais por espectrometria de emissão ou absorção atômica. Métodos de pré-concentração podem ser utilizados para melhorar o LD, alguns destes métodos incluem processos de extração (em fase sólida, líquido-líquido ou gás-líquido) [5, 6] ou outros, como os eletroquímicos.

Recentemente, nosso grupo introduziu a combinação da pré-concentração eletroquímica (EPC) com a CE na determinação de traços de metais tóxicos[7], buscando viabilizar determinações nos baixos níveis exigidos pela legislação. Neste trabalho, além da pré-concentração eletroquímica seguida de redissolução,

outra estratégia baseada em fenômenos eletroquímicos de migração, mas já bastante explorada, também foi utilizada, o *stacking*. Basicamente, esse fenômeno ocorre quando o plug de amostra injetado contém uma condutividade inferior à do eletrólito de corrida, e, portanto, campo elétrico mais alto. Os analitos iônicos sofrem, pois uma aceleração e posterior empacotamento na interfase da banda da amostra com a do eletrólito, ponto a partir do qual os analitos acumulados passam a ser separados normalmente. O aproveitamento simultâneo dos dois processos, de pré-concentração eletroquímica seguido de *stacking* no capilar, possibilita alcançar uma intensificação de sinal observada no detector de até cinco ordens de grandeza, sendo duas devido à EPC[7] e de uma a três ordens de grandeza adicionais devido ao *stacking*[8].

1.2. Detecção Condutométrica em Eletroforese Capilar

A detecção condutométrica em CE data da década de 1970, com sua utilização em isotacoforese[9]. A primeira aplicação em CZE foi realizada por Zare e colaboradores[10] em 1987, recorrendo a dois microeletrodos de platina (25 μm de diâmetro) inseridos em capilares de 50 e 75 μm perfurados com laser de CO_2 , resultando em uma célula condutométrica de 30 pL de volume. Katzmayer e colaboradores[11] contribuíram com o desenvolvimento teórico sobre a otimização do tampão de corrida para detecção condutométrica em CE, relatando que as diferenças de condutância e a relação sinal-ruído não são dependentes apenas das diferenças de mobilidade entre o analito e o co-íon do tampão, mas também do contra-íon utilizado.

No fim da década de 90, os detectores condutométricos por acoplamento capacitivo sem contato ou detectores oscilométricos, ganharam destaque como alternativa a detecção condutométrica convencional. Nessa modalidade de detecção, os eletrodos são posicionados do lado externo do capilar, sem entrar em contato com a solução, evitando assim a contaminação e desgaste dos eletrodos, minimizando também os efeitos do campo elétrico para as separações eletroforéticas. Um sinal alternado de alta frequência é aplicado entre os dois eletrodos na cela de detecção. A medida de condutividade é possível, pois, com o aumento da frequência, a reatância capacitiva diminui e consequentemente a impedância da parede do capilar também é reduzida, permitindo que, mesmo com os eletrodos posicionados do lado externo do capilar, as variações de condutividade da solução em seu interior possam ser observadas. Esse tipo de detecção para CE foi introduzido simultaneamente em publicações independentes por Fracassi da Silva e do Lago[12], com um protótipo operado a 600 kHz, e por Zemmann e colaboradores[13], com um protótipo operando a 20 e 40 kHz. Quando aplicado a CE, o nome com que esse detector acabou se consagrando foi detecção condutométrica sem contato (CCD – contactless conductivity detection) e, posteriormente, C⁴D (capacitively coupled contactless conductivity detection).

1.3. Análise de Espécies Neutras por Eletroforese Capilar

Por ser uma técnica onde a separação baseada nas diferenças de velocidade de migração de espécies carregadas quando submetidas a um campo elétrico, compostos neutros não podem ser separados por eletroforese convencional, já que são simplesmente arrastados pelo fluxo eletrosmótico,

chegando todos juntos ao detector. Assim, é necessário recorrer a técnicas como a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC – micellar electrokinetic chromatography), na qual a separação ocorre baseada na diferença no coeficiente de partição de espécies neutras entre uma micela e o eletrólito de corrida.

Alternativas a MEKC, como complexação e derivatização, também têm sido utilizadas com a finalidade de inserir carga, mesmo que parcial, em espécies neutras a fim de possibilitar a análise por eletroforese capilar convencional (CZE). Essas duas opções já bem estabelecidas serão sumarizadas a seguir.

1.3.1. Cromatografia eletrocinética micelar

Terabe e colaboradores[14] introduziram em 1984 a MEKC, técnica em que a separação acontece devido à interação das espécies com uma fase pseudoestacionária. Na prática, adiciona-se ao eletrólito de corrida tensoativos, p.ex., aniônicos, com concentração superior à micelar crítica (CMC). Acima da CMC, as micelas formadas em meio aquoso configuram-se com a parte polar para fora e as caudas apolares voltadas para o centro da micela, permitindo a interação com as moléculas neutras. As micelas de tensoativos aniônicos, por apresentarem carga superficial negativa, migram no sentido oposto ao EOF, sendo a separação das moléculas baseada no seu coeficiente de partição entre a fase aquosa e a micelar. Quanto maior a interação da molécula em estudo com a micela, maior a fração do tempo em que este analito será transportado com velocidade e sentido igual ao da micela (sentido oposto do detector), e não do EOF, atrasando (ou, em caso extremo, impedindo) a chegada ao detector. Dessa

forma, pode-se dizer que o tempo mínimo que uma espécie leva para sair do capilar é o mesmo do EOF (mínima interação com a micela) e o tempo máximo é o mesmo da micela (transferência para o interior da micela altamente favorecido). Essa característica pode ser vista como a diferença conceitual entre MEKC e HPLC, pois enquanto em HPLC a janela temporal é teoricamente infinita, em MEKC está limitada ao intervalo entre o tempo de migração do EOF e o da micela. Os conceitos e aplicações da técnica tem sido abordados por Terabe em trabalhos de revisão[15,16].

Quando a separação micelar não é satisfatória devido à similaridade de coeficientes de partição dos analitos, uma alternativa é recorrer à adição de complexantes auxiliares, como por exemplo, as ciclodextrinas, que são constituídas por moléculas de glicose (6 a 8), formando uma estrutura semelhante ao “tronco de um cone”. Por serem neutras, migram com a mesma velocidade do EOF e a diferença na partição dos analitos entre o interior da ciclodextrina e a micela fornece a seletividade extra necessária para separação[17].

Em MEKC, a detecção das espécies é geralmente realizada por espectrofotometria UV/Vis e quando os analitos não absorvem nesse intervalo de comprimento de onda, uma derivatização na molécula para inserir um grupo cromóforo é necessária. A determinação condutométrica de espécies neutras, aparentemente impraticável, é possível devido à alteração que essas espécies causam no eletrólito (tampão de corrida) ou mesmo na micela, o que altera a condutividade da zona de amostra. Álcoois alifáticos foram separados e determinados por esta metodologia, porém, os mecanismos de detecção por C^4D para essas espécies ainda não estão totalmente esclarecidos. Os limites de detecção obtidos, por sua vez, situam-se na ordem de 1 mmol L^{-1} . Fracassi e do

Lago[18] demonstraram, pela primeira vez, a separação de álcoois alifáticos através da MECK e detecção por condutividade sem contato. Segundo os autores, três hipóteses são formuladas para esta detecção: (i) álcoois tem uma constante dielétrica inferior à da água e, assim, reduzem a admitância da célula de detecção, (ii) o volume das micelas aumenta devido à interação com as moléculas de álcoois, variando sua mobilidade, (iii) uma alteração na viscosidade e na capacidade de solvatação dos íons do tampão podem ocorrer como consequência da presença dos álcoois.

1.3.2. Derivatização

A derivatização, técnica que consiste em realizar uma modificação no analito, tem sido empregada para melhorar, ou mesmo permitir a detecção de espécies em técnicas de separação como HPLC e CE. Esse tipo de estratégia consiste em adicionar à molécula grupos como, por exemplo, cromóforos (para detecção por absorção UV-Vis) ou fluorescentes (para detecção por fluorescência induzido por laser – LIF), e em alguns casos, grupos que permitam separações quirais, como descrito por Underberg e colaboradores em revisões sobre o tema[19-21].

Para possibilitar a separação de espécies neutras em CZE, reações com a finalidade de inserir carga na molécula têm sido empregadas. Mainka e Bächmann[22] determinaram aldeídos em amostras de água de chuva após reação com *5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfon-hydrazide* (*dansylhydrazine*, *DNSH*), que permitiu detecção em nível traço por absorção UV utilizando uma célula em forma de Z. A reação de álcoois graxos etoxilados com *2-fluoro-1-*

methylpyridinium p-toluenesulfonate (FMPTS), inserindo uma carga positiva e um grupo cromóforo e possibilitando separação por CE com detecção UV, foi demonstrada por Otsuka e colaboradores[23]. A determinação de álcoois alifáticos (de 1 a 8 carbonos) após derivatização com ditiolcarbonato foi demonstrada por Lee e colaboradores[24]. Do Lago e colaboradores[25], estudaram a formação de monoalquilcarbonatos através da reação de álcoois alifáticos com bicarbonato em meio aquoso. Nesse trabalho, os produtos obtidos a partir de álcoois (de 1 a 5 carbonos) foram separados por um equipamento de CE munido de dois detectores de condutividade sem contato (C^4D), possibilitando a determinação de parâmetros físico-químicos, como constantes de equilíbrio e formação. Gonçalves e Micke[26] determinaram glicerol livre em amostras de biodiesel através da reação com periodato, quantificando o iodato formado por CE com detecção UV. A separação e determinação de polietileno e polipropileno glicóis, após derivatização usando anidrido ftálico ou anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico, também foram demonstradas[27].

A derivatização eletroquímica pode representar uma alternativa interessante à derivatização química para converter espécies neutras em iônicas, vez que evita a utilização de reagentes, que aumentam o número de espécies a serem separadas, e minimiza a geração de resíduos, dentre eles, oxidantes fortes como o periodato. Porém, raríssimos são os trabalhos que fazem uso dessa estratégia para CE. Osaka e colaboradores[28] em 2003, demonstraram a possibilidade de detectar quinonas resultantes da geração de radicais em uma célula eletroquímica de três eletrodos, acoplada ao CE. Após gerar os radicais, uma alíquota é injetada no capilar, utilizando injeção eletrocinética, e o capilar é deslocado da célula eletroquímica para a célula contendo o eletrólito de corrida do

CE, onde é iniciada a separação. Também em 2003, Matysik[29], introduziu o que chamou de injeção eletroquimicamente assistida (EAI), onde, em uma célula eletroquímica, espécies iônicas ou ionizáveis podem ser geradas, permitindo assim a separação por CE. Nesse trabalho, ferroceno e alguns derivados foram utilizados como modelo, e o produto da reação detectado por UV. Em 2011, com uma célula eletroquímica atualizada, Matysik e Scholz[30] demonstraram a possibilidade de detectar derivados de ferroceno por CE-MS após conversão eletroquímica. Nesse trabalho, uma extremidade do capilar é montada próximo ao eletrodo de trabalho em que se dá a oxidação eletroquímica, para injeção hidrodinâmica de amostra e, em seguida a célula é substituída por um *vial* contendo o eletrólito de corrida (tampão). A implementação utilizada não permite realizar análise quantitativa de rotina, devido à laboriosidade do procedimento e, principalmente, à dificuldade de posicionar de forma reprodutível o capilar na célula eletroquímica a cada novo experimento. Variação na distância entre a extremidade do capilar e a superfície do eletrodo de trabalho, onde as espécies iônicas ou ionizáveis são geradas e transportadas por difusão para o interior da solução (salvo espécies insolúveis), altera a posição em que se dá a amostragem para CE dentro do gradiente de concentração a partir do eletrodo.

