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

KELLITON JOSÉ MENDONÇA FRANCISCO

**Eletroforese com dupla detecção condutométrica
sem contato e espectrometria de massas**

Versão Corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

15/09/2017

KELLITON JOSÉ MENDONÇA FRANCISCO

**Eletroforese com dupla detecção condutométrica
sem contato e espectrometria de massas**

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

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo

2017

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

F818e Francisco, Kelliton José Mendonça
Eletroforese com dupla detecção condutométrica
sem contato e espectrometria de massas / Kelliton
José Mendonça Francisco. - São Paulo, 2017.
116 p.

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

Orientador: do Lago, Claudimir Lucio

1. Eletroforese Capilar. 2. Espectrometria de
Massas. 3. Instrumentação Analítica. 4. Detecção
Condutométrica sem Contato. 5. Impressão 3D. I. T.
II. do Lago, Claudimir Lucio, orientador.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Claudimir Lucio do Lago pela orientação, exemplo profissional, compreensão e conversas no final do dia.

Aos professores Gutz e Lúcio pelo apoio e incentivo ao longo do projeto.

Aos meus pais Dirceu e Valéria pelo carinho, incentivos e apoio durante os momentos difíceis.

À minha esposa Adriana pelo apoio, incentivo, compreensão e conversas que sempre me ajudaram a refletir sobre as dificuldades do dia-a-dia.

Agradeço às minhas irmãs Cátia e Caroline por serem estas amigas de todos os momentos e por nossas conversas.

À minha família, em especial aos meus avós José e Ivone por sempre serem exemplos em perseverança nos momentos difíceis.

Ao Denis, Daniela e Wagner por suas ideias, sugestões e ajuda com o CE-MS no início do projeto.

Ao Carlos pela ajuda com as impressoras 3D, pelo apoio e por nossas conversas sobre assuntos diversos.

Aos amigos do LAIA que contribuíram direta e indiretamente com ideias, palavras de incentivo, momentos de alegria e reflexão.

Aos amigos da EACH, Bruno, Francisco, Daniel, Lúcio, Luiz, Patrícia e Lilian pelos momentos de conversa e descontração que ajudaram bastante a repor as energias despendidas pelo stress no trabalho antes de me encaminhar para o IQ.

Agradeço a Deus por me acompanhar em todos os momentos, me guiando pelos caminhos e dando o amparo necessário para suportar as dificuldades.

Ao suporte financeiro da FAPESP, auxílio à pesquisa 2012/06642-1.

“Existem aqueles que veem as coisas do jeito que são e se perguntam: por quê? Sonho com as coisas que nunca aconteceram e me pergunto: por que não?”

(Robert Francis Kennedy)

RESUMO

Francisco, K. J. M., Eletroforese com dupla detecção condutométrica sem contato e espectrometria de massas. 2017. 117p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A presente tese descreve o aprimoramento do acoplamento de eletroforese capilar/espectrometria de massas com ionização por electrospray (CE-ESI-MS) (1) pelo desenvolvimento de estratégias de controle de temperatura e posicionamento e (2) pela inclusão de dois detectores condutométricos sem contato (C^4Ds) ao capilar de separação eletroforética de modo a se obter informações complementares às aquelas fornecidas pelo MS. Os primeiros aprimoramentos consistiram na introdução de uma plataforma móvel para o CE e um módulo de refrigeração da porção externa do capilar. Com estes aprimoramentos, foi possível realizar estudo de cinética de hidrólise de monoetilcarbonato (MEC) por CE-ESI-MS, obtendo-se, pela primeira vez, o valor da energia de ativação de $99 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$. Posteriormente, foi desenvolvida uma série de protótipos de cartuchos impressos 3D em ABS, permitindo a introdução de até dois C^4Ds . Além da inclusão dos detectores, a versão aprimorada do cartucho permitiu um bom comportamento térmico da coluna, permitindo que, tal como em sistemas CE-DAD, correntes eletroforéticas alcancem valores da ordem de $100 \mu\text{A}$ sem efeitos térmicos indesejados (o que não ocorre ao se utilizar o cartucho original para CE-MS). As possibilidades do arranjo CE- $(C^4D)^2$ -ESI-MS foram demonstradas pelo desenvolvimento de métodos analíticos de separação para: (1) açúcares a pH 11,2; (2) aminas biogênicas a pH 2,0 e (3) ácidos carboxílicos a pH 7,5. A compatibilização dos eletroferogramas dos C^4Ds ao longo do capilar e do ESI-MS no final do capilar foi conseguida pela correção da escala de tempo. Assim, as informações obtidas com os vários detectores podiam ser facilmente complementadas. Devido à baixa seletividade intrínseca do C^4D , este se mostra amplamente complementar ao ESI-MS, que é o sistema mais seletivo para CE disponível na atualidade. Embora este último também seja altamente sensível, o C^4D se mostrou comparável ou até mais apropriado em alguns casos. Assim, esta combinação única apresenta um grande potencial como ferramenta analítica.

Palavras-chave: Eletroforese Capilar, Espectrometria de Massas, Instrumentação Analítica, Detecção Condutométrica sem Contato, Impressão 3D

ABSTRACT

Francisco, K. J. M., Electrophoresis with dual Contactless Conductometric Detection and Mass Spectrometry. 2017. 117p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry ou Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The capillary electrophoresis/mass spectrometry with electrospray source (CE-ESI-MS) was improved by (1) the development of new temperature control and positioning systems and (2) the inclusion of two capacitively coupled contactless conductivity detectors (C^4D s) to the electrophoretic separation capillary allowing to obtain complimentary information to the MS. The initial improvements were the introduction of a sliding platform for the CE equipment and a thermostatic module for the portion of the capillary outside the CE environment. These improvements allowed obtaining, for the first time, the activation energy of hydrolysis reaction of monoethyl carbonate: $99 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$. However, the most important improvement was the development of 3D-printed cartridge allowing the inclusion of up to two C^4D s along the capillary. This cartridge also allowed a significant improvement of the thermal control over the capillary. No significant difference of the original CE-DAD was observed for electrophoretic currents up to $100 \mu\text{A}$. The original CE-MS has similar behavior only until $60 \mu\text{A}$. New possibilities of the $\text{CE}-(C^4D)^2\text{-ESI-MS}$ setup were demonstrated by the development of analytical methods for separation of: (1) sugars at pH 11.2, (2) biogenic amines at pH 2.0, and (3) carboxylic acids at pH 7.5. The electropherograms of the three detectors were made compatible by correcting the time scales. Therefore, the information obtained from the three detectors may be easily complemented. Thanks to the intrinsic low-selectivity of the C^4D , that is complementary to the MS, which is the most selective detector for CE today. Although MS is also highly sensitive, C^4D had similar or even better performance in some cases. Therefore, this unique combination is powerful analytical tool.

Keywords: Capillary Electrophoresis, Mass Spectrometry, Analytical Instrumentation Development, Contactless Conductometric Detector, 3D print

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - 3 Dimensões

ABS - Acrilonitrila Butadieno Estireno

AD - *Analog-to-digital* (Analógico para Digital)

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (Ionização Química à Pressão Atmosférica)

BGE - *Background Electrolyte* (Eletrólito de Corrida)

C⁴D - *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection* (Detecção Condutométrica sem Contato Capacitivamente Acoplada)

CE - *Capillary Electrophoresis* (Eletroforese Capilar)

CI - *Chemical Ionization* (Ionização Química)

CID - *Collision-Induced Dissociation* (Dissociação Induzida por Colisão)

CZE - *Capillary Zone Electrophoresis* (Eletroforese Capilar por Zona)

DAD - *Diode Array Detector* (Detector de Arranjo de Diodo)

DC - *Direct Current* (Corrente Contínua)

EI - *Electron Ionization* (Ionização por Elétrons)

EM - *Electron Multiplier* (Multiplicador de Elétrons)

EOF - *Electroosmotic Flow* (Fluxo Eletrosmótico)

ESI - *Electrospray Ionization* (Ionização por Eletronebulização)

FDM - *Fused Deposition Modeling* (Modelagem por Deposição de Material Fundido)

FWHM - *Full Width at Half Maximum* (Largura de Pico a Meia Altura)

HECA - *Hemiester of carbonic acid* (Hemiésteres de Ácido Carbônico)

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

I²C - *Inter-Integrated Circuit* (Circuito Inter-Integrado)

IDE - *Integrated Development Environment* (Ambiente integrado de Desenvolvimento)

LIF - *Laser Induced Fluorescence* (Fluorescência Induzida por Laser)

MAC - Monoalquilcarbonato

MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (Dessorção e Ionização por Laser

Assistida por Matriz)

MCU - *Microcontroller Unit* (Unidade Microcontroladora)

MEC - Monoetilcarbonato

MES - Ácido (N-morfolino)etanossulfônico

MR - Módulo de Refrigeração

MRM - *Multiple Reaction Monitoring* (Monitoramento de Reações Múltiplas)

MS - *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas)

PCB - *Printed Circuit Board* (Placa de Circuito Impresso)

PLA - *Poly(lactic acid)* (Ácido Polilático)

PU - Poliuretano

PVA - Poli(acetato de vinila)

Q1, Q2 e Q3 - Quadrupolos 1, 2 e 3

RF - Rádio Frequência

SIM - *Selected Ion Monitoring* (Monitoramento de íon Selecionado)

SNR - *Signal-to-Noise Ratio* (Relação Sinal-Ruído)

TCA - trichloroacetic acid (Ácido Tricloroacético)

TEA - Trietilamina

TPU - Poliuretano termoplástico

UART - *Universal Asynchronous Receiver/Transmitter* (Receptor/Transmissor Universal

Assíncrono)

USB - *Universal Serial Bus* (Barramento Serial Universal)

UV - Ultra Violeta

Vis - Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

A_0 – área relativa inicial

k_h – constante de hidrólise

μ_A – mobilidade do analito

μ_E^- – mobilidade do íon

μ_E^+ – mobilidade do contra-íon

C_A – concentração do analito

L_D – distancia até o detector

L_T – comprimento do capilar

L_{cf} – distância entre o centro do pico e seu final

L_{ic} – distância entre o início do pico e seu centro

t' – tempo de migração compatibilizado

t_m – tempo de migração

v_a – velocidade aparente

v_e – velocidade eletroforética

v_{eof} – velocidade do fluxo eletrosmótico

w_b – largura da base à meia altura

α^2 – variância dos picos

α_d^2 – variância dos picos relacionada à detecção

α_i^2 – variância dos picos relacionada à injeção

α_l^2 – variância dos picos relacionada à difusão longitudinal

α_o^2 – variância dos picos relacionada a outros processos

Δ_d – comprimento do capilar no interior do detector

Δ_i – variação do comprimento do capilar ocupado pela amostra injetada

μ – mobilidade eletroforética

μ_{eff} – mobilidade efetiva

μ_{eof} – mobilidade do fluxo eletrosmótico

μ_i – mobilidade iônica

A – área relativa

$d.i.$ – diâmetro interno

$d.e.$ – diâmetro externo

E – campo elétrico

f – força elétrica

f_{aps} – força de atrito

i – corrente

R – resistência

r_i – raio iônico

U – potencial aplicado

z_ie – carga elétrica do íon

α – frações molares

ζ – potencial zeta

η – viscosidade

Λ – condutância molar do eletrólito

π – constante pi

ϕ – fluxo de fluido

D – coeficiente de difusão

F – constante de Faraday

K – constante de cela do detector

N – número de pratos

Q – aquecimento Joule

V – potencial de separação

l – comprimento o capilar entre o detector e ponto de injeção

r – raio interno

t – tempo de migração do padrão interno

v_i – velocidade iônica

ΔG – variação da condutância

ΔP – diferença de pressão

SUMÁRIO

1	Introdução	24
1.1	Eletoforese Capilar	25
1.1.1	<i>Controle térmico e aquecimento Joule</i>	<i>30</i>
1.1.2	<i>Detecção Condutométrica Sem Contato.....</i>	<i>31</i>
1.2	Espectrometria de Massas.....	33
1.2.1	<i>Monitoramento de Íon Seleccionado (SIM) e Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) 37</i>	
1.3	Acoplamento CE-MS utilizando ESI	39
1.4	Desenvolvimento de instrumentação analítica utilizando impressão 3D.....	41
2	Objetivos.....	45
2.1	Objetivos específicos	45
3	Materiais e Métodos	47
3.1	Desenvolvimento Instrumental	47
3.1.1	<i>Plataforma deslizante.....</i>	<i>48</i>
3.1.2	<i>Otimização e interfaceamento do C^4D ao acoplamento CE-MS.....</i>	<i>49</i>
3.1.3	<i>Módulo de refrigeração</i>	<i>50</i>
3.1.4	<i>Desenvolvimento e caracterização térmica do cartucho para CE-$(C^4D)^2$-ESI-MS.....</i>	<i>52</i>
3.1.5	<i>Estudo comparativo da faixa linear para C^4D e MS.....</i>	<i>52</i>
3.2	Análises por CE-MS e CE- C^4D -MS.....	53
3.2.1	<i>Cancelamento do fluxo laminar.....</i>	<i>54</i>
3.2.2	<i>Estudo cinético a temperatura controlada^c.....</i>	<i>55</i>
3.2.3	<i>Controle de temperatura e espécies termicamente instáveis</i>	<i>56</i>
3.2.4	<i>Determinação de açúcares por CE-$(C^4D)^2$-ESI-MS.....</i>	<i>57</i>
3.2.5	<i>Detecção de aminas biogênicas por CE-$(C^4D)^2$-ESI-MS.....</i>	<i>57</i>

3.2.6	<i>Detecção de ácidos carboxílicos por CE-(C⁴D)²-ESI-MS</i>	58
4	Resultados e Discussão	59
4.1	Aprimoramentos do sistema CE-MS	60
4.1.1	<i>Plataforma deslizante</i>	60
4.1.2	<i>Módulo de Refrigeração</i>	63
4.1.3	<i>Estudo cinético a temperatura controlada</i>	68
4.1.4	<i>Cancelamento do fluxo laminar em CE</i>	71
4.2	Implementação e caracterização do sistema com dupla detecção CE-(C ⁴ D) ² -ESI-MS	76
4.2.1	<i>Implementação do sistema com dupla detecção CE-(C⁴D)²-ESI-MS</i>	76
4.2.2	<i>Desenvolvimento do cartucho para CE-(C⁴D)²-ESI-MS</i>	80
4.2.3	<i>Estudo comparativo da faixa linear para C⁴D e MS</i>	85
4.3	Aplicações e Demonstrações do sistema CE-(C ⁴ D) ² -ESI-MS em condições de temperatura controlada	89
4.3.1	<i>Determinação de açúcares por CE-(C⁴D)²-ESI-MS</i>	89
4.3.2	<i>Detecção de aminas biogênicas por CE-(C⁴D)²-ESI-MS</i>	92
4.3.3	<i>Detecção de ácidos carboxílicos por CE-(C⁴D)²-ESI-MS</i>	95
4.3.4	<i>Controle de temperatura e espécies termicamente instáveis</i>	99
5	Conclusões	105
6	Referencias bibliográficas	107
ANEXO I: Diagrama elétrico da interface microcontrolada		111
ANEXO II: Fluxograma do software de aquisição de dados para C⁴D		112
Súmula Curricular		113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diferença entre o perfil de um fluxo gerado por pressão eletrosmótica (A) e hidrodinâmica (B). 27
- Figura 2:** Esquema simplificado com as partes fundamentais de um equipamento de eletroforese capilar. A-Reservatório de eletrólito (*Inlet*); B-Reservatório de eletrólito (*Outlet*); C-Reservatório de amostra; D-Detector; E-Coluna capilar; F-Sistema de injeção; G-Eletrodos; H-Fonte de alta tensão e I-Gabinete mantido a temperatura constante. 29
- Figura 3:** Diagrama de uma célula de detecção de um detector condutométrico sem contato; E1 - Eletrodo ligado à fonte de sinal alternado A; B - Coluna capilar; E2-Eletrodo ligado ao circuito eletrônico C responsável pela amplificação e conversão do sinal AC em sinal DC. 32
- Figura 4:** Diagrama elétrico equivalente da cela de detecção de um C⁴D. R1– resistor relacionado ao segmento da coluna capilar preenchido com a solução a ser analisada; C1 e C2– capacitores relacionados ao acoplamento capacitivo entre os eletrodos E1 e E2 e a solução no interior do capilar; C3– acoplamento capacitivo entre os eletrodos. 33
- Figura 5:** Diagrama de blocos simplificado de um Espectrômetro de Massas. A- sistema de introdução de amostras (*Inlet*); B- fonte de ionização; C- analisador de íons; D- detector; E- sistema de manipulação e apresentação dos dados. 34
- Figura 6:** Sonda do ESI utilizada no MS Agilent Série 6400. A- *sheath liquid*, B- gás de nebulização, C- coluna capilar, D- eletrodo interno, E- corpo da sonda. 36
- Figura 7:** Esquema simplificado de um triplo quadrupolo operando em modo MRM. Q1- Primeiro quadrupolo, onde ocorre a separação primária de íons de um determinado valor de m/z ; Q2- Segundo quadrupolo, onde ocorre a dissociação induzida por colisão do íon selecionado em Q1; Q3- Terceiro quadrupolo responsável pela separação dos fragmentos formados em Q2. 38
- Figura 8:** Acoplamento típico de um CE Agilent 7100 a um MS Agilent 6430 com destaque para o capilar posicionado externamente aos equipamentos, A;. B – equipamento de CE; C – espectrômetro de massas. 40

Figura 9: Impressora 3D caseira projetada para impressão utilizando filamentos poliméricos. A- extrusora para filamentos poliméricos; B- mesa de impressão; C- interface microcontrolada e D- bobina de filamento polimérico. 42

Figura 10: Esboço da plataforma deslizante para o equipamento de CE. 1-Vista frontal e 2- Vista superior; a-base de alumínio deslizante, b-guias lineares, c-base de sustentação de alumínio, d-chapas de PMMA para estabilização do equipamento. 49

Figura 11: Imagem das partes internas que constituem o módulo de refrigeração. 1- Esquema ilustrativo das partes internas do módulo e 2- Foto do interior no módulo (vista superior) destacado em vermelho; A-módulo de termostatização, B-serpentina, C-radiador, D-ventoinha, E-coluna capilar, F-acoplamento capilar/tubo de ar comprimido, G-tubo de PU 4 mm para entrada de ar frio junto à coluna capilar, H-cartucho auxiliar para CE confeccionado em PMMA, I-sonda do ESI, J-sheath liquid, K-gás de nebulização, L-tubo de silicone para retorno de ar quente após o contato com a coluna capilar, M-acoplamento de PVC que permite o retorno do ar insuflado através do tubo de PU. 51

Figura 12: Distância entre os equipamentos de CE e MS, onde C representa o capilar saindo do CE e entrando no ESI do MS e L representa a distância de 30 cm recomendada pelo fabricante dos equipamentos para eventuais manutenções do MS. 61

Figura 13: Plataforma deslizante construída para permitir o deslocamento linear do CE durante os procedimentos de limpeza e manutenção do MS. A- Esboço da montagem da plataforma, B- CE posicionado sobre a plataforma deslizante durante uma análise, a- base de alumínio deslizante, b-guias lineares, c- base de sustentação de alumínio, d- chapas de PMMA para estabilização do CE, 1 e 2, vistas frontal e superior, respectivamente. 62

Figura 14: Imagem das partes internas que constituem o módulo de refrigeração. A- módulo de termostatização, B- serpentina, C- radiador, D- ventoinha, E- coluna capilar, F- acoplamento capilar/tubo de ar comprimido, G- tubo de PU 4 mm para entrada de ar frio junto à coluna capilar, H- cartucho auxiliar para CE confeccionado em PMMA, I- sonda do ESI, J-*sheath liquid*, K- gás de nebulização, L- tubo de silicone para retorno de ar quente após o contato com a coluna capilar, M- acoplamento de PVC que permite o retorno do ar insuflado através do tubo de PU. 64

Figura 15: Módulo de refrigeração. Em destaque um suporte para C⁴D confeccionado em ABS. A- Módulo de refrigeração, H- cartucho auxiliar do módulo de refrigeração, N- banho

ultratermostático, I- sonda do ESI com o suporte para C⁴D acoplado e O- grade de aterramento da coluna capilar. 65

Figura 16: Comportamento da Lei de Ohm em função da vazão de ar frio utilizando o módulo de refrigeração. 67

Figura 17: Influência da temperatura sobre o tempo de migração e a área de pico do MEC. 69

Figura 18: Gráfico de Arrhenius. A energia de ativação da reação de hidrólise pode ser estimada através da inclinação da curva. 70

Figura 19: Curva de tempo de migração, largura de pico à meia altura e número de pratos para análises de cafeína, nicotinato e ftalato. 74

Figura 20: Eletroferogramas de padrões de cafeína, nicotinato e ftalato obtidos na ausência e na presença de *backpressure*, A e B respectivamente. 75

Figura 21: Eletrodos da cela de detecção do C⁴D. A-Eletrodo confeccionado por *wire up* em um detector montado segundo o projeto apresentado por Francisco e do Lago em 2009 e B-Eletrodo de furo metalizado recoberto por ouro embutido no próprio PCB de 2 mm de espessura. 77

Figura 22: Placa microcontrolada utilizada no interfaceamento dos detectores C⁴D ao CE-MS. A- placa microcontrolada Teensy; B- conectores para instalação de C⁴Ds; C- conectores para instalação de dispositivos externos e D- conector multifuncional com pinos reservados para *trigger*. 78

Figura 23: Conector tipo DB-9 identificado no painel traseiro como “*Remote*” e protocolo de *start* e *stop*. a-Largura do pulso de 150 ms em estado lógico 0; b-Transição do nível lógico alto (5 V) para o nível lógico baixo (0 V). Pinos do Conector: 1-GND; 2-Preparação; 3-*Start*; 4-Desligar equipamento; 5-Não usado; 6-Não usado; 7-*Ready*; 8-*Stop*; 9-Não usado. 79

Figura 24: Protótipo L1 utilizando junta flexível entre as partes CE e MS do novo cartucho. A- parafusos de fixação da tampa do lado do CE; B- ímãs de neodímio de 3 x 3 mm utilizados para fixar a tampa do lado do MS; C- câmara de recirculação do ar proveniente do CE; D- ventoinha; E-C⁴Ds; F- sonda do ESI; G- junção flexível de mola e H- tubo de PU 8 mm de diâmetro interno. 83

Figura 25: Versão final do cartucho para uso em CE-(C⁴D)²-ESI-MS. A-C⁴D; B- interface eletrônica; C- conector de comunicação USB; D- conector de alimentação DC para os detectores e a ventoinha do ESI; E- conector para *trigger* compatível com equipamentos Agilent e F- dutos revestidos internamente com fitas de cobre. 84

Figura 26: Eletroferogramas de uma separação de MES e Nicotinato $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, 1, 2 e 3, respectivamente, obtidos a partir do C^4D com o tempo de migração corrigido (A) a do MS (B). Os analitos foram separados em um eletrólito de corrida constituído de TEA 30 mmol L^{-1} (pH 11,6). O *sheath liquid* foi preparado a partir do eletrólito de corrida diluído 5 vezes em uma solução 1:1 (v/v) de metanol e água 86

Figura 27: Curvas de calibração das áreas de MES em concentrações 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 e $78 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ corrigidas pelas áreas de nicotinato $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. 87

Figura 28: Fator de simetria para os picos de nicotinato $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ obtidos por C^4D e MS sequencialmente. 88

Figura 29: Eletroferogramas obtidos simultaneamente por A- C^4D e B-ESI-MS/MS para inositol (1), galactose (2), ribose (3) e ácido galacturônico (4). Os eletroferogramas apresentados em **C** foram obtidos reajustando a escala de tempo a partir dos eletroferogramas **A** de modo a compatibilizar os tempos com os eletroferogramas apresentados em **B**. 91

Figura 30: Eletroferogramas obtidos simultaneamente por C^4D (A) e ESI-MS/MS (B) para putrescina (1), feniletilamina (2), triptamina (3) e 1,7-diaminoheptano (4). A escala de tempo dos eletroferogramas para C^4D foram reajustadas de modo a compatibilizar os tempos com os eletroferogramas obtidos por MS. A coluna capilar possui comprimento total de 78,0 cm e os C^4D s foram posicionados a 42,8 e 64,5 cm de distância do ponto de injeção. 93

Figura 31: Número de pratos para putrescina (■), triptamina (●) e 1,7-diaminoheptano (▲) obtidos a partir do primeiro C^4D (a), do segundo C^4D (b) e do ESI-MS (c) e *d* representa a estimativa caso os C^4D s estivessem posicionados na extremidade da coluna capilar tal como o ESI-MS. 95