Recentemente, o grupo de pesquisa coordenado pelo orientador desta dissertação superou os citados problemas de posicionamento do capilar rente ao eletrodo nas alternâncias entre as fases de processamento eletroquímico e separação por CE, construindo um sistema com célula eletroquímica em fluxo alimentado por microbombas no qual o capilar pode ser mantido fixo ou recolocado na mesma posição. A primeira aplicação dada a este sistema, que pode ser genericamente designado por EC-CE-C⁴D (*Electro Chemistry - Capillary*

Electrophoresis - Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection), foi a pré-concentração eletroquímica de metais por redução, seguida de redissolução por oxidação, injeção e separação por CE seguida de detecção por C⁴D, viabilizando determinações quantitativas simultâneas com ganho de duas ordens de grandeza no limite de detecção[7]. Também foi demonstrada a aplicação do novo sistema a estudos de eletrocatalise, servindo o monitoramento de produtos da eletrooxidação de glicerol como sistema modelo, onde foi comparada a atividade eletrocatalítica de eletrodos de metais nobres (Au, Pd e Pt) submetidos a diferentes potenciais [31]. Trata-se, pois, de uma nova alternativa, mais simples e de custo muito menor que a utilização de espectrometria de massa que, por sua vez, oferece maior sensibilidade e capacidade de identificação dos compostos.

Os resultados desse trabalho pioneiro de estudo de produtos de processo de oxidação eletrocatalítica por EC-CE-C4D, no caso, glicerol em concentração alta (0,1 mol L⁻¹) e conhecida, inspiraram o direcionamento das pesquisas, também, para a derivatização eletroquímica visando à determinação quantitativa de analitos neutros em amostras, tema desta dissertação, em que investigou alguns álcoois primários de cadeia curta como sistemas modelo.

1.4. Álcoois

Os álcoois alifáticos possuem ampla aplicação como matéria-prima e/ou solvente na indústria em diversos ramos como farmacêutico, cosméticos, tintas e produção de surfactantes. Dentre eles, destaca-se o etanol pela importância adicional na produção de bebidas alcoólicas (fermentadas e destiladas) e, principalmente nas últimas décadas, pelo seu uso como combustível alternativo

ou aditivo aos derivados de petróleo. O etanol é facilmente obtido a partir de fontes renováveis, sendo o Brasil o segundo maior produtor no mundo, ficando atrás apenas dos EUA. Na safra 2010/2011, segundo a EMBRAPA, foram produzidos no Brasil 27,6 bilhões de litros de etanol, sendo 8 bilhões anidro e 19,6 bilhões hidratado[32]. Em 2011, o Brasil produziu 3,3 bilhões de litros de cerveja[33] bebida alcoólica cujo consumo anual per capita aumentou de 45 litros (em 2000) para 65 litros (em 2011) no país, ajudando a empresa AMBEV a se posicionar entre a mineradora Vale do Rio Doce e a Petrobrás em valor de mercado [34].

Na indústria, misturas de álcoois alifáticos são geralmente analisadas por cromatografia gasosa (CG), devido à sensibilidade da técnica e o tempo de análise relativamente curto, além de não ser necessário realizar modificação na amostra. Serve de exemplo o método padrão para determinação de etanol em cerveja[35]. Algumas publicações empregam HPLC para determinação de álcoois alifáticos, porém, devido principalmente aos detectores utilizados, é necessário realizar derivatização. Servem de exemplo os trabalhos de Haj-Yehia e Beneta[36], que após derivatizar a amostra com 2 - (4-carboxifenil)-6-metoxibenzofurano, realizou detecção por fluorescência, e de Afonso e colaboradores[37] sobre a determinação por absorção no UV de álcoois alifáticos de cadeia longa em amostras de óleos vegetais após derivatização com *diphenic anhydride*. Synovec e colaboradores[38] empregaram HPLC com detecção por ionização por chama (FID) na determinação de álcoois alifáticos de cadeia curta em misturas contendo fenóis.

Como citado anteriormente, álcoois alifáticos não podem ser separados por CZE. Uma alternativa é recorrer-se a MEKC, como fizeram Amankwa e Kuhr[39]

que, utilizando detecção indireta por fluorescência, demonstraram a possibilidade de quantificação desses compostos. A implementação de Chen e Huang[40], que consiste em um microeletrodo de níquel inserido no fim do capilar (end-column) possibilitou a análise quantitativa de álcoois em bebidas por MEKC com detecção voltamétrica.

Álcoois alifáticos são facilmente oxidados, quando na presença de fortes oxidantes como permanganato em meio ácido (KMnO_4/H^+) ou periodato. O mesmo efeito foi observado quando submetido a potenciais positivos em eletrodos de metais, devido aos efeitos catalíticos. Essa propriedade favoreceu o aumento dos estudos desses compostos visando à aplicação em células combustível como alternativa aos combustíveis gasosos, como metano e hidrogênio, principalmente pela facilidade de obtenção, manipulação e armazenamento.

O metanol tem sido aplicado como combustível em células de combustível de álcool direto (DAFC - *direct alcohol fuel cell*). Até o momento, esse álcool têm se mostrado o mais eficiente, pois, por ter apenas um átomo de carbono, é mais fácil ocorrer sua oxidação total (conversão a CO_2)[41]. O etanol tem despertado interesse para essa aplicação, como uma alternativa ao metanol, que por sua vez, é tóxico. Além disso, o etanol fornece maior densidade energética teórica, 8 kWh kg^{-1} (sendo 6 kWh kg^{-1} para o metanol) e é facilmente obtido em larga escala, a partir de matéria rica em açúcar. O rendimento energético durante os processos de oxidação catalítica de um álcool é dependente do produto formado. Álcoois primários geram como produtos aldeídos, ácidos carboxílicos e dióxido de carbono (CO_2), enquanto que álcoois secundários formam cetona e CO_2 [42]. A maior densidade de energia é obtida na oxidação total a CO_2 , que pode ocorrer

por diferentes caminhos, podendo o produto passar por etapas intermediárias, onde o número elétrons envolvidos está associado a cada produto formado, como esquematizado na Figura 1. O etanol é constituído por dois átomos de carbono, sendo assim, a oxidação total implica na quebra da ligação carbono-carbono, que é conhecido por ser difícil. Dessa maneira, os principais produtos da oxidação catalítica do etanol são acetaldeído (CH_3COH), ácido acético (CH_3COOH) e dióxido de carbono (CO_2), em proporções que dependem de fatores como composição do eletrólito, pH do meio[43], temperatura, material do eletrodo (composição, estrutura e condição superficial) e concentração do álcool[44].

Algumas espécies fortemente adsorvidas como, por exemplo, o monóxido de carbono (CO), podem levar à inativação do eletrodo (envenenamento) devido ao bloqueio da superfície. Grupos de pesquisa vêm trabalhando em busca de condições ideais, ou uma aproximação, para operação das DAFC's. Com isso, diversos materiais de eletrodo têm sido investigados, como platina mono[45] e policristalina[46], paládio[47], ouro[48], ligas metálicas como níquel/platina/níbio[49], ouro/rutênio[50], e metais menos nobres como níquel em meio alcalino[51]. Membranas íon seletivas[52] têm sido utilizadas buscando minimizar os efeitos de envenenamento do eletrodo. Esses estudos visam principalmente melhorar a eficiência de conversão, que no caso de álcoois com mais de um carbono, como o etanol, significa superar a barreira energética para a quebra da ligação carbono-carbono.

Figura 1. Representação esquemática dos caminhos paralelos para oxidação do etanol e o número de elétrons envolvidos em cada caminho.

A conversão total do álcool a CO_2 é um fator determinante para aplicação em DAFC devido à maior energia extraída. Porém, quando se visa, como nesta dissertação, derivatizar álcoois eletroquimicamente para análise por CE, os produtos de interesse são os respectivos ácidos carboxílicos, que em pH duas unidades acima de seu pK_a , encontra-se majoritariamente desprotonado (99%) na forma de íons carboxilato. Neste caso, a maior dificuldade para quebra da ligação C-C, inibindo a oxidação a CO_2 torna-se uma vantagem em termos da fração molar convertida a carboxilato. Em suma, como demonstrado por Gutz e colaboradores[31], estudando os produtos da oxidação catalítica do glicerol, é possível gerar eletroquimicamente espécies carregadas a partir de neutras, o que permite a separação por CE e detecção por C^4D . Através desse estudo, foi possível a aplicação do sistema, inicialmente desenvolvido para a pré-concentração de metais, à quantificação de álcoois alifáticos de cadeia curta, após a conversão aos respectivos ácidos carboxílicos. Devido à posição de

destaque da indústria cervejeira na economia do País e por ser uma matriz relativamente complexa, a cerveja foi escolhida como modelo para determinação quantitativa de etanol.

2. OBJETIVOS

Aplicar o sistema EC-CE-C⁴D à determinação de espécies neutras. Efetuar a derivatização eletroquímica de álcoois alifáticos de cadeia curta seguida da separação de seus respectivos carboxilatos.

Desenvolver técnica analítica para análise de etanol em amostras reais, a começar por cerveja pilsen convencional (teor alcoólico 4,5% vol.) e sem álcool (teor alcoólico <0,5% vol.).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas empregando água deionizada (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) em sistema de purificação Nanopure[®] (Barnstead). Todos os reagentes comumente utilizados em laboratório, como hidróxido de sódio, as soluções concentradas de ácido clorídrico (37%, m/v) e ácido nítrico (65%, m/v) e os álcoois etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol, foram de grau de pureza analítica ou superior, sendo parte destes obtidos de empresas nacionais como Synth ou Vetec. Os reagentes mais específicos como o ácido 2[N-morfolino]etanosulfônico (MES), a L-Histidina (His), o ácido N-Ciclohexil-2-aminoetanossulfônico (CHES) e o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) foram obtidos da Sigma ou Merck.

3.2. Instrumentação

3.2.1. Voltametria

As análises voltamétricas foram realizadas utilizando um analisador voltamétrico equipado com eletrodo rotatório, Computrace (Metrohm-Pensalab). Para os estudos da oxidação dos alcoóis, os eletrodos de trabalho em forma de disco foram utilizados sendo o de platina com 3 mm de diâmetro e os de paládio e ouro com 2 mm de diâmetro, fornecidos pela Metrohm Autolab (Utrecht, Holanda). Em ambos os estudos, como eletrodo de referência, foi utilizado um Ag/AgCl,

KCl_{Sat} e como eletrodo auxiliar, um fio de platina, ambos eletrodos comerciais (Metrohm Autolab). Antes de iniciar cada experimento, os eletrodos de trabalho passaram por polimento mecânico com alumina 0,1 μm .

3.2.2. Eletroforese capilar

O equipamento de eletroforese capilar utilizado foi construído no próprio laboratório por do Lago e colaboradores, que também criaram o detector do tipo C⁴D empregado[12]. Para interfacear a célula eletroquímica com o equipamento de eletroforese capilar, na extremidade aterrada do capilar, o compartimento do eletrólito de corrida foi substituído pela célula eletroquímica. O potenciostato, protegido de descargas acidentais de alta tensão, também foi construído no laboratório[7]. As separações foram realizadas aplicando uma diferença de potencial de 30 kV entre as extremidades do capilar (cerca de 670 V cm⁻¹). Um capilar de sílica fundida (Agilent) com 45 cm de comprimento, sendo 25 cm o comprimento efetivo (variável conforme a necessidade) e 50 μm de diâmetro interno foi utilizado. Antes de iniciar os experimentos, o capilar foi pré-condicionado passando NaOH 0,1 mol L⁻¹ (10 min), em seguida água deionizada (10 min) e para finalizar, eletrólito de corrida (10 min).

3.2.3. Cromatógrafo a gás

Para comparação dos resultados e validação da técnica, utilizou-se um cromatógrafo a gás disponível no laboratório didático do Instituto de Química - USP. Um equipamento modelo GC-17A (Shimadzu), munido com uma coluna

polar Simplicity-Wax (polietileno glicol) de dimensões 30m x 250 μm x 0,25 μm , injetor split/splitless com detector por ionização por chama (FID), acoplado a um computador com *software* para aquisição e tratamento dos dados. Como fase móvel usou-se nitrogênio (N_2) com vazão de 1,4 mL min^{-1} . O injetor e o detector, operaram à uma temperatura de 210 $^{\circ}\text{C}$, enquanto no forno, a temperatura foi 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 min, sendo que, para limpeza da coluna, após esse tempo, uma rampa de 100 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ foi realizada até atingir 210 $^{\circ}\text{C}$. O volume injetado foi 1 μL com split 1:1 para a cerveja Pilsen convencional (teor alcoólico 4,5% vol.) e 1:10 para a cerveja sem álcool (teor alcoólico <0,5% vol.). Propanona (MERCK) foi usada como solvente para diluir as amostras e acetato de etila (MERCK) como padrão interno. As soluções-padrão foram preparadas com etanol (MERCK). A diluição das amostras de cerveja foi de 1:100 para a cerveja convencional e 1:20 para a cerveja sem álcool.

3.2.4. Célula eletroquímica

A célula eletroquímica acoplada ao CE é composta por dois blocos (um de Kel-F e outro de acrílico) separados entre si por um espaçador de 200 μm de espessura, possuindo aproximadamente 4,5 μL de volume interno. O bloco inferior possui dois eletrodos de platina embutidos em um bloco de Kel-F comercial, sendo um empregado como eletrodo de trabalho e o outro como eletrodo auxiliar. A parte superior da célula dispõe de um fio de prata embutido, recoberto por um filme de cloreto de prata que toca a solução, utilizado como eletrodo de referência (quase-referência), um orifício para entrada do capilar do CE e mais dois orifícios, um para entrada e outro para saída do fluxo, como

apresentado na Figura 2. Essa célula foi projetada e construída no próprio laboratório e detalhadamente descrita em publicações[7, 53].

Figura 2. Representação esquemática da célula eletroquímica em fluxo: a – bloco superior (PMMA), b – espaçador de teflon (200 µm), c – bloco inferior de Kel-F, d – entrada do fluxo, e – septo de silicone para posicionar o capilar, f – capilar de sílica fundida, g – fio de prata (eletrodo de Ag/AgCl *quase-referência.*), h – saída do fluxo, i – eletrodo auxiliar (Pt), j – eletrodo de trabalho (Pt) e k – parafusos[53].

Para aplicação do filme de cloreto de prata ao disco de prata (1 mm de diâmetro) de modo a formar o eletrodo de quase-referência da célula eletroquímica (Ag/AgCl *quase-referência.*), o bloco superior, que possui o fio de prata embutido, foi mergulhado em uma béquer contendo uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. O fio de prata foi conectado como eletrodo de trabalho, um fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar e a oxidação da prata foi efetuada durante 600 s aplicando-se 0,5 V vs. Ag/AgCl, KCl *Sat.* Após o término do experimento, o eletrodo foi observado no microscópio para verificar a homogeneidade do filme de AgCl formado em sua superfície.

3.2.5. Posicionamento do capilar

A distância média entre a entrada do capilar e a superfície do eletrodo de trabalho adotada no trabalho foi de 50 μm . Um procedimento anteriormente publicado pelo grupo[7] permite manter esta distância constante e reprodutível, mesmo sem fazer uso de parafusos microposicionadores. Para isso, a ponta do capilar é lapidada a um ângulo de $15,5^\circ$, permitindo que toque na superfície do eletrodo sem bloquear o orifício de entrada. A Figura 3a, apresenta quatro capilares polidos em diferentes ângulos. Como apresentado na Figura 3b, o aparato utilizado para polir o capilar consiste em um bloco de acrílico, perfurado com o ângulo desejado e provido de um septo de Tygon na extremidade do furo para fixá-lo. Após posicionar o capilar no bloco de acrílico, a extremidade oposta deste é imersa em água e submetida a uma pressão positiva, com isto, o polimento pode ser realizado sobre a superfície de uma lixa d'água com granulometria 1000 enquanto a água flui por seu interior para evitar o entupimento.

A intensidade do sinal obtido no C^4D quando o sistema EC-CE- C^4D foi proposto para pré-concentração de metais foi avaliada em função dos vários ângulos de polimento[7] concluindo-se que o ângulo de $15,5^\circ$, correspondente à distância média de 50 μm entre o eletrodo e o orifício do capilar proporcionava bons resultados.

Figura 3. a – capilares de sílica após polimento em ângulos diferentes (22,6°, 15,5°, 7,9°, 3,2°), b – bloco de acrílico utilizado para realizar o polimento do capilar com ângulo de 15,5° [53].

3.2.6. Sistema EC-CE-C⁴D

O sistema EC-CE-C⁴D é totalmente baseado em fenômenos eletroquímicos, afora as microbombas solenóide para propulsão de soluções e bombas de ar (do tipo usado em aquários) para pressurização ou despressurização do capilar na extremidade oposta à célula eletroquímica. O sistema, inteiramente automatizado, permite injetar no capilar alguns nanolitros de amostra colhida a poucos micrometros na interface eletrodo/solução. Com esse sistema foi possível realizar pré-concentração de metais em fluxo através da deposição sobre a superfície do eletrodo de trabalho, nesse caso, carbono vítreo, redissolver e injetar uma fração no CE, seguida de separação e detecção[54]. O estudo dos produtos da oxidação do glicerol em diferentes materiais de eletrodo também foi realizado utilizando esse sistema[31]. Uma representação esquemática do sistema completo é apresentada na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática do sistema EC-CE-C⁴D: C⁴D – detector condutométrico sem contato, HV – fonte de alta voltage, VP – bomba de vácuo, PP – bomba de pressão, RE – eletrodo de Ag/AgCl_{quase-referência}, WE – eletrodo de trabalho, AE – eletrodo auxiliar, i/V – conversor de corrente voltagem do CE, A/D – ponto de monitoramento da corrente obtida no CE; μPs – microbombas solenoide[54].

Duas das 3 microbombas solenóide modelo 090SP (Biochem Valve, NJ, USA) volume nominal de 10 μL/pulso e servem para propulsão do tampão de corrida (μB1) e água (μB2) enquanto a 3^a microbomba (μB3), responsável pela propulsão da amostra, possui volume nominal de 5 μL/pulso. Os tubos de conexão são de PTFE e possuem 0,5 mm de diâmetro interno. Para controle da instrumentação e aquisição de dados do sistema EC-CE-C⁴D foi utilizado um software desenvolvido em LabVIEW 8.0 (National Instruments, Texas, EUA).

3.3. Procedimento

Inicialmente, através da μB1, 0,2 mL (vazão 1,0 mL min⁻¹) do tampão de corrida são propelidos através da célula eletroquímica enquanto 0 V vs. Ag/AgCl_{quase-referência} é aplicado no eletrodo de trabalho para limpeza e reativação da

superfície. Um *flush* é realizado no capilar, aplicando pressão de aproximadamente 5 kPa durante 20 segundos ao reservatório posicionado na extremidade oposta à da célula, para limpar e preencher todo o capilar do CE com o tampão de corrida. Em seguida, 0,1 mL (vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) de água deionizada são propelidos pela μB2 até a célula eletroquímica para lavagem da célula e, também, para injeção quando se deseja usar o *stacking*. Posteriormente, através da μB3 , 0,2 mL (vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$), a amostra é deslocada até a célula eletroquímica, onde é oxidada aplicando-se um potencial definido, durante um determinado intervalo de tempo. Após a etapa de oxidação, uma fração da amostra oxidada é injetada no CE, reduzindo a pressão no reservatório posicionado na extremidade oposta à da célula e novamente 0,2 mL (vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$) do tampão é propulsionado até a célula eletroquímica. Aplica-se o campo elétrico de separação (30 kV), e os produtos formados durante a oxidação dos álcoois, nesse caso ácidos carboxílicos, são separados e detectados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos Voltamétricos

Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltametria cíclica é bastante utilizada para estudar espécies orgânicas e inorgânicas que sofrem redução ou oxidação sobre a superfície do eletrodo. Essa técnica consiste em efetuar uma varredura de potencial em forma de onda triangular (em degraus ou pulsada), partindo, via de regra, de um potencial em que não ocorre processo faradaico, seguindo inicialmente no sentido positivo, para processos de oxidação, ou negativo, para reduções. A reversão do sentido de varredura costuma ser feita num potencial em que o(s) processo(s) de eletrodo já ocorre(m) com plena velocidade, ou então, a corrente residual atinge valor indesejavelmente elevado. O ciclo pode ser repetido quantas vezes necessário, de forma a se explorar as características desejadas.

A literatura sobre a eletroquímica de álcoois continua se expandindo, especialmente, do metanol e do etanol, ambos de grande interesse na alimentação de células combustíveis. Muitos estudos de mecanismos, produtos e intermediários gerados durante o processo de oxidação são realizados por voltametria e focalizam a busca de novos materiais ou ligas metálicas com maior eficiência de oxidação total a CO_2 sem envenenamento do eletrodo.