Figura 32: Eletroferogramas de 1-formiato, 2-acetato, 3-lactato e 4-nicotinato $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ obtidos simultaneamente a partir de C^4D (A) e de ESI-MS (B). Entre parênteses, é indicado o valor da relação sinal-ruído para cada uma das espécies analisadas. Em destaque na figura A, um pico negativo intenso provocado pela sucção provocada pelo ESI durante a separação. 97

Figura 33: Diferentes cartuchos utilizados no estudo do desvio da Lei de Ohm. A- cartucho Agilent compatível com o CE 7100 para análises exclusivamente por CE, B- cartucho Agilent compatível com o acoplamento CE-MS e C- cartucho desenvolvido no presente projeto compatível com o acoplamento CE- $(C^4D)^2$ -ESI-MS. 99

Figura 34: Curva de corrente versus potencial para avaliação do desvio da Lei de Ohm utilizando três cartuchos diferentes sob as mesmas condições: A- cartucho utilizado em CE; B- cartucho utilizado no acoplamento CE-MS, ambos fornecidos pelo fabricante dos equipamentos e C- cartucho desenvolvido para o acoplamento CE-(C⁴D)²-ESI-MS. Temperatura de análise (20 °C), temperatura da sala (23 °C), temperatura do gás de nebulização (120 °C), coluna capilar (75 µm d.i., 360 µm d.e. e 60 cm de comprimento), diferença de potencial aplicada (2 a 28 kV), BGE composto por ((NH₄)₂CO₃ 50 mM) e *sheath liquid* constituído de 5% de BGE diluído em uma solução de MeOH/H₂O 1:1 v/v. 100

Figura 35: Eletroferogramas de nicotinato (*m/z* 122 e célula de colisão a 4 V), MES (*m/z* 194 e célula de colisão a 3 V) e MEC (*m/z* 89 e célula de colisão a 4 V) em concentração 200 µmol L⁻¹, 200 µmol L⁻¹ e 430 mmol L⁻¹, respectivamente. MS programado em modo SIM com o potencial do ESI foi ajustado a 4,0 kV. O *scan time* foi ajustado em 200 ms. A- cartucho Agilent para CE-MS sem auxílio de ventilador, B- cartucho Agilent para CE-MS com auxílio de ventilador, C- cartucho desenvolvido para CE-(C⁴D)²-ESI-MS 102

Figura 31: Valores de áreas corrigidas de MES e MEC em relação à área de nicotinato. L- Cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS, C-Cartucho CE-MS com ventilação e S-Cartucho CE-MS sem ventilação. 104

INTRODUÇÃO

1.1 ELETROFORESE CAPILAR

Eletroforese é o fenômeno apresentado por partículas eletricamente carregadas que se deslocam em meio viscoso, quando submetidas a um campo elétrico externo. Este fenômeno tem múltiplas aplicações, sendo a separação de espécies químicas iônicas ou ionizáveis uma das mais relevantes.

Arne Wilhelm Tiselius aperfeiçoou a técnica de eletroforese entre os anos de 1930 e 1937. Durante este período, Tiselius apresentou pela primeira vez a capacidade da eletroforese separar espécies químicas – na ocasião, proteínas presentes no soro sanguíneo, ganhando em 1948 o Prêmio Nobel por sua contribuição.¹

No final da década de 1970, Mikkers *et al.* enunciaram estudos teóricos sobre o comportamento de analitos e suas concentrações em eletroforese capilar por zona livre (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*).² No entanto, somente após os estudos de Jorgenson e Lukacs, em 1980, que a Eletroforese Capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) tornou-se uma opção relevante entre as técnicas de separação de espécies iônicas ou ionizáveis.³

A CE é uma técnica de separação baseada na diferença de mobilidade entre as espécies químicas iônicas ou ionizáveis quando as mesmas são submetidas a um campo elétrico. Estas espécies participam de reações de equilíbrio durante a separação, podendo variar sua carga e mobilidade em função das condições estabelecidas pelo método.⁴

Sob os efeitos do campo elétrico, os íons movem-se na direção dos eletrodos de cargas opostas às suas. O movimento do íons em meio ao campo elétrico, se dá por ação da força elétrica f (equação 1) e da força de atrito provocada pela viscosidade do meio f_{aps} (equação 2):

$$f = z_i e E \quad (1)$$

$$f_{aps} = 6\pi\eta r_i v_i \quad (2),$$

onde $z_i e$ representa a carga elétrica do íon, E o campo elétrico, η a viscosidade, r_i o raio iônico e v_i a velocidade adquirida pelo íon.

Conforme a velocidade do íon aumenta, a força de atrito aumenta enquanto a aceleração diminui até que a mesma se anule. Nesta condição, a força elétrica e a força de atrito se igualam e a velocidade média do íon permanece constante, resultando, portanto, na mobilidade iônica, μ_i , equação 3.

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} \quad (3)$$

Espécies envolvidas em equilíbrio químico, por exemplo, ácidos fracos, cuja mobilidade efetiva (μ_{eff}) depende das mobilidades eletroforéticas (μ) e das frações molares (α) das n espécies individuais:

$$\mu_{eff} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \mu_i \quad (4)$$

Durante a etapa de separação, a velocidade eletroforética adquirida por um íon depende de propriedades como a viscosidade do eletrólito de corrida e a relação entre o raio iônico hidratado do analito e de sua carga. A velocidade eletroforética (v_e) pode ser expressa através da equação 5, utilizando os valores do campo elétrico aplicado durante a separação (E) e a mobilidade efetiva (μ_{eff}):

$$v_e = \mu_{eff} E \quad (5)$$

O campo elétrico promove o movimento das espécies químicas em direção aos eletrodos, sendo que em tubos capilares com paredes contendo espécies iônicas, a formação de um fluxo eletricamente induzido denominado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) é observado.⁵

Dependendo do sentido e intensidade do EOF, o analito pode ter seu tempo de migração reduzido (no caso de espécies migrando no mesmo sentido do EOF) ou ser arrastado para o sentido oposto ao de sua migração. Por não serem influenciadas pelo campo elétrico, moléculas neutras são simplesmente arrastadas pelo EOF sem que haja diferenciação entre si.⁶ Devido ao perfil predominantemente plano do EOF, a contribuição

do mesmo para o alargamento da banda torna-se menos significativo quando comparado com fluxo de perfil parabólico provocado por pressão hidrodinâmica. A Figura 1 ilustra o perfil de fluxos gerados por pressão eletrosmótica e por pressão hidrodinâmica.

Figura 1: Diferença entre o perfil de um fluxo gerado por pressão eletrosmótica (A) e hidrodinâmica (B).

A mobilidade do EOF (μ_{eof}) depende diretamente da constante dielétrica (ϵ), da viscosidade da solução (η) e do potencial do plano de cisalhamento na região difusa, ou seja, do potencial zeta (ζ):

$$\mu_{eof} = \frac{\zeta \epsilon}{4\pi\eta} \quad (6)$$

A velocidade adquirida pelo EOF (v_{eof}) pode ser definida como o produto de sua mobilidade pelo campo elétrico, conforme apresentado pela equação a seguir:

$$v_{eof} = \mu_{eof} E \quad (7)$$

A velocidade aparente (v_a), ou seja, a velocidade que as espécies químicas adquirem durante a análise, é diretamente influenciada pela presença do EOF. Sendo v_a a soma vetorial de v_{eof} e v_e :

$$v_a = (v_{eof} + v_e) E \quad (8)$$

O tempo de migração (t_m) de uma espécie pode ser previsto considerando a μ_{eff} , a μ_{eof} , o potencial aplicado (V), o comprimento total do capilar (L_T) e o comprimento efetivo, ou seja, a distância entre o detector e o ponto de injeção (L_D):

$$t_m = \frac{L_D L_T}{(\mu_{eff} + \mu_{eof})V} \quad (9)$$

Um fator importante em um sistema de separação é a sua eficiência dada pelo número de pratos (N). Em CE, o valor de N pode ser estimado através do comprimento do capilar (L_T), distância até o detector (L_D), mobilidade eletroforética (μ), potencial aplicado (V), coeficiente de difusão (D) e distâncias compreendidas no ponto de injeção e detecção, $\Delta x_{injeção}$ e $\Delta x_{detecção}$, respectivamente.

$$N = \frac{L_D^2}{\frac{2DL_D L_T}{\mu V} + \frac{(\Delta x_{injeção})^2}{12} + \frac{(\Delta x_{detecção})^2}{12}} \quad (10)$$

Em um método de separação, quanto maior o valor do número de pratos, maior será sua eficiência. Em CE, este valor pode ser considerado elevado, chegando à 1.000.000 de pratos, tornando a CE uma opção a ser considerada na escolha de um método de separação de espécies iônicas ou ionizáveis.

O equipamento de eletroforese capilar é constituído de algumas partes fundamentais. Um equipamento CE é constituído basicamente por um reservatório de eletrólito localizado do lado da injeção (*Inlet*), um reservatório de eletrólito do lado do descarte (*Outlet*), um ou mais reservatórios de amostras, o detector, capilar, sistema de injeção, eletrodos (geralmente de platina), fonte de alta tensão e um gabinete mantido a temperatura constante, Figura 2.

Figura 2: Esquema simplificado com as partes fundamentais de um equipamento de eletroforese capilar. A-Reservatório de eletrólito (*Inlet*); B-Reservatório de eletrólito (*Outlet*); C-Reservatório de amostra; D-Detector; E-Coluna capilar; F-Sistema de injeção; G-Eletrodos; H-Fonte de alta tensão e I- Gabinete mantido a temperatura constante.

Usualmente são utilizados capilares de sílica fundida recobertos por poliimida, que lhe confere resistência mecânica. Suas dimensões são determinadas de acordo com o método a ser utilizado. O comprimento destes capilares pode variar entre 20 e 100 cm sendo seu diâmetro interno, dimensões entre 15 e 100 μm .

As separações são realizadas aplicando potencial de separação entre as extremidades do capilar. Valores ajustados entre 5 e 30 kV são comumente empregados, a fim de se obter campos elétricos entre 100 e 500 V cm^{-1} .

As amostras podem ser introduzidas no interior do capilar através de injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. Na injeção eletrocinética aplica-se uma diferença de potencial nas extremidades do capilar (cerca de algumas unidades de kV). Neste tipo de injeção, a amostra injetada não representa efetivamente a composição real da mesma, pois a proporção dos analitos injetados dependerá da mobilidade de cada espécie e do EOF. Na injeção hidrodinâmica, aplica-se uma diferença de pressão entre as extremidades da coluna capilar por alguns segundos. Neste tipo de injeção, a alíquota injetada representa

efetivamente a amostra, pois este método não depende das mobilidades das espécies, apenas da homogeneidade da amostra e da pressão aplicada.⁵

1.1.1 CONTROLE TÉRMICO E AQUECIMENTO JOULE

Ao se aplicar um potencial de separação surge uma corrente elétrica no interior da coluna capilar que provoca o aquecimento do eletrólito. Como o aquecimento da coluna capilar é inerente à corrente elétrica em seu interior, a presença do aquecimento Joule deverá ser sempre considerada em uma análise por CE. O aquecimento provocado pela corrente elétrica é capaz de alterar consideravelmente a viscosidade do meio ou mesmo a estabilidade de espécies químicas envolvidas, podendo comprometer a reprodutibilidade da análise ou mesmo inviabilizando-a.

O calor gerado pelo aquecimento Joule, Q , é dado por:

$$Q = \frac{V^2 \pi r^2 k}{L_T} \quad (11),$$

onde V , r e k e L_T são o potencial de separação, o raio interno do capilar, a condutividade da solução que preenche o capilar e o comprimento de mesmo, respectivamente.

Como a viscosidade do eletrólito varia com a temperatura em aproximadamente 2% a cada grau Celsius, é comum o controle térmico de toda coluna capilar a uma temperatura pré-estabelecida conforme a necessidade.⁷⁻⁸

Dependendo do fabricante do equipamento, o mesmo pode utilizar a refrigeração líquida ou por passagem de ar como métodos para controle térmico. Deve-se considerar que a água, por exemplo, apresenta maior capacidade térmica que o ar seco: 0,61 e 0,03 W m⁻¹ K⁻¹, respectivamente. No entanto, alguns estudos mostram que o ar seco a uma velocidade superior a 10 m s⁻¹ pode apresentar uma eficiência similar aos líquidos na remoção de calor.⁹

Independentemente do controle térmico, nem toda extensão da coluna capilar apresentará uniformidade da temperatura ajustada no método de separação. Dependendo da concentração iônica nas bandas da amostra, determinados pontos do capilar podem apresentar gradientes de concentração que, conseqüentemente, ocasionarão em regiões mais aquecidas que outras. Algumas regiões da coluna capilar tais como as imersas nos

reservatórios e as que atravessam detectores, podem apresentar gradientes de temperatura devido à dificuldade do fluido refrigerante (líquido ou ar) alcançar estas regiões.

Portanto, a otimização do controle térmico para CE apresenta o desafio de minimizar os efeitos decorrentes do aquecimento Joule em toda extensão do capilar que, por consequência, resulta na variação da viscosidade, no tempo de migração e nas condições de equilíbrio químico no interior do capilar durante a separação.

1.1.2 DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO

Assim como em HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), os equipamentos de CE comerciais podem possuir diferentes tipos de detectores. Estes detectores podem operar em modo de detecção direta ou indireta, dependendo das propriedades ópticas do analito e do eletrólito de corrida. Usualmente, os CEs são comercializados com detectores ópticos baseados em absorção molecular nas regiões do ultravioleta e no visível (UV-Vis). No entanto, outros tipos de detectores baseados em fluorescência induzida a laser (LIF, do inglês *Laser Induced Fluorescence*) ou espectrometria de massas também são utilizados.

Em 1998, dois grupos de pesquisa independentes liderados por Zemann e do Lago publicaram simultaneamente um sistema de detecção condutométrica sem contato, que viria posteriormente ser conhecido como detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D , do inglês *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*).¹⁰⁻¹¹ Após a divulgação do novo modo de detecção, inúmeras variações de C^4D foram apresentadas e aprimoradas.¹²⁻¹⁶

Conforme apresentado na Figura 3, um C^4D se baseia no posicionamento de dois eletrodos tubulares metálicos no lado externo do capilar. Em um dos eletrodos aplica-se um sinal alternado de amplitude e frequência pré-definidos a partir de um circuito oscilador cujo sinal consegue atravessar a parede do capilar. As espécies iônicas do eletrólito e da amostra atuam como portadores de carga que permitem a passagem de uma corrente elétrica até a região do segundo eletrodo. O sinal alternado que chega até ao segundo eletrodo é conduzido a um circuito eletrônico capaz de converter a corrente elétrica que flui pela célula

de detecção em potencial que, posteriormente, será retificado, filtrado e amplificado de modo a se obter sinais DC (corrente contínua). Após esta etapa, o sinal analítico é conduzido ao dispositivo de registro por meio de uma interface eletrônica. O sinal analítico obtido é diretamente dependente da natureza e da concentração dos portadores de carga, ou seja, em condições controladas, ele é proporcional à concentração das espécies químicas que passam pela zona de detecção delimitada pelos eletrodos.

Figura 3: Diagrama de uma célula de detecção de um detector condutométrico sem contato; E1 - Eletrodo ligado à fonte de sinal alternado A; B - Coluna capilar; E2-Eletrodo ligado ao circuito eletrônico C responsável pela amplificação e conversão do sinal AC em sinal DC.

Quando espécies químicas de mobilidades diferentes passam através da célula de detecção, ocorrem variações de condutividade (ΔG) perceptíveis que podem expressas pela equação reduzida de Katzmayer:¹⁷

$$\Delta G = C_A \frac{(\mu_A^- - \mu_E^-)(\mu_A^- + \mu_E^+)F}{\mu_A 10^{-3} K} \quad (12),$$

onde C_A e μ_A^- representam a concentração do analito e sua mobilidade, respectivamente. μ_E^- e μ_E^+ são, respectivamente, as mobilidades absolutas do co-íon e contra-íon do eletrólito e K a constante de célula. Esta equação é estritamente válida para espécies monocarregadas e totalmente dissociadas. Ainda que estas condições não sejam observadas, a tendência apresentada por esta equação se mantém.

Na Figura 4, pode-se observar um diagrama elétrico equivalente simplificado da cela de detecção que compõe o C⁴D. O diagrama apresentado sugere que, assim como um circuito RC, a cela de detecção de um C⁴D requer frequência e amplitude do sinal de RF adequadas ao seu funcionamento com o máximo de sensibilidade, pois parte do sinal poderia ser conduzido preferencialmente através de C3, resultando na perda de sensibilidade.¹²⁻¹³

Figura 4: Diagrama elétrico equivalente da cela de detecção de um C⁴D. R1– resistor relacionado ao segmento da coluna capilar preenchido com a solução a ser analisada; C1 e C2– capacitores relacionados ao acoplamento capacitivo entre os eletrodos E1 e E2 e a solução no interior do capilar; C3– acoplamento capacitivo entre os eletrodos.

1.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Pode-se considerar que a Espectrometria de Massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*) surgiu em 1897, quando Joseph John Thomson iniciou experimentos envolvendo raios catódicos. Thomson observou uma deflexão do feixe de elétrons dentro de um tubo ao aplicar um campo elétrico. Esta pode ser considerada a primeira determinação da razão entre a massa e a carga (m/z) da história.

Em meados de 1919, Francis W. Aston construiu um equipamento capaz de separar íons a partir da diferença de suas massas. Aprimoramentos em seu equipamento permitiram que Aston identificasse espécies químicas com diferenças de massas de até 1%. Assim,

nascia a Espectrometria de Massas, e com ela, todas suas potencialidades. Posteriormente, Aston recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1922 por ter descoberto 212 isótopos de ocorrência natural.¹⁸

Com o avanço tecnológico das últimas décadas, MS tornou-se uma importante técnica de separação e quantificação de diferentes espécies. Um espectrômetro de massas é constituído basicamente por uma etapa de introdução de amostra, por uma fonte de ionização, um analisador capaz de selecionar os íons de interesse, um detector e um sistema de manipulação e apresentação dos dados. Na Figura 5 é apresentado, de forma simplificada, um diagrama de blocos com os componentes básicos de um MS.

Figura 5: Diagrama de blocos simplificado de um Espectrômetro de Massas. A- sistema de introdução de amostras (*Inlet*); B- fonte de ionização; C- analisador de íons; D- detector; E- sistema de manipulação e apresentação dos dados.

Desde a concepção da espectrometria de massas e seu uso na determinação de íons (empregando a razão m/z), foram desenvolvidas diferentes fontes de ionização, sendo sua escolha realizada em função das características da amostra.

Por muitos anos, a principal forma de produção de íons foi a ionização por elétrons, na qual a amostra vaporizada é diretamente introduzida na região de alto vácuo e bombardeada com elétrons. No entanto, esta técnica não é efetiva para trabalhos

envolvendo substâncias pouco voláteis ou termicamente instáveis, o que induziu o desenvolvimento de outras formas de produção de íons.

Atualmente, as fontes de ionização mais comuns são Ionização por Elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*), Ionização Química (CI, do inglês *Chemical Ionization*), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), Dessorção e Ionização por Laser Assistida por Matriz (MALDI, do inglês *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e Ionização por *Electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*).¹⁹⁻

22

Devido às características do acoplamento CE-MS, a ESI se apresentou como o método de ionização mais adequado, pois o mesmo permite a compatibilização do baixo fluxo proveniente da coluna capilar e opera à pressão atmosférica. O uso de uma sonda no acoplamento entre o capilar e o ESI permitiu o alinhamento do capilar de forma reprodutiva ao ser instalado no ESI, cabendo ao usuário apenas o ajuste longitudinal do capilar em relação à extremidade da sonda. A sonda do ESI utilizada pelo MS Agilent Série 6400 é apresentada na Figura 6.

Devido à diferença de potencial entre a ponta da coluna – que está em contato com uma agulha metálica conectada ao terra através do líquido auxiliar (*sheath liquid*) – e a entrada da fonte, surge um spray de gotículas eletricamente carregadas. Para facilitar o processo de formação de gotículas e dessolvatação, é utilizado o gás de nebulização aquecido. Em contato com o gás de nebulização, as microgotículas sofrem dessolvatações sucessivas, enquanto os íons formados são atraídos eletrostaticamente na entrada do MS.

Figura 6: Sonda do ESI utilizada no MS Agilent Série 6400. A- *sheath liquid*, B- gás de nebulização, C- coluna capilar, D- eletrodo interno, E- corpo da sonda.

Os analisadores de massas possuem a função de separar os íons de acordo com sua razão massa-carga. Embora existam diferentes tipos de analisadores, em CE-MS é comum o uso de analisadores tipo quadrupolo. Devido à simplicidade e custo relativamente baixo, este tipo de analisador tornou-se muito popular. O quadrupolo é constituído de 4 barras metálicas paralelas dispostas em pares. São aplicados potenciais DC entre polos opostos (corrente contínua) modulados por um sinal de rádio frequência (RF). Enquanto um par de barras é mantido em potencial positivo, o outro par é mantido em potencial negativo. A razão entre a RF e o potencial DC permite que o analisador selecione os íons m/z que estejam em ressonância com o campo elétrico aplicado. Os íons que não se encontrarem em ressonância são descartados através do sistema de evacuação.⁴

Em geral, os detectores utilizados em um MS são projetados para registrar as correntes elétricas descarregadas pelos íons que alcançam e colidem contra o mesmo. Entre os detectores, podem se destacar o copo de Faraday e os detectores baseados em multiplicação de elétrons (EM, do inglês *Electron Multiplier*).

O copo de Faraday, como o próprio nome sugere, consiste de um detector metálico que se assemelha a um copo. Devido à sua simplicidade e custo, este tipo de detector foi utilizado por décadas. Os EM são detectores capazes de multiplicar a corrente gerada por um íon tal como uma fotomultiplicadora faria com os fótons em um sistema óptico. Devido a seu baixo limite de detecção e maior eficiência no chaveamento de sua polaridade para detecção de cátions e ânions durante as análises, os EM são os detectores mais utilizados em MS nas últimas décadas.

1.2.1 MONITORAMENTO DE ÍON SELECIONADO (SIM) E MONITORAMENTO DE REAÇÕES MÚLTIPLAS (MRM)

O Monitoramento de Íon Seleccionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*) é um modo de operação em que o detector monitora apenas um valor de m/z pré-definido. Este monitoramento seletivo permite que no modo SIM se realize um número maior de ciclos de medição por unidade de tempo elevando a sensibilidade do método, quando comparado com um modo SCAN que monitora todas as razões m/z contidas em um intervalo do espectro. Portanto, é comum o uso do modo SIM em métodos onde se deseja resultados quantitativos. No entanto, o modo SIM não se aplica eficientemente em amostras complexas que podem conter vários componentes que resultem em um mesmo valor de m/z .

O Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*) se refere a uma técnica que equivale a dois MS em série (MS/MS). Um esquema simplificado de um triplo quadrupolo que permite o uso do modo MRM é apresentado na Figura 7.

Figura 7: Esquema simplificado de um triplo quadrupolo operando em modo MRM. Q1- Primeiro quadrupolo, onde ocorre a separação primária de íons de um determinado valor de m/z ; Q2- Segundo quadrupolo, onde ocorre a dissociação induzida por colisão do íon selecionado em Q1; Q3- Terceiro quadrupolo responsável pela separação dos fragmentos formados em Q2.

O primeiro quadrupolo é responsável por uma separação prévia do analito de interesse de outras espécies. Nesta etapa apenas as espécies com uma determinada m/z são encaminhadas para o segundo quadrupolo. No segundo quadrupolo ocorrem reações de dissociação induzidas por colisão com moléculas neutras, por exemplo N_2 , (CID, do inglês *Collision Induced Dissociation*). As reações provocadas pela CID dependem da estrutura e da massa molecular do analito. Algumas ligações da molécula a ser analisada se quebram formando fragmentos característicos da mesma, e estes fragmentos são encaminhados ao terceiro quadrupolo para seleção de um dos produtos formados de acordo com um novo valor de m/z . Considerando que a energia necessária para promover dissociações de ligações por colisão é característica da molécula de interesse, na ausência da mesma não haveria o sinal de seu respectivo fragmento. Portanto, o modo MRM confere à MS uma melhora significativa da seletividade.

1.3 ACOPLAMENTO CE-MS UTILIZANDO ESI

Como em qualquer método acoplado, o objetivo a hifenação do CE com o MS é aproveitar as melhores características de cada técnica de modo a se complementarem. Os primeiros estudos remontam à década de 80 onde Olivares *et al.* relataram pela primeira vez o uso da MS como detector para CE.²³ Esse acoplamento proporciona uma elevada capacidade de separação obtida através da CE somada à elevada sensibilidade e seletividade proveniente da MS.