Para subsidiar a escolha de condições de trabalho na derivatização eletroquímica de álcoois, bem como familiarizar-se com a própria voltametria, registraram-se voltamogramas com eletrodos de platina, ouro e paládio policristalinos, nos meios ácido, neutro e alcalino.

4.1.1. Escolha do eletrólito suporte

Na escolha do eletrólito, os estudos voltamétricos foram direcionados focando principalmente a aplicação final na célula de interfaceamento com a eletroforese capilar, EC-CE-C⁴D. Para oxidação de álcoois, geralmente se utiliza ácido perclórico, sulfúrico ou nítrico (meio ácido) e hidróxido de sódio ou potássio (meio alcalino). Como é bem conhecido, em estudos voltamétricos que não sejam com microeletrodos, recorre-se ao uso de eletrólito em concentração de 100 a 1000 vezes maior que a da espécie de interesse para que o transporte de massa por migração seja desprezível frente ao transporte de massa por difusão.

Em eletroforese capilar, a força iônica do eletrólito de corrida (tampão) e da banda da amostra são fatores importantes a serem considerados. Condutividade elevada para o eletrólito de corrida acarreta maior intensidade de corrente e, conseqüentemente, aquecimento do meio, que por sua vez causa instabilidade na linha de base, aumento do ruído, diminuição da sensibilidade, ou em casos extremos, formação de bolhas com perda de contato eletrolítico. Para abranger os meios ácido, neutro e alcalino, as composições dos eletrólitos foram: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + HNO₃ 10 mmol L⁻¹, KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ e KNO₃ 0,5 mmol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹ na voltametria e HNO₃ 10 mmol L⁻¹, KNO₃ 10 mmol L⁻¹ e NaOH 10 mmol L⁻¹ com o sistema EC-CE-C⁴D.

Os voltamogramas cíclicos foram registrados na faixa de potencial disponível entre as correntes anódica de formação de oxigênio e catódica de formação de hidrogênio. Antes de iniciar as análises, os eletrodos foram condicionados durante 30 ciclos no próprio eletrólito, realizando a varredura dentro do intervalo de potencial estabelecido.

4.1.2. Eletrooxidação de etanol em eletrodo de platina

Como já discutido, os produtos de oxidação de etanol em eletrodo de platina são principalmente acetaldeído e ácido acético, sendo pequena a fração de dióxido de carbono. Como demonstrado por Camara e Iwasita[44], a concentração do etanol influencia na proporção dos produtos formados. Em meio ácido ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$), com o crescimento da concentração de etanol ($0,01$ a 1 mol L^{-1}) o produto majoritário passa de ácido acético para acetaldeído. Isso ocorre porque quanto mais sítios ativos são ocupados pelo álcool, menos se encontram livres para adsorção da água, essencial para fornecer o oxigênio necessário para formar espécies como ácido acético e CO_2 . Mesmo após centenas de publicações sobre o tema, os mecanismos de formação dos produtos e intermediários ainda não foram totalmente elucidados, permitindo ainda um amplo campo de estudos.

Os voltamogramas cíclicos obtidos para etanol em meio ácido foram semelhantes aos descritos na literatura, onde três fenômenos podem ser observados, como mostra a Figura 5. Na varredura para potenciais mais positivos, ocorrem dois sinais de oxidação, em aproximadamente $0,60$ e $1,03 \text{ V}$. O primeiro processo é atribuído à formação de uma camada de hidróxido de platina na superfície do eletrodo, produzida pela adsorção e quebra de uma molécula de água, conforme Reação 1. Esse fenômeno é importante no processo catalítico para oxidação do etanol, fornecendo o segundo oxigênio necessário para conversão aos produtos dioxigenados, como ácido acético e CO_2 . Em paralelo a esse fenômeno, ocorre a oxidação de uma pequena fração do etanol, conforme

Reação 3. O segundo sinal refere-se ao processo de oxidação do etanol, gerando os produtos já mencionados. Num dos mecanismos propostos, o etanol da solução adsorve no eletrodo (Reação 2) sendo oxidado a acetaldeído (Reação 3), e em seguida à ácido acético (Reação 4). O número de elétrons envolvido coincide com o descrito na Figura 1.

Figura 5. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de platina, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + HNO₃ 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,35 a 1,45 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Em meio neutro, como esperado, o voltamograma cíclico obtido é semelhante ao registrado em meio ácido, apresentando os mesmos sinais de oxidação e redução, mas com um pequeno deslocamento dos picos no sentido negativo dos potenciais de pico, como mostrado na Figura 6. Na varredura para potenciais positivos, os dois sinais de oxidação do etanol aparecem em 0,43 V e 0,93 V, aproximadamente. Na varredura para potenciais negativos, observa-se um pequeno aumento no sinal de redução, que ocorre por volta de 0,30 V. Os sinais observados são atribuídos às mesmas etapas abordadas na Figura 5. Um fenômeno interessante é observado na varredura para potenciais mais negativos, qual seja, um sinal de oxidação em aproximadamente 0,13 V, onde geralmente ocorre processo de redução. Alguns estudos atribuem esse fenômeno ao desbloqueio da superfície do eletrodo, causado por espécies fortemente adsorvidas, como moléculas de água, disponibilizando sítios ativos que permitem à oxidação do etanol que ainda se encontra próximo da interface eletrodo-solução[45].

Figura 6. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de platina, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, faixa de potencial: -0,90 a 1,40 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Em meio alcalino, os mesmos eventos observados nos meios ácido e neutro são obtidos, porém, com um deslocamento da corrente de pico para potenciais menos positivos. A intensidade em cada processo varia em função do pH, como descrito na literatura[43]. Ocorre um aumento no primeiro sinal de oxidação e uma supressão do segundo, além de um aumento significativo no sinal de oxidação durante a varredura no sentido inverso, que se aproxima do primeiro sinal observado no sentido direto. Isso está atrelado à maior disponibilidade de íons hidroxila na solução, o que facilita a oxidação do etanol aos produtos com dois átomos de oxigênio. Isso pode ser observado pelo deslocamento do potencial de pico para potenciais menos positivos, onde o primeiro processo de oxidação ocorre em -0,16 V e o segundo processo, que nesse caso teve sua

intensidade reduzida, em 0,20 V. Durante a varredura para potenciais negativos, a oxidação do etanol ocorre logo após a redução da camada de óxido, em -0,35 V (Figura 7).

Figura 7. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de platina, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,95 a 0,85 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Platina tem se mostrado um excelente catalisador para eletrooxidação de pequenas moléculas orgânicas, porém, por apresentar sobrepotencial relativamente alto para oxidação destes compostos, pode ser rapidamente desativado devido ao bloqueio dos sítios ativos por intermediários fortemente adsorvidos.

O aumento do pH do eletrólito gerou um deslocamento dos potenciais de pico no sentido negativo em ambos os processos, como mostrado nas Figuras 5, 6 e 7. Além disso, um aumento significativo da corrente é observado, o que pode

ser atribuído à diminuição do sobrepotencial, o que facilita a oxidação dos intermediários adsorvidos e a quebra da ligação carbono-carbono[55], aumentando a fração convertida a CO_2 , que como mostrado na Figura 1, requer três ou seis vezes o número de elétrons envolvidos na conversão a ácido acético ou acetaldeído, respectivamente.

Outro aspecto importante a ser observado é o processo de oxidação na varredura para potenciais mais negativos, onde geralmente ocorre redução. Iwasita e colaboradores[56] atribuem esse processo à água adsorvida na superfície do eletrodo. Como discutido anteriormente, a água tem um importante papel no processo de oxidação do etanol, porém, com o aumento do potencial, a água adsorve fortemente na superfície da platina, diminuindo a quantidade de sítios ativos disponíveis para adsorção das moléculas do etanol, cessando o processo de oxidação do álcool. Quando o sentido da varredura é invertido, com a diminuição do potencial, a interação entre as moléculas de água e a platina diminui, permitindo a oxidação do etanol por o potencial ainda ser suficiente.

4.1.3. Eletrooxidação de etanol em eletrodo de ouro

Apesar de não ser um catalisador tão eficiente quanto a platina, o ouro tem sido investigado para eletrooxidação de pequenas moléculas orgânicas em meios ácido e alcalino[48].

Os voltamogramas cíclicos registrados para o eletrodo de ouro em meio ácido são demonstrados na Figura 8. Durante a varredura para potenciais positivos, em aproximadamente 1,18 V, um pequeno aumento da corrente pode ser observado para as adições de 5 e 10 mmol L^{-1} de etanol, porém, não se

observa uma variação significativa para a solução contendo 15 mmol L^{-1} . Isso ocorre provavelmente devido à desativação da superfície do eletrodo por espécies fortemente adsorvidas, como CO. Para as concentrações avaliadas, durante a varredura no sentido de potenciais mais negativos, não foi observado nenhuma variação no perfil dos voltamogramas.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L^{-1} , eletrodo de ouro, eletrólito suporte: KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ + HNO_3 10 mmol L^{-1} , faixa de potencial: -0,35 a 1,60 V; velocidade de varredura: $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Os voltamogramas cíclicos registrados em meio neutro são apresentados na Figura 9. Durante a varredura para potenciais positivos, dois sinais de oxidação são observados em -0,09 e 1,18 V, porém, com o aumento da concentração de etanol, nenhuma variação no sinal é observada. Na varredura reversa, em aproximadamente 0,0 V, ocorre uma aparente diminuição no sinal de redução da camada de óxido. Isso pode estar atrelado à sobreposição do

processo de oxidação do etanol devido à reativação da superfície do eletrodo, após eliminação de espécies fortemente adsorvidas, como observado em eletrodos de platina em meio alcalino, mas, neste caso, insuficiente para a observação de corrente anódica na varredura no sentido negativo.

Figura 9. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de ouro, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, faixa de potencial: -1,00 a 1,60 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Em meio alcalino, na varredura no sentido positivo, uma onda bem definida de oxidação é observada em -0,08 V. Nesse pH, o processo de oxidação do etanol ocorre antes da etapa de formação do óxido de ouro, e um aumento proporcional de corrente é observado ao aumentar a concentração do álcool para as duas primeiras adições (5 e 10 mmol L⁻¹), mas não mais para a terceira (15 mmol L⁻¹). O sinal de oxidação do etanol ocorreu antes da etapa de formação

do óxido, pois, devido o pH elevado, há íons hidroxila disponíveis para fornecer os átomos de oxigênio necessário para oxidação à espécies dioxigenadas. Durante a varredura no sentido negativo de potenciais, a variação observada é pouco significativa, como mostrado na Figura 10.

Figura 10. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L^{-1} , eletrodo de ouro, eletrólito suporte: KNO_3 0,5 mol L^{-1} + NaOH 10 mmol L^{-1} , faixa de potencial: -1,10 a 1,20 V; velocidade de varredura: 0,1 V s^{-1} .

Como descrito na literatura, em meio ácido, a oxidação do etanol em eletrodo de ouro gera majoritariamente acetaldeído e ácido acético, enquanto que em meio alcalino, o principal produto é o ácido acético, sendo que uma pequena fração é convertida a CO_2 , como demonstrado por de Lima e Varela[57] após analisar os produtos da oxidação por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .

As correntes de oxidação do etanol obtidas em ouro foram menores que as obtidas em platina, além de apenas em meio alcalino uma corrente significativa ser observada. Trabalhos disponíveis na literatura demonstram a ocorrência da oxidação de etanol nesse eletrodo em meio ácido ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$). Isso não foi observado, provavelmente devido à baixa concentração do ácido utilizada nesses estudos (10 mmol L^{-1}), uma vez que o pH influencia diretamente na eficiência do processo.

4.1.4. Eletrooxidação de etanol em eletrodo de paládio

Paládio têm se mostrado um bom catalisador para substituir os eletrodos de platina em processos de oxidação de álcoois alifáticos de cadeia curta, podendo apresentar eficiência próxima. Como descrito na literatura[47], a eficiência da oxidação do etanol em eletrodos de paládio, assim como noutros metais, é dependente do pH do meio. Tanto em meio ácido, quanto neutro, uma fração muito pequena do álcool é oxidada, o que é atribuído à escassez de íons hidroxila para estabilizar o hidrogênio removido do álcool. Nesse caso, os íons OH^- são provenientes da quebra das moléculas de água que adsorvem no eletrodo. Em meio alcalino, devido à alta concentração desses íons, a oxidação do etanol é favorecida, gerando acetaldeído e ácido acético como produtos, sendo o último o principal.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de paládio, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + HNO₃ 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,25 a 1,40 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Como esperado, nos voltamogramas cíclicos registrados em meio ácido, apenas um pequeno aumento na corrente em 0,75 V pode ser observado na varredura para potenciais mais positivos, como apresentado na Figura 11.

Para os voltamogramas em meio neutro (Figura 12), nenhuma variação significativa na corrente é observada, afora uma diminuição no pico catódico referente à redução da camada de óxido de paládio ao redor de -0,3 V.

Figura 12. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de paládio, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, faixa de potencial: -0,40 a 1,35 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Em meio alcalino, na varredura no sentido de potenciais positivos, um leve aumento no sinal em -0,05 V e uma diminuição do sinal em 0,9 V são observados, sem variação significativa com o aumento da concentração do etanol. Na varredura no sentido negativo, uma onda de oxidação em aproximadamente -0,4 V, característica da reativação da superfície do eletrodo (como já comentado para platina e ouro), é observada, aumentando levemente com o aumento da concentração de etanol e sobrepondo-se ao pico de redução do óxido de paládio (Figura 13).

Nesse meio esperava-se uma maior eficiência, comparável à observada sobre Pt para o processo de oxidação do etanol mas talvez o pH tivesse que ser mais elevado para Pd. Um significativo aumento da corrente de oxidação anódica

do etanol com a concentração de NaOH (e consequentemente, o pH do eletrólito) foi demonstrado por Liang e colaboradores[58] durante experimentos realizados fixando a concentração do álcool e variando a concentração de NaOH, Esse fenômeno pode ser atribuído à alta disponibilidade de íons hidroxila em pH elevado.

Figura 13. Voltamogramas cíclicos para 3 adições de etanol: 5, 10 e 15 mmol L⁻¹, eletrodo de paládio, eletrólito suporte: KNO₃ 0,5 mol L⁻¹ + NaOH 10 mmol L⁻¹, faixa de potencial: -0,80 a 1,30 V; velocidade de varredura: 0,1 V s⁻¹.

Os ensaios voltamétricos apresentados nas figuras de 5 a 13 apontam para a platina como catalisador mais eficiente entre os avaliados para o processo de oxidação do etanol, coincidindo com o reportado na literatura. O pH do meio influencia diretamente nos produtos da oxidação do etanol, sendo que em platina utilizando meio alcalino a conversão em CO₂ é favorecida, principalmente devido a diminuição do sobrepotencial necessário para oxidar as espécies fortemente

adsorvidas, como o CO[55]. A oxidação completa encontra aplicação em células combustíveis, isto se deve a alta densidade de corrente envolvida nesse caminho (3 vezes a conversão a ácido carboxílico).

Para permitir a separação e posterior detecção por CE-C⁴D, o produto desejado é o ácido carboxílico, que pode ser separado na forma de carboxilato. Sendo assim, apesar da densidade de corrente maior em meio alcalino, o eletrodo de platina em meio ácido foi escolhido para iniciar os estudos de derivatização eletroquímica de alcoóis alifáticos.

4.2. Estudos Eletroforéticos

Em eletroforese capilar, um parâmetro importante é a escolha do tampão de corrida. No caso da detecção por condutividade, é a diferença de mobilidade entre o co-íon e o analito que determina a sensibilidade. Uma ferramenta eficiente e disponível para auxiliar essa escolha é o simulador *PeakMaster 5.1*. Nesse *software*, ao definir as espécies que compõe o tampão, os analitos de interesse e os parâmetros utilizados na corrida eletroforética (comprimento do capilar, tensão, polaridade de injeção, velocidade do EOF), é possível simular eletroferogramas com resultados muito próximos da realidade.

O equipamento de eletroforese capilar que foi interfaceado com a célula eletroquímica dispõe de fonte de alta tensão negativa, ou seja, é mais apropriado para análise de cátions, já que a fonte do equipamento é aterrada na extremidade do capilar interfaceada com a célula eletroquímica, onde ocorre a injeção. Uma fonte bipolar aumentaria a versatilidade da alternância entre a análise cátions e de ânions, mas o equipamento utilizado permite a separação e detecção de todos os

ânions que, no tampão escolhido, apresentem velocidade de migração inferior à do EOF, que acaba por arrastá-los em direção ao detector.

Os ácidos carboxílicos provenientes da oxidação dos respectivos álcoois são as espécies de interesse. Em média, o pKa desses compostos varia entre 4,75 e 4,85, sendo que em valores de pH uma unidade acima do pKa, essas espécies encontram-se 90 % desprotonadas e duas unidades acima, 99 %. Para garantir que as espécies estejam significativamente desprotonadas, o tampão de corrida deve possuir pH pelo menos uma unidade acima dos pKa's (garantindo 90 %). Além disso, em valores menores de pH, os ácidos possuem uma baixa mobilidade e são mais facilmente arrastados pelo EOF, porém, com a redução do pH a mobilidade do EOF também é reduzida, aumentando significativamente o tempo de análise. Outro fator a ser considerado está relacionado com a sensibilidade do C⁴D, que é reduzida com a diminuição do pH ao ponto de manter fração maior dos ácidos na forma não dissociada. Por esse motivo, eletrólitos de corrida com pH abaixo de 6,0 não foram avaliados.

Buscando a melhor condição de separação, tempo e sensibilidade, três tampões foram avaliados. MES/His (pH = 6,1), que possui uma excelente capacidade tamponante devido ao duplo tamponamento, TRIS/HCl (pH = 8,6) e LiOH/CHES (pH = 9,2). A Figura 14 mostra a simulação feita no *PeakMaster 5.1* para separação dos carboxilatos provenientes da oxidação dos quatro álcoois alifáticos (etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol) em cada um dos tampões. Apesar de não representado, a mesma escala de condutividade foi utilizada para os três exemplos (Figura 14 A, B e C).

Com base nos eletroferogramas obtidos na simulação, dois parâmetros podem ser discutidos, o tempo de corrida e a detectabilidade. Com o aumento do

pH, a velocidade do EOF aumenta, diminuindo não só o tempo da análise, mas também permitindo a determinação das espécies mais rápidas. Utilizando MES 30 mmol L⁻¹ / His 30 mmol L⁻¹, não é possível determinar os carboxilatos provenientes do etanol e propanol por terem um vetor velocidade superior ao do EOF. Em Li⁺ 10 mmol L⁻¹ / CHES 30 mmol L⁻¹ o EOF possui a maior velocidade, mas, apesar do curto tempo de corrida, a detectabilidade para essas espécies é inferior à obtida utilizando TRIS 30 mmol L⁻¹ / HCl 10 mmol L⁻¹, devido à pequena diferença da mobilidade entre os analitos e o co-íon. Sendo assim, o TRIS/HCl foi escolhido como tampão de corrida para análise dos produtos de oxidação dos álcoois.

Figura 14. Eletroferogramas para separação dos carboxilatos simulado através do PeakMaster. A: tampão MES/His. B: tampão TRIS/HCl. C: Tampão Li^+ /CHES. Comprimento do capilar: 45 cm (efetivo 25 cm), tensão: 30 kV, EOF: fluxo eletrosmótico, C5: pentanoato, C4: butanoato, C3: propanoato e C2: etanoato. A mobilidade do EOF para estas simulações foi ajustada conforme valores médios obtidos em experimentos reais.

Como o objetivo inicial desse trabalho é a determinação quantitativa de etanol em cerveja, TRIS/HCl foi o tampão que apresentou maior sensibilidade para o ácido carboxílico correspondente. Nessas condições, o formiato proveniente da oxidação do metanol não pode ser analisado. Por ser um íon relativamente pequeno, migra rapidamente em contra-fluxo, alongando muito o tempo necessário para que chegue até o detector, e consequentemente, alargando o pico devido à difusão longitudinal. Outro fator importante é a baixa sensibilidade para essa espécie devido o co-íon usado, nesse caso o Cl^- . O

tampão Li^+/CHES permite a análise do formiato, pois, além do EOF estar mais rápido devido o pH, a sensibilidade é maior, pois o co-íon possui baixa mobilidade (CHES). Esse estudo não foi realizado devido ao curto tempo do mestrado, mas possivelmente será retomado no doutorado.

4.3. Aplicação do Sistema EC-CE-C⁴D

4.3.1. Composição do eletrólito para eletrooxidação dos álcoois

O meio ácido foi definido para realizar os estudos de oxidação dos álcoois. Sendo assim, a composição do eletrólito suporte foi HNO_3 5 mmol L^{-1} / HCl 1 mmol L^{-1} (pH = 2,3). A utilização do ácido nítrico (HNO_3) deve-se aos estudos voltamétricos, após retirar o nitrato de potássio (KNO_3), como mencionado anteriormente. Por utilizar um eletrodo de quase referência (Ag/AgCl *quase-referência*) uma concentração fixa de cloreto (1 mmol L^{-1}) foi adicionada ao eletrólito de oxidação para diminuir a dissolução do filme de AgCl e manter o potencial do eletrodo de referência constante.

4.3.2. Avaliação do potencial aplicado para eletrooxidação

Para definição do melhor potencial a ser aplicado durante a oxidação, uma solução padrão contendo 1 mmol L^{-1} dos álcoois (etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol) preparada no eletrólito de oxidação foi utilizada nos testes. Em cada experimento, o potencial foi aplicado durante 60 s e após a oxidação, uma alíquota foi injetada no capilar durante 5 s. Os potenciais avaliados foram 1,1; 1,2;

1,3; 1,35; 1,4; 1,5 e 1,6 V vs. Ag/AgCl *quase-referência*. As medidas para cada valor de potencial foram realizadas em triplicata, mas em ordem aleatória de modo a revelar qualquer tendência ou alteração de resposta durante as análises.