Apesar do acoplamento CE-MS ser eficiente, o mesmo apresenta características que não permitem que as mesmas condições de análise praticadas exclusivamente por CE sejam aplicadas. Particularidades como o comprimento da coluna de separação e o condicionamento térmico da mesma continuam pouco exploradas.

Em uma análise realizada por CE, o comprimento da coluna capilar varia entre 20 e 100 cm de acordo com o arranjo experimental. No entanto, devido aos procedimentos de manutenção e limpeza do ESI e do MS, o fabricante recomenda uma distância mínima de 30 cm entre o MS e o CE.²⁴ Esta necessidade resulta em colunas capilares que podem alcançar 120 cm de comprimento em alguns casos. Consequentemente o comprimento maior e desnecessário do capilar provoca o aumento indesejável do tempo de migração das espécies. Em casos onde o analito é relativamente instável, o aumento da coluna capilar aumenta a possibilidade de degradação da espécie química e, consequentemente, a impossibilidade de realizar a análise utilizando CE-MS. Adicionalmente, quanto mais longo o capilar, menor o campo elétrico gerador pelo máximo potencial de separação aplicado pela fonte de alta tensão.

Outro problema inerente ao CE-MS é o condicionamento térmico de parte do capilar que permanece externo aos equipamentos. Uma imagem de um capilar montado em um equipamento de CE-MS da Agilent é apresentada na Figura 8. Observa-se que uma porção considerável do capilar permanece fora dos equipamentos em um ambiente dependente apenas do controle térmico do laboratório.

Figura 8: Acoplamento típico de um CE Agilent 7100 a um MS Agilent 6430 com destaque para o capilar posicionado externamente aos equipamentos, A;. B – equipamento de CE; C – espectrômetro de massas.

Em uma separação por CE, o controle da temperatura é fundamental para a eficiência da separação e para estabilidade térmica de alguns analitos. No entanto, o CE-MS Agilent apresentado não dispõe de uma solução eficaz para o condicionamento térmico para a região da coluna capilar que permanece externa ao equipamento de CE. Da forma como o acoplamento C-MS foi concebido, o mesmo depende do controle térmico rigoroso da sala, o que dificilmente é obtido através dos equipamentos de ar condicionado comumente utilizados em laboratórios. Diante destas limitações, faz-se necessária uma adequação visando possibilitar um melhor controle térmico e a redução da coluna capilar no respectivo acoplamento.

1.4 DESENVOLVIMENTO DE INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA UTILIZANDO IMPRESSÃO 3D.

Em 1984, Chuck Hull desenvolveu a primeira impressora 3D. O primeiro protótipo da impressora utilizava a técnica de estereolitografia, onde um feixe de laser era utilizado para promover a fotopolimerização do material empregado na produção das peças. Apesar de ser uma tecnologia extremamente inovadora, devido às limitações técnicas da época, a impressão de uma peça poderia durar cerca de 6 a 8 semanas.²⁴⁻²⁶ No final da década de 80, o inventor S. Scott Crump desenvolveu a primeira impressora por fusão de filamentos poliméricos (FDM do inglês *Fused Deposition Modeling*).²⁶

No entanto, as impressoras 3D começaram a se popularizar entre os usuários domésticos através do projeto RepRap (*Replicating Rapid-prototyper*) criado em 2004.²⁷ O RepRap se trata de um projeto *open source* criado por Adrian Bowyer, que permite que diferentes desenvolvedores entusiastas ou curiosos possam montar e aprimorar suas próprias impressoras a um baixo custo (cerca de 15% do valor de uma impressora 3D profissional) e compartilhar suas informações.

Além dos fóruns de discussão promovidos por colaboradores do projeto RepRap, entre outros, estudos acadêmicos têm contribuído com o aprimoramento da impressão 3D ampliando cada vez mais suas potencialidades no meio acadêmico.²⁸⁻³¹ Em virtude do desenvolvimento continuado das impressoras, este recurso de prototipagem rápida tem sido utilizado cada vez mais junto aos grupos de pesquisa.³²⁻³³

Uma impressora 3D caseira é apresentada na Figura 9. Geralmente, uma impressora 3D é constituída basicamente por um sistema cartesiano tridimensional (representado por x, y e z), uma cabeça de impressão (podendo ser uma extrusora para filamentos ou um laser para fotopolimerização), uma mesa de impressão e um circuito microcontrolado para gerenciamento da máquina.

Figura 9: Impressora 3D caseira projetada para impressão utilizando filamentos poliméricos. A- extrusora para filamentos poliméricos; B- mesa de impressão; C- interface microcontrolada e D- bobina de filamento polimérico.

Diversos tipos de materiais podem ser empregados na construção de um objeto a partir da impressão 3D. Dentre os materiais disponíveis para impressoras que utilizam filamentos termoplásticos, destacam-se o ABS (do inglês, *Acrylonitrile Butadiene Styrene*), o PLA (do inglês, *Polylactic Acid*) e o TPU (do inglês, *Thermoplastic Polyurethane*).

O ABS apresenta razoável resistência ao atrito, resistência a elevadas temperaturas e a esforços mecânicos. No entanto, ocorre contração considerável ao ser resfriado resultando em alterações das dimensões do objeto logo após a impressão. Possui resistência química suficiente para diversas aplicações em laboratório que envolva meio aquosos, porém, apresenta baixa resistência a solventes orgânicos como acetona, metiletilcetona e acetato de etila. O uso de câmaras de vapor de acetona e outros solventes é comum durante a fase de acabamento das superfícies.³⁴⁻³⁶ A colagem das peças pode ser feita com colas a base de resinas epóxi e cianoacrilato, porém as mesmas podem ser soldadas utilizando solventes orgânicos como, por exemplo, acetato de etila.

O PLA apresenta baixa resistência ao atrito e a esforços mecânicos. No entanto, apresenta pouca contração após o processo de impressão. Devido à sua considerável higroscopicidade, o PLA não é indicado para aplicações onde o objeto entre em contato contínuo com água. Por outro lado, o PLA apresenta razoável resistência química a alguns solventes orgânicos. Assim, como o ABS, a colagem das peças produzidas em PLA pode ser realizada utilizando colas à base de resinas epóxi e cianoacrilato, no entanto, sua soldagem com solventes orgânicos é limitada.

OBJETIVOS

O objetivo desta tese é aprimorar a técnica de eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) através das seguintes inovações: (1) inclusão de duplo sistema de detecção condutométrica sem contato no capilar de separação; (2) aprimoramento do sistema de controle de temperatura da coluna capilar, com vistas a aumentar a reprodutibilidade da separação eletroforética; e (3) modificações da configuração que permitam a utilização de capilares curtos, dando maior liberdade à realização de separações rápidas e de espécies instáveis.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que os objetivos sejam alcançados será necessário: (1) interfacear um sistema com dois C^4Ds ao acoplamento CE-MS; (2) avaliar, através de estudos com diferentes eletrólitos de corrida e analitos, o sistema de dupla detecção por C^4D junto ao acoplamento CE-MS; (3) estabelecer condições de controle térmico do capilar ao longo de toda sua extensão; (4) avaliar o impacto causado pelo controle térmico do capilar em espécies termicamente instáveis analisadas por CE-MS e (5) desenvolver um sistema que permita o ajuste de posicionamento de um dos equipamentos sem que as condições de análise intrínsecas à CE-MS sejam comprometidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.6 DESENVOLVIMENTO INSTRUMENTAL

Durante a construção da plataforma deslizante para o CE, do bloco de termostatização e do cartucho para CE-(C⁴D)²-ESI-MS, foram utilizados processos de usinagem (fresagem, furação e torneamento) e técnicas de fabricação digital (corte de peças poliméricas por laser de CO₂ e impressão 3D utilizando ABS e TPU).

Os processos de usinagem foram desenvolvidos utilizando um micro torno mecânico universal Polacchini modelo PM94 (Polacchini Metalúrgica, Americana, SP) e uma fresadora Saupe Prazision modelo 450BF (Limbach-Oberfrohn, Alemanha).

A fabricação digital contou com uma máquina de corte a laser de CO₂ (Gravotech, Duluth, GA, EUA) e uma impressora 3D Prusa Mendel (Movtech Indústria e Comércio de Tecnologia, São Bernardo do Campo, SP) derivada do projeto *open source* RepRap.

As peças impressas foram projetadas com auxílio do software de desenho 3D Inventor Professional 2015 (AutoDesk, San Rafael, CA, EUA). Após a conclusão do desenho o arquivo obtido foi preparado pelo software de “fatiamento” Cura 15.04.4 (Ultimaker, Geldermalsen, Holanda) para posteriormente ser impresso em 3D.

A impressora 3D utilizada imprime objetos por meio de aquecimento de filamentos poliméricos de 1,75 mm de diâmetro. O aquecimento do filamento ocorre por meio de um bico extrusor aquecido com diâmetro interno de 0,42 mm. O polímero extrudado é depositado ordenadamente sobre uma mesa de impressão aquecida. Na Tabela 1, os principais parâmetros de impressão inseridos através do programa Cura são apresentados.

Tabela 1: Principais parâmetros de configuração para impressão

Parâmetros de impressão	Valores	Unidades
Altura da camada	0,2	mm
Espessura lateral	0,84	mm
Espessura da base e do topo	1	mm
Densidade de preenchimento	20	%
Velocidade de impressão	30	mm/s
Temperatura de impressão	230	°C
Temperatura da mesa de impressão	110	°C
Fluxo de material	96	%
Fluxo da camada inicial	150	%
Sobreposição de impressões	0,2	mm

A soldagem de peças impressas em ABS foi realizada com acetato de etila obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

1.6.1 PLATAFORMA DESLIZANTE PARA O EQUIPAMENTO DE CE

Durante a construção da plataforma deslizante, foram utilizadas chapas de alumínio de 3 mm de espessura, 4 corrediças de 40 cm com capacidade para 60 kg utilizadas como guias lineares, parafusos e chapas de PMMA de 6 mm cortadas a laser. A Figura 10 apresenta um esboço da plataforma construída e utilizada durante os experimentos.

Figura 10: Esboço da plataforma deslizante para o equipamento de CE. 1-Vista frontal e 2- Vista superior; a-base de alumínio deslizante, b-guias lineares, c-base de sustentação de alumínio, d-chapas de PMMA para estabilização do equipamento.

1.6.2 OTIMIZAÇÃO E INTERFACEAMENTO DO C⁴D AO ACOPLAMENTO CE-MS

O detector C⁴D utilizado no presente trabalho foi desenvolvido durante o projeto de mestrado e publicado em 2009.¹⁴ Para o efetivo interfaceamento do C⁴D ao CE-MS foi necessário realizar algumas atualizações no processo de confecção e no controle de sincronização com dispositivos externos (*trigger*). As atualizações realizadas mantiveram todas as características eletrônicas e analíticas conforme apresentado pelos autores em 2009.

Em substituição à microcontroladora (MCU) ATmega 168 (Atmel, San José, CA, US), utilizou-se a microcontroladora ATmega32U4 produzida pelo mesmo fabricante e distribuída através do projeto *Teensy*.³⁷

A atualização do *firmware*^a foi realizada utilizando o ambiente de desenvolvimento integrado, IDE (do inglês, *Integrated Development Environment*) desenvolvido pelo projeto Arduino.³⁸

^a Software gravado na MCU e que gerencia o C⁴D

Um novo *frontend*^b foi desenvolvido em linguagem gráfica utilizando a IDE LabVIEW desenvolvido por National Instruments (Austin,TX,US).

1.6.3 MÓDULO DE REFRIGERAÇÃO

Para a construção do módulo de refrigeração (MR) foram utilizadas chapas de PMMA de 6 mm de espessura cortadas a laser de CO₂, uma grade de alumínio (160x120 mm), um refrigerador a líquido Corsair Hydro Series modelo CPU H55 (Corsair Memory, Fremont, CA, EUA), parafusos de aço inox com rosca M3 e comprimentos variando entre 5 mm e 20 mm dependendo do ponto de fixação, tubo de cobre de 3/8" de diâmetro, conexões de engate rápido para tubos de 4 mm, mangueira de silicone de 10 mm de diâmetro interno, presilha metálica para caixa de transporte e espumas de polietileno expandido de 6 mm de espessura.

O controle térmico do módulo foi realizado com auxílio de um de banho de recirculação termostatizado Marconi modelo MA-184 (Marconi, Piracicaba, SP). O ar comprimido foi obtido de um compressor de ar Schultz modelo Bravo CSL 10 BR/100L.