Para determinar a correção dos potenciais a ser aplicada frente um Ag/AgCl, KCl_{sat.}, levando em conta também a queda de potencial na camada delgada da célula entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de quase-referência, ou seja, o produto iR não compensado pelo potenciostato, procedeu-se da seguinte forma: retirou-se o capilar da CE e inseriu-se no orifício da célula um eletrodo de referencia miniaturizado[59], posicionando-o acima da superfície do eletrodo de trabalho; efetuou-se a aquisição de valor do potencial deste eletrodo simultaneamente com a aquisição de dados de corrente usual, ao operar o potenciostato; mediu-se o potencial entre os dois eletrodos de referência em todas as condições experimentais usadas; aplicou-se a correção de potencial aos dados. Um conjunto de eletroferogramas obtidos no sistema EC-CE-C⁴D, já com os valores de potencial corrigidos vs. eletrodo de Ag/AgCl, KCl_{sat} é apresentado na Figura 15.

Figura 15. Variação do potencial aplicado para oxidação dos álcoois (vs. Ag/AgCl, $\text{KCl}_{\text{sat.}}$). Tempo de injeção: 5 s, tempo de oxidação: 60 s. C5: ácido pentanóico, C4: ácido butanóico, C3: ácido propanóico, C2: ácido etanóico. Comprimento do capilar: 45 cm (25 cm efetivo), tampão de corrida: TRIS 30 mmol L^{-1} / HCl 10 mmol L^{-1} .

Colocando a área dos picos dos eletroferogramas em função do potencial, construiu-se a Figura 16, na qual se verifica que o sinal devido aos carboxilatos originados da oxidação dos álcoois cresce até 1,6 V, valor acima do qual ocorre decréscimo, provavelmente por ocupação de parte da área do eletrodo de trabalho por microbolhas, observáveis a olho nu em potenciais acima de aproximadamente 1,8 V. Por proporcionar maior sinal e menor deriva da linha de base, 1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} foi definido como potencial a ser utilizado.

Figura 16. Área sob os picos para cada álcool na Figura 15 em função do potencial aplicado para oxidação dos álcoois.

4.3.3. Escolha do tempo de oxidação

Após definir o melhor potencial para oxidação dos álcoois aos carboxilatos, variou-se o tempo de oxidação para definir a melhor condição. Os experimentos foram realizados durante 5, 10, 30, 60 e 90 s de eletrólise. Ao final de cada eletrólise, uma fração foi introduzida no capilar durante 5 s de injeção. Nesta etapa, todas as medidas foram realizadas em triplicata e de forma aleatória. Um conjunto de eletroferogramas obtido é apresentado na Figura 17.

O gráfico do sinal obtido para oxidação de cada álcool em função do tempo de eletrólise, Figura 18, apresenta um máximo ao redor de 60 s de eletrólise para todos os álcoois. O decréscimo em tempos mais longos de eletrólise pode estar associado ao esgotamento do álcool na camada delgada de solução e consumo do ácido carboxílico já formado por gradual oxidação à CO₂. O período de 60 s foi

selecionado para os demais estudos, mas, como se observa na figura, a escolha não é crítica e, para acelerar as análises, poder-se-ia trabalhar a partir de 30 s.

Figura 17. Variação do tempo de oxidação dos álcoois. Potencial de oxidação: 1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} . Todos os outros parâmetros são semelhantes aos da Figura 15.

Figura 18. Áreas dos picos do carboxilatos da Figura 17 em função do tempo de oxidação dos álcoois.

4.3.4. Eficiência de conversão e amostragem

Para avaliar a eficiência de conversão do álcool de interesse no correspondente carboxilato, uma solução padrão contendo 1 mmol L^{-1} de ácido etanóico e propanóico, diluídos no eletrólito de oxidação foi injetada no sistema, seguindo as etapas do processo, porém sem realizar a oxidação. Em seguida, uma solução contendo os dois alcoóis, etanol e 1-propanol, foi avaliada com injeção no CE precedida de eletrólise. Ambos os experimento foram realizados em triplicata. Os eletroferogramas obtidos são apresentados na Figura 19. Através do cálculo da área dos picos, determinou-se o fator de conversão e amostragem, que, para ambos os álcoois, foi de aproximadamente 16%. Apesar da eficiência baixa e susceptível de melhoria em pesquisas futuras, essa conversão é constante e reprodutível, permitindo a aplicação quantitativa deste método.

Figura 19. Eficiência de Conversão. Eletroferogramas para injeções de solução contendo 1 mmol L^{-1} dos padrões dos ácidos carboxílicos (sem oxidação) e dos álcoois (após oxidação). C3: ácido propanóico, C2: ácido etanoico e EOF: fluxo eletrosmótico. Comprimento do capilar: 45 cm (20 cm efetivo). Todos os parâmetros semelhantes aos da Figura 17.

4.3.5. Curva de calibração

A partir de uma solução estoque de 10 mmol L^{-1} dos álcoois (etanol, 1-propanol, 1-butanol e 1-pentanol), sete soluções padrão foram preparadas, de modo a obter as seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas no eletrólito de oxidação e cada padrão foi injetado três vezes no sistema EC-CE-C⁴D. Um conjunto de eletroferogramas é apresentado na Figura 20. Como pode ser observado, o aumento da concentração dos álcoois, produz um aumento no sinal. Com os resultados obtidos foi construída a curva de calibração para cada álcool, levando em consideração a área do pico, resultando a Figura 21.

Apesar de apresentarem uma boa linearidade, as curvas de calibração (retas analíticas) não passam pela origem. Ainda não se tem uma explicação satisfatória para este comportamento, o que não impede a utilização da técnica de derivatização na forma como apresentada, mas dificulta a aplicação de procedimentos como o método da adição de padrão.

Figura 20. Conjunto de eletroferogramas variando a concentração dos álcoois. Identificação dos picos e condições semelhantes à Figura 15, potencial de oxidação: 1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} .

Figura 21. Curvas de calibração obtida pelo sistema EC-CE- C^4D para os álcoois: A: etanol, B: 1- propanol, C: 1- butanol e D: 1- pentanol.

Através da curva de calibração, foi possível calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada álcool, conforme a Tabela 1. Essas figuras de mérito foram obtidas a partir do produto de uma constante e desvio padrão do ruído da linha de base ($k \times S_{\text{ruído}}$), dividido pelo coeficiente angular, onde para o LD, $k = 3$, e para o LQ, $k = 10$. Os primeiros resultados mostram, portanto, que a derivatização eletroquímica desses álcoois permite alcançar LDs significativamente melhores que os obtidos por MEKC, que foram aproximadamente 1 mmol L^{-1} [18].

Tabela 1. Coeficiente de correlação (R), Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os álcoois. O desvio padrão (s) do ruído da linha base foi de 0,00118 u.a.

Coeficiente angular da curva de calibração (u.a. $\text{mmol}^{-1} \text{L}$)		Coeficiente de correlação (R)	LD ($\text{mmol}^{-1} \text{L}$) ($3 \times S_{\text{ruído}}$) / a (0,00354) / a	LD ($\text{mmol}^{-1} \text{L}$) ($10 \times S_{\text{ruído}}$) / a (0,0118) / a
C5	0,282	0,995	0,046	0,15
C4	0,368	0,999	0,027	0,089
C3	0,312	0,999	0,035	0,12
C2	0,222	0,998	0,072	0,24

4.3.6. Repetibilidade

A precisão de uma técnica informa quão dispersos estão os resultados de ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra ou padrões em condições definidas. Pode ser estimada pelo desvio padrão (σ , ou melhor, s , para número pequena de repetições) ou desvio padrão relativo [60]. Para avaliar a precisão da técnica, foram realizadas 10 injeções consecutivas da solução padrão contendo 1 mmol L^{-1} dos álcoois (Figura 22). As áreas e alturas dos picos foram

calculadas utilizando o programa Origin e desvio padrão relativo das replicatas ($n = 10$) foi obtido. Considerando a altura dos picos, para 1-pentanol, 1-butanol, 1-propanol e etanol os valores encontrados foram 2,5%; 3,2%; 4,5% e 5,2%, respectivamente. Ao considerar as áreas dos picos, valores maiores foram obtidos para os respectivos álcoois, sendo 7,8%, 8,4%, 10,2% e 12,2%, o que nesse caso, justifica o uso da altura do pico.

Os desvios encontrados, principalmente quando se utiliza a área dos picos, são relativamente altos, o que pode estar associado a erros provenientes de duas principais fontes, o processo de oxidação e a injeção no capilar. Esses erros podem ser minimizados ou compensados pelo uso de padrão interno.

Figura 22. Repetibilidade: 10 injeções consecutivas do padrão contendo 1 mmol L^{-1} dos álcoois. Mesmas condições da Figura 20.

4.3.7. Aplicação à amostra real

A Cerveja pilsen, por ser uma bebida de alto consumo em todo o mundo, inclusive no Brasil, foi a matriz escolhida para avaliar aplicação da técnica em amostras reais. Como citado, devido à interferência que bolhas de gás podem trazer seja por aderência ao eletrodo de trabalho, interrupção da coluna capilar durante a eletroforese e ruído na detecção, antes de realizar a análise, foi necessário eliminar parcialmente o CO₂ da amostra. Para isso, 25 mL da amostra foram colocados em um balão volumétrico, que foi agitado durante 1 min. em uma mesa vibratória. Em seguida, para ajustar a concentração de etanol contido na amostra à curva de calibração, uma alíquota dessa amostra foi diluída 1000 vezes no eletrólito utilizado para a oxidação e analisada no sistema EC-CE-C⁴D.

Para verificar que na amostra não há espécies que migram com a mesma velocidade do analito de interesse, saindo na mesma janela de tempo, duas injeções foram realizadas seguindo as etapas do processo, porém, sem realizar a oxidação da amostra. A Figura 23 mostra os eletroferogramas para a amostra diluída 100 e 1000 vezes sem realizar a oxidação e uma injeção oxidando a amostra.

Figura 23. Eletroferogramas das amostras diluídas 100 vezes e 1000 vezes sem realizar a oxidação e a amostra diluída 1000 vezes após a oxidação por 60 s a 1,6V. Condições semelhantes as da Figura 19.

Como conhecido, eletrodos metálicos, em especial, eletrodos de platina, tendem a sofrer bloqueio da superfície devido à presença de espécies fortemente adsorvidas. Esse fenômeno é mais comum nas aplicações em amostras complexas, devido à diversidade de compostos presentes, sendo típica uma mudança gradual da atividade do eletrodo, em geral, no sentido da redução da corrente (perda de sensibilidade). Para avaliar o eventual envenenamento do eletrodo e a repetibilidade da análise, 40 injeções consecutivas da amostra foram realizadas no sistema. Alguns dos eletroferogramas são mostrados na Figura 24. Considerando as alturas dos picos, um desvio padrão relativo de 6,1% foi obtido.

Figura 24. Um conjunto de eletroferogramas para amostra de cerveja (dil. 1000 vezes). Tempo de injeção: 5 s, tempo de oxidação: 1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} e potencial de oxidação: 60 s. C2: ácido etanóico (proveniente do etanol), HCO_3^- : pico de sistema devido o CO_2 gerado durante a oxidação e absorvido do ar em pH 8,6.

Com os dados deste experimento, plotou-se um gráfico para melhor visualização de possíveis tendências, especialmente algo que indicasse envenenamento do eletrodo. Como visualizado na Figura 25, não há indícios de redução do sinal ao longo do experimento, o que descarta a hipótese de bloqueio do eletrodo após longo uso ($n = 40$).

Figura 25. Repetibilidade da altura dos picos para as 40 injeções consecutivas da amostra nas condições da Figura 24.

A Figura 26 mostra um conjunto de sinais de corrente correspondentes às separações eletroforéticas obtidas durante análises consecutivas da amostra.

Figura 26. Repetibilidade dos sinais de corrente na célula eletroquímica durante a oxidação análises consecutivas da amostra de cerveja no sistema EC-CE-C⁴D.

4.3.8. Uso do padrão interno

Em técnicas de separação, um método bastante útil é a padronização interna que, dentre outras vantagens, compensa a interferência de pequenas variações nas condições experimentais. Nesse método, uma quantidade fixa de um composto, denominado de padrão interno é adicionada aos padrões etanol e às amostras. A curva de calibração obtida utiliza a razão entre a área (ou altura) dos picos dos padrões e a área (ou altura) do pico do padrão interno (concentração constante). Isso permite eliminar erros provenientes da injeção ou, nesse caso, também do processo eletroquímico envolvido. O mesmo procedimento é efetuado com todas as amostras, ou seja, o sinal considerado corresponde à razão entre a área do pico da amostra e do padrão interno. Um bom padrão interno deve possuir comportamento e características semelhantes às do analito, possuir tempo de migração (ou retenção, no caso de técnicas cromatográficas) próximo a da substância de interesse, mas não sobreposto, não deve reagir com a amostra ou outros componentes da matriz e não fazer parte da amostra[60].

Para aplicação em amostras de cerveja, o 1-propanol foi avaliado como padrão interno, por atender os requisitos necessários, e não estar presente na amostra (ou pelo menos, em quantidade detectável).

A Figura 27 apresenta um conjunto de eletroferogramas de soluções padrão contendo etanol e 1-propanol. Nas soluções, mantém-se constante a concentração de etanol, variando a concentração de 1-propanol. Mesmo na presença de uma concentração de 1-propanol 50 vezes maior, é possível observar o sinal do acetato (proveniente da oxidação do etanol), porém, nessas

condições, o sinal obtido apresenta variações quando comparado aos obtidos em concentrações mais próximas. Esses estudos exploratórios e ainda serão retomados futuramente.

Figura 27. Conjunto de eletroferogramas variando a concentração de 1-propanol (1, 10 e 50 mmol L⁻¹) e mantendo constante a concentração de etanol (1 mmol L⁻¹). C3: ácido propanóico, C2: ácido etanoico, ambos obtidos após o processo de oxidação nas condições da Figura 24.

4.4. Determinação Quantitativa de Etanol em Cerveja

4.4.1. Amostra

Para determinação quantitativa de etanol em cerveja, duas amostras foram analisadas, sendo uma convencional (teor alcoólico 4,5% vol.) e outra sem álcool (teor alcoólico <0,5% vol.). Para eliminar o CO₂ presente na amostra, procedeu-se como descrito no item 4.3.7, seguindo-se também o mesmo procedimento de diluição. As amostras foram preparadas no eletrólito de oxidação de modo a

adequar a concentração de etanol na faixa linear do sistema, sendo a cerveja convencional diluída 1000 vezes e a cerveja sem álcool, 100 vezes. Para corrigir possíveis variações na injeção e/ou durante o processo de oxidação, $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de 1-propanol foi adicionado a cada amostra como padrão interno. As mesmas amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (GC-FID) para comparação dos resultados.

4.4.2. Determinação de etanol em cerveja utilizando o sistema EC-CE-C⁴D

Para construir a curva de calibração, dez padrões foram preparados a partir de uma solução estoque contendo 10 mmol L^{-1} de etanol, de modo a obter as seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Todos os padrões foram feitos no eletrólito de oxidação e em cada um foi adicionado $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 1-propanol, usado como padrão interno. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. A Figura 28 apresenta as curvas de calibração obtidas. Com o uso do padrão interno, a curva obtida com base na altura do pico possui uma boa linearidade ($R = 0,999$), porém, assim como as curvas obtidas para os quatro álcoois, sem o uso do padrão interno, não passa pela origem. Já a curva obtida a partir da área passa pela origem, apesar de possuir linearidade não tão elevada ($R = 0,996$), sendo, então, adotada para o presente método de análise de etanol em cerveja. Como era esperado, o uso do padrão interno compensa algumas variações durante o processo de oxidação e eventualmente, durante a injeção da amostra. Os desvios padrão relativos encontrados foram de aproximadamente 4% para área do pico e 2% para altura.

Figura 28. Curva de calibração para etanol utilizando 1-propanol como padrão interno. A: através da área do pico e B: através da altura do pico. Eletroferogramas obtidos nas condições da Figura 24.

Após obter a curva de calibração, as amostras de cerveja com álcool e sem álcool foram analisadas no sistema EC-CE-C⁴D e os resultados obtidos, juntamente com seus desvios padrão, são apresentados na Tabela 2. Para verificar a exatidão do método proposto, as mesmas amostras foram analisadas por CG-FID, que é a técnica mais utilizada para esse tipo de compostos. Os resultados obtidos e os desvios padrão são apresentados também na Tabela 2. O *Teste-t* foi utilizado para comparação dos resultados e não apresentou diferença significativa dentro do intervalo de 95% de confiança.

Tabela 2. Resultados obtidos para quantificação de etanol em cerveja por EC-CE-C⁴D e CG-FID com os respectivos desvios padrão.

AMOSTRA	EC-CE-C ⁴ D	DesvPad	GC-FID	DesvPad
Cerveja convencional	4,4%	0,2	4,3%	0,1
Cerveja sem álcool	0,36%	0,04	0,41%	0,02

5. CONCLUSÕES

O sistema EC-CE-C⁴D, que já se mostrara útil para propósitos como pré-concentração eletroquímica seguida de separação eletroforética e detecção condutométrica, assim como para o estudo de produtos de oxidação eletrocatalítica de glicerol, mostrou, no presente trabalho, grande potencialidade também para a derivatização eletroquímica de certas moléculas orgânicas neutras, como alcoóis, possibilitando a separação e determinação por CE-C⁴D. Os limites de detecção e quantificação para os álcoois avaliados são significativamente menores quando comparados aos obtidos por MEKC.

O eletrodo de platina apresentou bons resultados em meio ácido quando aplicado ao sistema EC-CE-C⁴D para quantificação dos álcoois, derivatizando-os ao ácido carboxílico correspondente e permitindo a separação eletroforética e detecção por C⁴D através de mecanismos bem conhecidos (mobilidade iônica). Nos estudos de repetibilidade realizados em amostra real complexa, como cerveja diluída, o eletrodo não apresentou tendência de perda de sensibilidade (envenenamento) devido à ação de espécies fortemente adsorvidas, como CO, mesmo em sequência longas de análises consecutivas ($n = 40$). Esse resultado favorece o sistema por eliminar a necessidade de reativar a superfície do eletrodo através de polimento mecânico, que seria indesejável por diminuir a praticidade da técnica.

Para permitir a aplicação no sistema, os álcoois devem necessariamente ser convertidos em ácido carboxílico, por isso, apesar de em meio alcalino o sinal da oxidação do etanol se pronunciar maior, segundo a literatura, além do ácido acético, uma maior fração do analito pode estar sendo oxidado a CO₂, produto

não desejado para a quantificação. Alguns estudos utilizando níquel e cobre em meio alcalino, para oxidar pequenos álcoois como etanol, estão disponíveis na literatura. Porém, a fração convertida a ácido carboxílico ou diretamente a CO_2 , ainda não é bem definida, já que essa aplicação visa principalmente às células combustíveis.

A eficiência de conversão dos álcoois, etanol e propanol ao ácido carboxílico correspondente foi de aproximadamente 16 %. Apesar de baixa, essa fração é constante e os resultados obtidos são reprodutíveis, permitindo a aplicação quantitativa da técnica. Com isso, existe a necessidade de otimizar as condições, avaliando meios ou materiais de eletrodo diferentes.

As amostras de cerveja, convencional e sem álcool, foram analisadas no sistema EC-CE-C⁴D e também com CG-FID. Os resultados obtidos foram comparados e não apresentaram diferença significativa em intervalo de confiança de 95 %, demonstrando a efetividade e concordância da técnica.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para dar continuidade ao desenvolvimento da pesquisa de derivatização eletroquímica em CE, propõe-se avaliar no sistema EC-CE-C⁴D os seguintes fatores:

Eletrodo de platina em meio neutro e alcalino e eletrodos de ouro e paládio nos três meios (ácido, neutro e alcalino), além de cobre e níquel em meio alcalino.

Verificar a hipótese de oxidar aldeídos e álcoois em diferentes valores de potencial, oxidando uma espécie e mantendo a outra, de modo a permitir a determinação simultânea em mesma amostra.

Avaliar a possibilidade de derivatizar açúcares pelo mesmo mecanismo, possibilitando a determinação simultânea de álcool e açúcar em amostras reais, como por exemplo, em vinhos.

Implementar a EC-CE-C⁴D em equipamento com fonte de alta tensão bipolar facilitará a determinação, também, de metanol, por derivatização a formiato. Caberá buscar condições para determinar traços de metanol ao lado de elevada concentração de etanol ocorre, por exemplo, em álcool combustível ou cachaça.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Tavares, M. F. M., *Quím. Nova* **1996**, 19, 173.
- 2 Hjerten, S., *Chromatographic reviews* **1967**, 9, 122.
- 3 Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298.
- 4 Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O., *ELETROQUÍMICA – Princípios, Métodos e Aplicações*, 1ª Ed. Almedina. Coimbra - Portugal: 1996.
- 5 Facchin, I.; Pasquini, C., *Química Nova* **1998**, 21, 60.
- 6 Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F., *Química Nova* **2001**, 24, 68.
- 7 Lopes, F. S.; Antunes, O.; Gutz, I. G. R., *Electrochem. Commun.* **2010**, 12, 1387.
- 8 Moraes, M. L. L.; Moraes, S. L.; Pereira, E. A.; Tavares, M. F. M., *Química Nova* **2009**, 32, 1041.
- 9 van der Steen, C.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. P. E. M.; Poulis, J. A., *Anal. Chim. Acta* **1972**, 59, 298.
- 10 Huang, X.; Pang, T-K. J.; Gordon, M. J.; Zare, R. N., *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2747.
- 11 Katzmayr, M. U.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* **1999**, 850, 355.
- 12 da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4339.
- 13 Zemann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 563.
- 14 Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 111.
- 15 Terabe, S. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 240.
- 16 Terabe, S. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 2, 99.