Os experimentos que envolvem o uso do módulo de refrigeração foram executados com um capilar de 75 µm e 360 µm de diâmetro interno (d.i.) e externo (d.e.), respectivamente, com 60 cm de comprimento. A temperatura da sala foi mantida a 23 °C e as temperaturas do banho ultratermostático e do interior do equipamento de eletroforese foram mantidas a 25°C. Variou-se os potenciais de separação de 1 a 27 kV e mediu-se a corrente do sistema.

^b Programa de computador que funciona como interface gráfica entre o usuário e a MCU

Figura 11: Imagem das partes internas que constituem o módulo de refrigeração. 1- Esquema ilustrativo das partes internas do módulo e 2- Foto do interior no módulo (vista superior) destacado em vermelho; A-módulo de termostatização, B-serpentina, C-radiador, D-ventoinha, E-coluna capilar, F-acoplamento capilar/tubo de ar comprimido, G-tubo de PU 4 mm para entrada de ar frio junto à coluna capilar, H-cartucho auxiliar para CE confeccionado em PMMA, I-sonda do ESI, J-sheath liquid, K-gás de nebulização, L-tubo de silicone para retorno de ar quente após o contato com a coluna capilar, M-acoplamento de PVC que permite o retorno do ar insuflado através do tubo de PU.

1.6.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO CARTUCHO PARA CE-(C⁴D)²-ESI-MS

O cartucho para o acoplamento CE-(C⁴D)²-MS foi desenvolvido em ABS empregando a técnica de impressão 3D com soldagem de peças com acetato de etila. Peças elastoméricas impressas foram confeccionadas utilizando filamento de TPU (do inglês, *Thermoplastic polyurethane*) obtido a partir do site AliExpress.³⁹

Durante todo experimento de avaliação do cartucho, a temperatura da sala foi mantida a 23 °C. As temperaturas do banho termostático e do interior do equipamento de CE foram mantidas a 20 °C. Em todos os modos de termostatização avaliados, utilizou-se capilar de 75 µm d.i. e 360 µm d.e., com 60 cm de comprimento. O potencial de separação foi avaliado de 2 a 28 kV e monitorou-se corrente gerada no sistema.

Foram realizadas corridas em CE-DAD (para o cartucho exclusivo para CE), em CE-MS utilizando o cartucho fornecido pelo fabricante para uso neste tipo de acoplamento e o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS com ventilação forçada proveniente do próprio equipamento de eletroforese capilar.

De modo a obter uma corrente eletroforética elevada, utilizou-se uma solução de (NH₄)₂CO₃ 50 mM como eletrólito no experimento que procura avaliar o efeito do aquecimento Joule. Para os testes envolvendo o acoplamento CE-ESI-MS, o *sheath liquid* foi preparado diluindo 5 % do eletrólito diluído em solução 1:1 (v/v) metanol/água. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada 18 MΩ·cm (Milli-Q Direct, Millipore, Molsheim, França).

1.6.5 ESTUDO COMPARATIVO DA FAIXA LINEAR PARA C⁴D E MS

Foram preparadas soluções padrão de ácido nicotínico e MES em concentrações 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 e 78 µmol L⁻¹. Os analitos foram analisados utilizando uma solução TEA 30 mmol L⁻¹ (pH 11,6) como eletrólito de corrida. O *sheath liquid* utilizado no *electrospray* foi preparado a partir da solução tampão diluída 5 vezes em uma solução 1:1

(v/v) metanol/água. Os reagentes foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Utilizou-se capilar de sílica fundida com 80 cm de comprimento, 50 µm d.i., 360 µm d.e. (Agilent Technologies, Redmond, OR, EUA). Os dois C⁴Ds foram posicionados a 25,6 e 65,5 cm, respectivamente. A coluna capilar foi condicionada passando NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 10 min, água deionizada (10 min) e, por fim, tampão durante 10 min. Os padrões foram injetados a 100 mbar de pressão por 20 s e a separação foi realizada aplicando +25 kV.

Para auxiliar a formação do *electrospray*, utilizou-se N₂ (4 L min⁻¹) ajustado à temperatura de 120 °C e à pressão de 10 psi.

O MS foi programado para operar em modo SIM. Foram monitorados, em modo negativo, $m/z = 194$ para MES (célula de colisão a 3 V), $m/z = 160,9$ para TCA (célula de colisão a 3 V) e $m/z = 122$ para nicotinato (célula de colisão a 4 V). O *dwell* foi ajustado em 200 ms.

1.7 ANÁLISES POR CE-MS E CE-C⁴D-MS

As análises foram realizadas utilizando um equipamento de eletroforese capilar Agilent 7100 acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo Agilent 6430 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com fonte de ionização do tipo ESI.

Os tempos de migração, área e largura de pico a meia altura foram calculados utilizando o programa Mass Hunter Qualitative Analysis B.06.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os tempos de migração e a área dos picos dos eletroferogramas obtidos por C⁴D foram calculados usando OriginPro 8.0 SR0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

A temperatura do amostrador automático do CE foi mantida igual à de separação com auxílio de um banho ultratermostatizado. Os experimentos que necessitaram de análise por CE-MS foram realizados utilizando capilares de sílica fundida de 360 µm d.e. e 50 µm d.i. Colunas de comprimentos variados foram utilizadas.

Todas as soluções foram preparadas em água deionizada 18 MΩ cm obtida de um Milli-Q Direct (EMD Millipore, Billerica, MA, EUAS). O *sheathliquid* utilizado em cada experimento foi preparado diluindo 5 vezes o eletrólito de corrida em uma mistura 1:1 (v/v)

metanol/água. Utilizou-se nitrogênio 95,0 % de pureza como gás de nebulização obtido a partir de um gerador de nitrogênio Peak Serie Genius modelo NM32LA (Peak Scientific Instruments, Inchinnan, Escócia) e nitrogênio 99,999 % de pureza (Air Product Sand Chemicals Inc, São Paulo, SP, BR) no CID do MS. Os reagentes foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e os capilares da Agilent (Redmond, OR, EUA). Os capilares foram condicionados passando inicialmente 0.1 mol L^{-1} de NaOH por 10 min, seguido de água deionizada por 10 min e finalizando com o tampão de corrida por 10 min.

As condições de vazão do fluxo de gás nebulizador, pressão, temperatura, tensões de fragmentação, tensão do capilar de entrada, tensão da célula de aceleração e colisão foram otimizadas de acordo com cada experimento e serão discutidas posteriormente. Os detectores C^4D foram posicionados em diferentes regiões do capilar. Todos os experimentos foram realizados utilizando a plataforma deslizante desenvolvida de modo a permitir a aproximação dos equipamentos.

1.7.1 CANCELAMENTO DO FLUXO LAMINAR NO CAPILAR

Para o estudo de cancelamento do fluxo laminar (a ser discutido na Seção 4.1.4 do presente trabalho), foram preparadas soluções estoque de cafeína, ácido nicotínico e biftalato de potássio (100 mmol L^{-1} cada) em água deionizada. O tampão de corrida utilizado foi propionato de amônio (pH 9,2), preparado a partir de ácido propiônico 60 mmol L^{-1} e NH_4OH 120 mmol L^{-1} . Hidróxido de amônio e ácido propiônico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O *sheath liquid* foi preparado diluindo-se 10 vezes o tampão de corrida em uma solução 1:1 (v/v) metanol/água.

Utilizou-se capilar de sílica fundida de $75 \mu\text{m}$ d.i. e $360 \mu\text{m}$ d.e. com comprimento de 66 cm. As amostras foram injetadas a 50 mbar por 1 s. Durante as injeções de amostra na coluna capilar do CE, o gás de nebulização do ESI foi mantido desligado de modo a cancelar os efeitos da sucção durante a injeção. Após a etapa de injeção de amostra, 25 kV foi aplicado para separação e o gás de nebulização foi ativado novamente. A temperatura no interior do CE foi mantida a 25°C durante todo experimento, empregando o banho ultratermostatizado.

O gás de nebulização (N_2) foi mantido a 140 °C e ajustado em 5 psi a uma vazão de 2 L min⁻¹. O MS foi ajustado para operar em modo SIM. As razões m/z foram monitoradas em m/z 195 para a cafeína protonada (modo positivo), m/z 122 para nicotinato (modo negativo) e m/z 165 para biftalato (modo negativo). O *fragmentor* foi ajustado em 20 V, o *cell accelerator* em 3 V e o *dwell* a 200 ms.

1.7.2 ESTUDO CINÉTICO A TEMPERATURA CONTROLADA^c

Para o estudo cinético de monoetil carbonato (MEC), foram preparadas soluções contendo MEC, ácido tricloroacético (TCA), cafeína e bicarbonato nas concentrações 430 mmol L⁻¹, 13 µmol L⁻¹, 180 µmol L⁻¹ e 16 mmol L⁻¹, respectivamente. O MEC foi preparado adicionando etanol aos padrões de ácido tricloroacético, cafeína e bicarbonato. Após preparada a solução padrão, aguardou-se aproximadamente 2 horas (tempo necessário para a formação do MEC alcançar o equilíbrio).⁴⁰

A solução tampão foi preparada pela mistura de ácido propiônico 10 mmol L⁻¹ e NH_4OH 20 mmol L⁻¹ (pH 9,2). O *sheath liquid* utilizado no *electrospray* foi preparado pela diluição 1:20 (v/v) do tampão em uma solução 1:1 (v/v) de metanol e água. O sal de $NaHCO_3$ e a solução de NH_4OH foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Utilizou-se capilar de sílica fundida com 58 cm de comprimento, 50 µm d.i. e 360 µm d.e. As injeções foram realizadas hidrodinamicamente durante 20 s a 100 mbar. As análises foram realizadas aplicando 23 kV. Adicionalmente, uma pressão -37 mbar foi aplicada durante as análises para minimizar os efeitos da sucção provocada pelo *electrospray*.

Sua temperatura interna mantida sob as mesmas condições do banho ultratermostatizado e do interior do equipamento de CE. O experimento foi realizado variando a temperatura do sistema de 16 a 34 °C.

Para auxiliar a formação do *electrospray*, utilizou-se N_2 (4 L min⁻¹) ajustado à temperatura de 120 °C e à pressão de 15 psi. O MS foi programado para operar em modo MRM, a tensão do capilar de entrada foi ajustada em 4 kV, o *fragmentor* em 20 V, a tensão

^c O presente estudo foi realizado utilizando o módulo de refrigeração desenvolvido no presente trabalho.

de aceleração da cela em 3 V, a tensão da cela de colisão em 0 V e o tempo de varredura a 200 ms. A pressão do ar comprimido utilizado no sistema de termostatização foi ajustado em 60 psi e o fluxo em 6 L min⁻¹.

1.7.3 CONTROLE DE TEMPERATURA E ESPÉCIES TERMICAMENTE INSTÁVEIS

O soluções, inclusive o MEC, foram preparadas como descrito na seção anterior, 3.2.2.

Os compostos foram analisados utilizando solução tampão composta de propionato de amônio (pH 9,3). O *sheath liquid* utilizado no *electrospray* foi preparado diluindo a solução tampão (1:5 v/v) em solução 1:1 (v/v) metanol/água. Utilizou-se um capilar de sílica fundida com 80 cm de comprimento, 50 µm d.i., 360 µm d.e.

O experimento foi dividido em 3 etapas. A primeira etapa consistiu nas separações (em triplicata) dos analitos utilizando o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS desenvolvido neste estudo. A segunda etapa foi realizada de forma similar à anterior, porém o capilar foi acondicionado no acoplamento utilizando o cartucho fornecido pelo próprio fabricante dos equipamentos. A terceira etapa contou com a mesma montagem anterior, porém utilizou-se um pequeno ventilador direcionado ao capilar.

A temperatura do CE foi mantida a 20 °C durante todo experimento. Com auxílio do ar condicionado do próprio laboratório, a sala foi mantida a 23 °C. Os padrões foram injetados a 100 mbar por 20 s, e as separações realizadas a +28 kV.

Para auxiliar a formação do *electrospray* e na evaporação de solvente e eletrólito, utilizou-se nitrogênio (4 L min⁻¹) ajustado à temperatura de 120 °C e à pressão de 10 psi. O MS foi programado para operar em modo SIM com o potencial do ESI foi ajustado a 4,0 kV. A razão *m/z* foi monitorada em modo negativo sendo *m/z* 194 para MES (célula de colisão a 3 V), *m/z* 122 para nicotinato (célula de colisão a 4 V) e *m/z* 89 para MEC (célula de colisão a 4 V). O tempo de varredura foi ajustado em 200 ms.

1.7.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR CE-(C⁴D)²-ESI-MS

Soluções padrão de mio-inositol, ribose, galactose e galacturonato de sódio foram preparadas a 1,0 mmol L⁻¹. O eletrólito utilizado foi trietilamina (TEA) 30,0 mmol L⁻¹ (pH 11,2). O *sheath liquid* utilizado no *electrospray* foi preparado diluindo o eletrólito (1:5 v/v) em solução 1:1 (v/v) metanol/água. Utilizou-se capilar de sílica fundida com 80 cm de comprimento, 50 µm d.i., 360 µm d.e. Os dois C⁴Ds foram posicionados a 46 e 67 cm, respectivamente.

Os experimentos foram conduzidos empregando o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS desenvolvido. A temperatura interna do cartucho e do equipamento de CE foi mantida a 20 °C. Para auxiliar a formação do *electrospray* e na evaporação de solvente e eletrólito, utilizou-se nitrogênio (6 L min⁻¹) ajustado à temperatura de 200 °C e à pressão de 10 psi.

O MS foi programado para operar em modo MRM. Os padrões foram injetados a 100 mbar durante 15 s e as separações foram realizadas aplicando +29 kV com o potencial do ESI ajustado a -4,5 kV. A separação por CE foi realizada a 20 °C. O tempo de varredura foi ajustado em 50 ms. As transições foram monitoradas em modo negativo sendo *m/z* 193 → 113 para galacturonato (célula de colisão a 10 V), *m/z* 179 → 89 para galactose (célula de colisão a 5 V) e *m/z* 179 → 87 para inositol (célula de colisão a 17 V).

1.7.5 DETECÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CE-(C⁴D)²-ESI-MS

Soluções padrão de 1,7-diaminoheptano, putrescina, triptamina e 2-feniletilamina foram preparadas a 50 µmol L⁻¹. As aminas foram analisadas usando ácido acético 500 mmol L⁻¹ (pH 2,0) como eletrólito de corrida. O *sheath liquid* utilizado no *electrospray* foi preparado diluindo o eletrólito (1:5 v/v) em solução 1:1 (v/v) metanol/água. Um capilar de sílica fundida com 78 cm de comprimento, 50 µm d.i., 360 µm d.e. foi utilizado.

Os dois C⁴Ds foram posicionados a 43 e 65 cm, respectivamente. O presente estudo foi realizado o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS desenvolvido. A temperatura interna do cartucho e do equipamento de CE foi mantida a 20 °C. Os padrões foram injetados a 50 mbar durante 10 s

e as separações realizadas a +25 kV. Para auxiliar a formação do *electrospray*, utilizou-se nitrogênio (8 L min⁻¹) ajustado à temperatura de 150 °C e à pressão de 12 psi.

O MS foi programado para operar em modo MRM, com o potencial do ESI ajustado a 4,0 kV. O tempo de varredura foi ajustado em 50 ms. As transições foram monitoradas em modo positivo sendo m/z 161 → 144 para triptamina (célula de colisão a 8 V), m/z 131 → 130 para 1,7-diaminoheptano (célula de colisão a 0 V), m/z 122 → 105 para 2-feniletilamina (célula de colisão a 8 V) e m/z 89 → 72 para putrescina (célula de colisão a 8 V).

1.7.6 DETECÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS POR CE-(C⁴D)²-ESI-MS

Soluções estoque de ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e ácido nicotínico foram preparadas a 10 mmol L⁻¹. Uma alíquota de cada solução estoque foi obtida e diluída de modo a obter a concentração de 200 µmol L⁻¹ para cada ácido. Os ácidos carboxílicos foram analisados em meio neutro. Utilizou-se bicarbonato de trietilamônio como eletrólito de corrida, sendo o mesmo preparado a partir do borbulhamento de CO₂ (Air Products and Chemicals, São Paulo, SP, BR) em uma solução de TEA 30 mM até atingir o pH 7,5.

Utilizou-se uma capilar de sílica fundida recoberto internamente com PVA com 78 cm de comprimento, 50 µm d.i. e 360 µm d.e. Os dois C⁴Ds foram posicionados a 12 e 65 cm do ponto de injeção, respectivamente.

Os experimentos foram realizados utilizando o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS desenvolvido. A temperatura interna do cartucho e do equipamento de CE foi mantida a 20 °C. Os padrões foram injetados a 50 mbar durante 30 s e as separações conduzidas aplicando -25 kV.

Para auxiliar a formação do *electrospray*, utilizou-se nitrogênio (8 L min⁻¹) ajustado a temperatura de 150 °C e à pressão de 12 psi.

O MS foi programado para operar em modo MRM, com o potencial do ESI ajustado a -4,0 kV e o tempo de varredura foi ajustado em 200 ms. Foram monitorados, em modo negativo, os íons a m/z 122, 89, 59 e 45, para nicotinato, lactato, acetato e formiato, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões apresentados a seguir, serão subdivididos em três seções: (4.1) aprimoramentos do sistema CE-ESI-MS, (4.2) implementação do sistema de dupla detecção CE-(C⁴D)²-ESI-MS e (4.3) aplicações da mesma em diferentes condições de análise.

O aprimoramento do sistema CE-ESI-MS foi obtido inicialmente através da construção de uma plataforma deslizante que permitiu estabelecer de forma reprodutiva a distância entre os equipamentos. A partir desta reprodutibilidade foi possível aplicar um sistema preliminar de controle térmico, o módulo de refrigeração, que posteriormente evoluiu para um moderno cartucho desenvolvido para aplicações CE-(C⁴D)²-ESI-MS, descrito na segunda seção. Embora vantajoso, os efeitos de seu uso foram verificados devido à diferença de altura que a mesma provocava quando comparada com a montagem original realizada pelo fabricante dos equipamentos, portanto estudos envolvendo o cancelamento do fluxo laminar também serão descritos na seção 4.1.

A seção 4.2 tratará da implementação do sistema de dupla detecção por C⁴D ao acoplamento CE-MS. Serão discutidos o sincronização da aquisição de dados por meio do C⁴D, o desenvolvimento do cartucho aplicado à CE-(C⁴D)²-ESI-MS e estudos comparativos entre as soluções de controle térmico disponíveis em um sistema CE-MS padrão e o utilizando o cartucho desenvolvido no presente trabalho.

Por fim, porém não menos importante, a seção 4.3 demonstrará o grande potencial deste aprimoramento da técnica por meio de aplicações práticas em diferentes condições de análise utilizando conceitos e recursos técnicos desenvolvidos.

1.8 APRIMORAMENTOS DO SISTEMA CE-MS

Esta seção discutirá os recursos desenvolvidos para se obter melhores resultados do acoplamento CE-MS através do uso de menores colunas capilares e do controle apropriado da temperatura do capilar.

1.8.1 PLATAFORMA DESLIZANTE

A montagem do acoplamento CE-MS apresenta limitações intrínsecas a cada equipamento. Uma característica significativa durante a montagem do acoplamento CE-MS é a distância mínima entre os equipamentos.

O CE não apresenta grandes limitações, pois o analista acessa o interior do equipamento para a instalação da coluna capilar ou mesmo limpeza através da parte superior do equipamento. No entanto, o acesso ao interior do ESI instalado na entrada do MS requer acesso através da lateral voltada para o CE. Portanto, devido a esta necessidade instrumental, nos pré-requisitos de instalação do MS, o fabricante recomenda uma distância de 30 cm entre os equipamentos de CE e MS, Figura 10.²⁴ Esta distância é necessária para que eventuais procedimentos de limpeza e manutenção do ESI possam ser realizados sem a necessidade de remoção do equipamento de CE. Esta distância entre os equipamentos se faz necessária apenas durante eventuais intervenções. Portanto, a distância recomendada pode ser desconsiderada durante as análises.

Figura 10: Distância entre os equipamentos de CE e MS, onde C representa o capilar saindo do CE e entrando no ESI do MS e L representa a distância de 30 cm recomendada pelo fabricante dos equipamentos para eventuais manutenções do MS.

Conforme a Figura 10, parte da coluna capilar fica exposta ao ambiente externo dos equipamentos. Esta configuração de montagem compromete o controle térmico da coluna capilar e impede o uso de colunas com comprimentos menores. O primeiro passo para solucionar estes problemas foi o uso de uma plataforma deslizante.

A construção da plataforma envolveu o uso de materiais facilmente encontrados no mercado local, tais como corredeiras e chapas de alumínio. A Figura 11 apresenta a montagem da plataforma e suas partes fundamentais. A montagem final eleva o CE em 22 mm de altura. Os efeitos da altura final obtida serão discutidos posteriormente.

Este desenvolvimento contou predominantemente com processos de fabricação clássica de corte, fresagem e furação das chapas de alumínio de 3 mm (**a** e **c**). Chapas de acrílico (PMMA) de 6 mm cortadas a laser (**d**) foram utilizadas para estabilização do CE durante o deslocamento. O mecanismo de deslocamento foi baseado no uso de 4 corredeiras de 300 mm de comprimento com capacidade de 60 kg (**b**) fixadas por porcas e parafusos de aço inox de com rosca M5 por 10 mm de comprimento.

Figura 11: Plataforma deslizante construída para permitir o deslocamento linear do CE durante os procedimentos de limpeza e manutenção do MS. A- Esboço da montagem da plataforma, B- CE posicionado sobre a plataforma deslizante durante uma análise, a- base de alumínio deslizante, b-guias lineares, c- base de sustentação de alumínio, d- chapas de PMMA para estabilização do CE, 1 e 2, vistas frontal e superior, respectivamente.

Portanto, utilizando a plataforma deslizante, o CE pôde ser aproximado a 6 mm do MS durante a operação e afastado a uma distância de 40 cm durante a manutenção (10 cm além da distância mínima de 30 cm sugerida pelo fabricante).²⁴

A redução da distância entre os equipamentos durante a operação permitiu que metodologias dependentes de capilares com comprimentos menores pudessem ser utilizadas. Usualmente, o comprimento de um capilar utilizado com o equipamento de CE-MS varia entre 80 e 120 cm. Com o auxílio da base deslizante, colunas capilares com comprimento mínimo de 50 cm se tornaram opção nos estudos posteriores.

O uso da plataforma permitiu reposicionamento reproduzível e, consequentemente, o a redução da distância entre o CE e o MS sem a necessidade de movimentar os equipamentos de forma brusca, como o arrastamento ou o levantamento do CE. Estabelecido um modo de deslocar o CE de forma segura e fácil sobre a bancada, a plataforma também possibilitou o desenvolvimento de dispositivos e estratégias para o condicionamento térmico de capilares, tais como o módulo de refrigeração e o cartucho para CE-(C⁴D)²ESI-MS desenvolvidos no presente trabalho.

1.8.2 MÓDULO DE REFRIGERAÇÃO

Segundo Rogacs *et al.*, a viscosidade de soluções aquosas decresce aproximadamente 2 % por grau Celsius por volta da temperatura ambiente.⁸ Esta variação se reflete diretamente na mobilidade iônica das espécies químicas, pois a mobilidade depende da viscosidade do solvente.

Ao realizar uma análise com parte do capilar exposta às variações da temperatura do laboratório, a análise poderá apresentar perdas em reprodutibilidade por diferentes motivos, tais como a variação da viscosidade do eletrólito de corrida e a degradação térmica de alguma espécie. Diante destas observações, buscaram-se alternativas que permitissem o controle térmico durante a análise por CE-MS e o uso de capilares de diferentes comprimentos.

O módulo de refrigeração (MR) foi o primeiro protótipo desenvolvido. Com suas dimensões e montagem parcialmente independente dos equipamentos, o MR permitiu testes conceituais que estabeleceram parâmetros no desenvolvimento de protótipos posteriores.

O CE Agilent 7100 possui sistema de condicionamento térmico do capilar a ar forçado, no entanto, caso o analista necessite de controle térmico de seu amostrador rotatório, é necessária a instalação de um banho de recirculação. Durante os estudos, o CE utilizado contou com um banho de recirculação para tal finalidade. Portanto uma maneira prática e objetiva de realizar o controle térmico do módulo de refrigeração foi o uso do mesmo banho. Isto minimizaria a complexidade da montagem, dispensaria a necessidade de um sistema eletrônico de controle térmico e reforçaria o uso de recursos técnicos já disponíveis ao acoplamento CE-MS em estudo.