- 17 Tavares, M. F. M., *Quím. Nova* **1997**, 20(5), 493
- 18 da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., *Electrophoresis* **2000**, 21, 1405.
- 19 Bardelmeijer, H. A.; Lingeman, H.; de Ruiter, C.; Underberg, W. J., *J. Chromatogr. A* **1998**, 807, 3.
- 20 Waterval, J. C.; Lingeman, H.; Bult, A.; Underberg, W. J., *Electrophoresis* **2000**, 21, 4029.
- 21 Underberg, W. J.; Waterval, J. C., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3922.
- 22 Mainka, A.; Bachmann, K., *J. Chromatogr. A* **1997**, 767, 241.
- 23 Koike, R.; Kitagawa, F.; Otsuka, K., *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 399.
- 24 Lee, A. W. M.; Liu, L.; Lau, D.; Chan, R., *Anal. Lett.* **2011**, 32, 850.
- 25 Vidal, D. T. R.; Nogueira, T.; Saito, R. M.; do Lago, C. L., *Electrophoresis* **2011**, 32, 850.
- 26 Gonçalves Filho, L. C.; Micke, G. A., *J. Chromatogr. A* **2007**, 1154, 477.
- 27 Oudhoff, K. A.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. T., *J. Chromatogr. A* **2003**, 985, 479.
- 28 Esaka, Y.; Okumura, N.; Uno, B.; Goto, M., *Electrophoresis* **2003**, 24, 1635.
- 29 Matysik, F. -M., *Electrochem. Commun.* **2003**, 5, 1021.
- 30 Scholz, R.; Matysik, F. -M., *Analyst* **2011**, 136, 1562.
- 31 Lopes, F. S.; Nogueira, T.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Electroanalysis* **2011**, 23, 2516.
- 32 Ministério do desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.htm>>. Acesso em 17 jul. 2012.
- 33 Jornal Estadão. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,producao-de-merce-cresce-33-em-2011-,821649,0.htm>>. Acesso em 17 jul. 2012.
- 34 Revista Exame. Pré-sal e a nova economia brasileira. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/revista-exame/edicoes/1019/noticias/o-ciclo-do-chope-na-ambev>>. Acesso em 17 jul. 2012.

- 35 AOAC International, *Official methods of analysis of AOAC International*, **2010**.
- 36 Haj-Yehia, A. I.; Benet, L. Z., *J. Chromatogr. A* **1996**, 724, 107.
- 37 García, M. J. L.; Ramos, G. R.; Martínez, J. M. H.; Adelantado, J. V. G.; Alfonso, E. F. S., *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 230.
- 38 Quigley, W.W.C.; Ecker, S. T.; Vahey, P. G.; Synovec, R. E., *Talanta* **1999**, 50, 569.
- 39 Amankwa, L. N.; Kuhr, W. G., *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1733.
- 40 Chen, M. C.; Huang, W. W.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 341, 83.
- 41 Yu, E. H.; Krewer, U.; Scott, K., *Energies* **2010**, 3, 1499.
- 42 Santasalo-Aarnio, A.; Kwon, Y.; Ahlberg, E.; Kallio, K. K. T.; Koper, M. T. M., *Electrochem. Commun.* **2011**, 13, 466.
- 43 Lai, S. C. S.; Kleijn, S. E. F.; Öztürk, F. T. Z.; Vellinga, V. C. R.; Koning, J.; Rodriguez, P.; Koper, M. T. M., *Catalysis Today* **2010**, 154, 92.
- 44 Camara, G. A.; Iwasita, T., *J. Electroanal. Chem.* **2005**, 578, 315.
- 45 Xia, X. H.; Liess, H. -D.; Iwasita, T., *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 437, 233.
- 46 Kutz, R. B.; Braunschweig, B.; Mukherjee, P.; Behrens, R. L.; Dlott, D. D., *J. Catal.* **2011**, 278, 181.
- 47 Cui, G.; Song, S.; Shen, P. K.; Kowal, A.; Bianchini, C., *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 15639.
- 48 Tremiliosi-Filho, G.; Gonzalez, E. R.; Motheo, A. J.; Belgsir, E. M.; Léger, J. -M.; Lamy, C., *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 444, 31.
- 49 Barroso, J.; Pierna, A. R.; Blanco, T. C.; Morallón, E.; Huerta, F., *J. Power Sources* **2011**, 196, 4193.
- 50 Strbac, S.; Ivic, M. A., *Electrochim. Acta* **2009**, 54, 5408.
- 51 Motheo, A. J.; Machado, S. A. S.; Rabelo, F. J. B.; Santos Jr., J. R., *J. Braz. Chem. Soc.* **1994**, 5, 161.

- 52 Lamy, C.; Belgsir, E. M.; Léger, J-M., *J. Applied Electrochem.* **2001**, 31, 799.
- 53 Santos, M. S. F.; Lopes, F. S.; Vidal, D. T. R.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Anal. Chem.* **2012**, 84, 7599.
- 54 Lopes, F. S.; Coelho, L. H. G.; Gutz, I. G. R., *Electrophoresis* **2011**, 32, 939.
- 55 Kutz, R. B.; Braunschweig, B.; Mukherjee, P.; Dlott, D. D.; Wieckowski, A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, 2, 2236.
- 56 Iwasita, T.; Xia, X. H.; Liess, H. -D.; Vielstich, W., *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 7542.
- 57 de Lima, R. B.; Varela, H., *Gold Bulletin* **2008**, 41, 15.
- 58 Liang, Z. X.; Zhao, T. S.; Xu, J. B.; Zhu, L. D., *Electrochim. Acta* **2009**, 54, 2203.
- 59 Pedrotti, J. J.; Angnes, L.; Gutz, I. G. R., *Electroanalysis* **1996**, 8, 673.
- 60 Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C., *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.

CURRICULUM VITAE

Nome: Mauro Sérgio Ferreira Santos

Data de nascimento: 30/06/1986

Local: Jequié – BA

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP

Período: 07/2010 – 10/2012

Mestrado em Química Analítica

Título da Dissertação: *Derivatização Eletroquímica de Álcoois para Eletroforese Capilar*

Orientador: Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz

Centro Universitário FIEO – UNIFIEO, Osasco – SP

Período: 02/2009 – 06/2010

Especialização em Tecnologia em Química

Título da Monografia: Estudo das concentrações de nutrientes e especiação de fósforo nos sedimentos da região próxima ao emissário submarino de esgoto de Praia Grande I

Orientador: Prof. Dr. Silvio Miranda Prada

Centro Universitário FIEO – UNIFIEO, Osasco – SP

Período: 02/2005 – 12/2008

Bacharelado em Química

Centro Universitário FIEO – UNIFIEO, Osasco – SP

Período: 02/2005 – 12/2008

Licenciatura em Química

Colégio Estadual Dr. Edvaldo Machado Boaventura.

Período: 01/2001 – 12/2003

Ensino Médio (Formação Geral)

OCUPAÇÃO

Professor I

ETEC Osasco II – Vila dos Remédios, Osasco – SP

PUBLICAÇÕES

✓ Santos, M. S. F.; Lopes, F. S.; Vidal, D. T. R.; do Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *From Sample Processing to Quantification: A Full Electrochemical Strategy for Neutral Analyte Derivatization, Capillary Electrophoresis Separation and Contactless Conductivity Detection*. Analytical Chemistry (Washington), v. 84, p. 7599-7602, 2012.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- ✓ Santos, M. S. F.; Lopes, F. S.; Vidal, D. T. R.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Derivatização Eletroquímica de Álcoois para Eletroforese Capilar: Aplicação da Metodologia para a Análise Quantitativa de Etanol em Bebidas*. **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)**, 2012, Montevideo – Uruguay.
- ✓ Lopes, F. S.; Santos, M. S. F.; Bacarro, A. L. B.; Gutz, I. G. R., *Análise de alvejantes domésticos baseados em peróxido de hidrogênio: uma aula de química analítica*. **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)**, 2012, Montevideo – Uruguay.
- ✓ Santos, M. S. F.; Prada, S. M., *Variação das Concentrações de Nutrientes nos Sedimentos da Região Próxima ao Emissário Submarino de Esgoto de Praia Grande I, São Paulo, Brasil*. **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 2º Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)**, 2012, Montevideo – Uruguay.
- ✓ Lopes, F. S.; Santos, M. S. F.; Vidal, D. T. R.; Nogueira, T.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Probing Reaction Products on Catalyst and Electrodes by Capillary Electrophoresis Automated Electrochemical Flow System*. **2º Congresso Analítica Latin América**, 2011, São Paulo – SP.
- ✓ Lopes, F. S.; Santos, M. S. F.; Vidal, D. T. R.; Lago, C. L.; Gutz, I. G. R., *Derivatização de Álcoois por Oxidação Eletroquímica: Uma Nova Estratégia para Viabilização de Análise de Espécies Neutras por Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato*. **16º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA)**, 2011, Campos do Jordão – SP.
- ✓ Santos, M. S. F.; Prada, S. M.; Duleba, W.; Teodoro, A. C., *Variação das diferentes espécies de fósforo em sedimentos da região próxima ao emissário submarino de esgotos de Praia Grande I, SP, Brasil, entre os anos de 2004 e 2008*. **4º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) y 10º Encuentro de Química Analítica y Ambiental (ENQAA)**, 2010, Viña Del Mar – Chile.
- ✓ Santos, M. S. F.; Prada, S. M.; Teodoro, A. C.; Duleba, W., *Estudo geoquímico dos sedimentos da região próxima ao emissário submarino de esgoto de Praia Grande I, SP*. **15º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA)**, 2009, Salvador – BA.
- ✓ Santos, M. S. F.; Prada, S. M.; Reis, M. S.; Oliveira, C. E. S.; Oliveira, E., *Variação das diferentes espécies de fósforo nos sedimentos do reservatório de Guarapiranga, SP, no período de 1998 a 2007*. **1º Encontro Brasileiro de Especiação Química (EspeqBrasil)**, 2008, Águas de São Pedro – SP.

✓ Reis, M. S.; Santos, M. S. F.; Prada, S. M.; Teodoro, A. C.; Duleba, W.; Oliveira, E., *Especiação de fósforo nos sedimentos da região dos emissários submarinos de esgoto do Saco da Capela e Cigarras, São Sebastião - SP. 1º Encontro Brasileiro de Especiação Química (EspeqBrasil)*, 2008, Águas de São Pedro – SP.