A estrutura do MR contou com chapas de acrílico de 6 mm de espessura coladas e parafusadas entre si. Estas chapas formaram uma caixa com uma tampa frontal localizada sobre a sonda do ESI. Devido à necessidade de minimizar as variações da temperatura interna, foram coladas mantas de espuma de polietileno de 6 mm em todo interior do MR. A tampa frontal permitiu a manipulação da sonda do ESI bem como abertura da câmara de ionização para eventuais operações de limpeza e manutenção na entrada do MS.

As partes internas que constituem o módulo de refrigeração são apresentadas na Figura 14. Um radiador **C** similar aos utilizados em refrigeração líquida de microprocessadores e uma ventoinha **D** foram posicionados internamente para troca de calor. Uma pequena serpentina de cobre **B** destinada a condicionar parcialmente o ar que circunda a coluna capilar **E**. Um tubo de poliuretano (PU) de 4 mm de diâmetro interno **G** conduz em seu interior a coluna capilar e um fluxo de ar responsável por sua refrigeração. Um tubo de silicone **L** de 11 mm de comprimento permite que o ar insuflado através do tudo de PU retorne até o interior do módulo. De modo a facilitar a adaptação dos tubos ao CE, foi desenvolvido um cartucho auxiliar **H** de PMMA.

Figura 12: Imagem das partes internas que constituem o módulo de refrigeração. A- módulo de termostatização, B- serpentina, C- radiador, D- ventoinha, E- coluna capilar, F- acoplamento capilar/tubo de ar comprimido, G- tubo de PU 4 mm para entrada de ar frio junto à coluna capilar, H- cartucho auxiliar para CE confeccionado em PMMA, I- sonda do ESI, J- *sheath liquid*, K- gás de nebulização, L- tubo de silicone para retorno de ar quente após o contato com a coluna capilar, M- acoplamento de PVC que permite o retorno do ar insuflado através do tubo de PU.

No interior do módulo, como mostrado na Figura 15, foi inserida uma grade metálica **O** que permitiu a imobilização da coluna capilar e o aterramento do lado externo do capilar, mantendo constante o campo elétrico radial, o que também aumenta a reprodutibilidade do EOF.⁴¹

Figura 13: Módulo de refrigeração. Em destaque um suporte para C^4D confeccionado em ABS. A- Módulo de refrigeração, H- cartucho auxiliar do módulo de refrigeração, N- banho ultratermostático, I- sonda do ESI com o suporte para C^4D acoplado e O- grade de aterramento da coluna capilar.

A eficiência do controle de temperatura depende diretamente da capacidade do banho de recirculação para manter a temperatura do sistema sob controle. O banho de recirculação permite o controle térmico do amostrador automático do CE e do módulo de refrigeração. O CE e o módulo de refrigeração possuem duas conexões específicas, sendo no

CE localizada no painel traseiro e no módulo de refrigeração no painel frontal, respectivamente.

Portanto, além do indicador de temperatura presente no painel frontal do banho de recirculação, sua temperatura pode ser indiretamente acompanhada através do monitor de temperatura do amostrador automático disponível no *software* MassHunter que controla e realiza a aquisição de dados do CE-MS.

Considerando que a temperatura do banho, do amostrador automático do CE e do ar comprimido foram mantidas a 25 °C, eventuais desvios da Lei de Ohm seriam influenciados diretamente pela capacidade do fluxo de ar frio remover o calor gerado durante uma análise.

A Figura 16 apresenta o comportamento do sistema em diferentes vazões de ar frio. Pode-se observar que, a baixos potenciais de separação, os valores das correntes não apresentam desvio significativo da linearidade. No entanto, à medida que os potenciais aumentam, os valores das correntes desviam da linearidade e, conseqüentemente, da Lei de Ohm, demonstrando que o sistema não remove eficientemente o calor gerado no capilar. Este desvio está intimamente ligado ao aquecimento Joule, pois quando manifestado intensamente, pode refletir nas mobilidades das espécies químicas, constantes de equilíbrio e mesmo na reprodutibilidade de um método de análise.

Devido à elevada concentração do eletrólito, NaCl 30 mM, observou-se que na ausência do fluxo de ar e acima de 10 kV o desvio da Lei de Ohm se torna mais significativo. O mesmo ocorre em tensões acima de 16 kV em vazões de 4 L min⁻¹. Ao ajustar a vazão para 6 L min⁻¹, os resultados não apresentaram desvio significativo em relação à linearidade prevista pela Lei de Ohm. Portanto, o uso de fluxo de ar resfriado demonstrou ser a opção mais simples e viável no desenvolvimento dos protótipos posteriores.

Figura 14: Comportamento da Lei de Ohm em função da vazão de ar frio utilizando o módulo de refrigeração.

Segundo o fabricante dos equipamentos, o CE foi otimizado para minimizar o aquecimento Joule durante as separações utilizando ar forçado e resfriado a uma velocidade de 10 m s^{-1} .⁹

O desenvolvimento do módulo de refrigeração permitiu o desenvolvimento dos estudos de cancelamento do fluxo laminar e do estudo cinético de MEC em condições de temperatura controlada, que serão descritos posteriormente.

Embora tenha favorecido os estudos acima citados, o cartucho auxiliar prejudicou a instalação de um C⁴D próximo ao ponto de injeção. Sua montagem necessitava de um compressor de ar comprimido, de um banho de recirculação e de mangueiras que transportavam fluido de refrigeração do banho ao interior do cartucho instalado sobre o MS. A partir dos resultados obtidos experimentalmente envolvendo o módulo de refrigeração e o controle térmico do CE utilizando fluxo de ar, considerou-se viável o desenvolvimento de um cartucho de dimensões mais reduzidas que permitisse o uso do controle térmico do CE no acoplamento CE-MS.

1.8.3 ESTUDO CINÉTICO A TEMPERATURA CONTROLADA

A determinação de constantes cinéticas e termodinâmicas de reações pode ser, em condições favoráveis, estabelecida também por eletroforese capilar.⁴² A utilização da espectrometria de massas como sistema de detecção nestes estudos traz todas as vantagens pertinentes à MS, tais como baixos limites de detecção, elevada seletividade e a possibilidade da caracterização do composto. No entanto, o acoplamento comumente apresentado pelos fabricantes destes equipamentos não atende às condições adequadas para estudos de espécies químicas termicamente instáveis como os monoalquilcarbonatos (MACs) ou hemiésteres do ácido carbônico (HECAs, do inglês, *Hemiesters of carbonic acid*).

Para o estudo dos HECAs utilizando a CE-MS, deve ser considerado que os longos capilares sem a termostatização utilizados em acoplamentos convencionais, ou seja, da forma como os fabricantes propõem, favorecem a hidrólise excessiva destes compostos, resultando, portanto, na redução da área dos picos dos HECAs.

Outro problema é a alteração da viscosidade do meio. A variação repentina da temperatura durante a análise altera viscosidade do meio e, por consequência, interfere na reprodutibilidade do método de análise.⁷⁻⁸ Com auxílio do módulo de refrigeração desenvolvido no presente trabalho e do banho ultratermostático, foi possível realizar um estudo cinético de monoetilcarbonato (MEC, do inglês, *Monoethyl Carbonates*) utilizando o acoplamento CE-MS.

A Figura 17 apresenta a influência causada pela temperatura no tempo de migração e na área relativa do MEC. Para o cálculo da área relativa, utilizou-se o ácido tricloroacético (TCA, do inglês, *Trichloroacetic Acid*) como padrão interno, pois o mesmo é estável.

Figura 15: Influência da temperatura sobre o tempo de migração e a área de pico do MEC.

Acima da temperatura ambiente (próximo a 34 °C), observa-se que a hidrólise do MEC é favorecida, pois o MEC começa a se degradar resultando na queda da área relativa do MEC. O mesmo aumento de temperatura, por sua vez, reduz o tempo de análise devido à diminuição da viscosidade do tampão. Para temperaturas abaixo de 20 °C, observa-se uma tendência de estabilização da relação entre a área do MEC e do TCA. Esta estabilidade se dá porque a taxa hidrólise é reduzida durante a análise. No entanto, o analito permanece um maior tempo no interior do capilar.

A constante cinética de hidrólise (k_h) foi determinada anteriormente por Vidal *et al.* a 20 °C ($1,99 \times 10^{-5} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁴⁰ As soluções foram preparadas em meio aquoso e, portanto, a constante de hidrólise da reação ($1,11 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) foi expressa como de primeira ordem.

A área relativa do MEC na ausência de hidrólise pode ser representada por A_0 . Portanto, a área relativa referente ao MEC em diferentes temperaturas pode ser calculada através da equação 13.

$$A = A_0 e^{-k_h t_m} \quad (13),$$

onde t_m representa o tempo de migração do MEC no interior da coluna.

A partir dos valores de k_h calculados a várias temperaturas, foi possível obter a curva de Arrhenius apresentado na Figura 18, cuja inclinação representa a energia de ativação do MEC, $E_a = 99 \pm 8 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Figura 16: Gráfico de Arrhenius. A energia de ativação da reação de hidrólise pode ser estimada através da inclinação da curva.

Como o valor da E_a obtido experimentalmente foi coerente, o mesmo sugeriu que o sistema de condicionamento térmico desenvolvido possui as condições necessárias para estudos em que a temperatura ao longo do capilar deve permanecer estável e controlada.

1.8.4 CANCELAMENTO DO FLUXO LAMINAR EM CE

Em geral, a eletroforese capilar é praticada utilizando-se um tubo capilar que conecta dois reservatórios nivelados e é preenchido com o BGE. Se houver uma diferença dos níveis do líquido nos dois reservatórios, naturalmente será formado um fluxo de BGE orientado de acordo a diferença de pressão hidrostática dos reservatórios, e este fluxo ocorrerá em regime de fluxo laminar, se condições típicas de CE forem empregadas. Embora fundamental para se realizar a injeção de uma amostra hidrodinamicamente, este fluxo causa alargamento das bandas durante a separação, sendo uma das causas de redução do número de pratos.

No caso de CE-ESI-MS, um dos reservatórios é substituído pela fonte ESI do espectrômetro e, supostamente, a questão da diferença de pressão entre as extremidades do capilar teria sido resolvida durante o projeto ou ajustes dos equipamentos. Desta forma, há um natural questionamento sobre a influência da plataforma deslizante sob o CE, pois a mesma poderia provocar um desequilíbrio de pressão e, por consequência, diminuir a eficiência de separação, visto que o desnível resultante pelo uso da plataforma é de 22 mm. Portanto, diante deste questionamento, buscou-se estudar cuidadosamente o impacto desta modificação do arranjo do CE-MS e outra importante causa de desequilíbrio de pressão ao se utilizar fontes ESI.

O fluxo de nitrogênio que auxilia a formação do *electrospray* causa um efeito de sucção do líquido na ponta do capilar que em nada difere de outras formas de provocar um desequilíbrio de pressão. Num primeiro momento, não há como desconsiderar uma destas possíveis fontes de formação de fluxo laminar durante a corrida eletroforética, mas o desenvolvimento a seguir permite estabelecer uma estratégia para a minimização do efeito.

De acordo com a lei de Hagen-Poiseuille (equação 14), a vazão de um fluido (ϕ) é diretamente proporcional à diferença de pressão entre as extremidades de um capilar (ΔP):

$$\phi = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8\eta L_T} \quad (14),$$

sendo R e L_T o raio interno e o comprimento total do capilar, respectivamente, e η representa a viscosidade do eletrólito. Uma característica do fluxo laminar é que o líquido na

região central se move com maior velocidade do que aquele próximo da parede do tubo, sendo esta, aliás, uma fonte para alargamento de banda. A velocidade em função do raio ($v(r)$) é determinada pela equação 15.

$$v(r) = \frac{\Delta P}{4\eta L_T} (R^2 - r^2) \quad (15)$$

Assim, em um experimento por CE combinado ao fluxo laminar, a velocidade aparente pode ser calculada a partir do campo elétrico E , da mobilidade das espécies químicas μ da mobilidade eletroforética μ_{eof} e da velocidade do fluxo laminar v , tal como apresentado pela equação 16.

$$v_{ap}(r) = \mu E + \mu_{eof} E + v(r) \quad (16)$$

Pode-se observar a partir das equações 15 e 16 que capilares longos tendem a diminuir a importância do fluxo laminar. No entanto, este se torna mais pronunciado ao se utilizar capilares mais curtos. O uso de capilares longos em CE-MS é recorrente, no entanto, dependendo do método o uso de capilares curtos se torna necessário.²¹

A velocidade aparente média (v_{ap}) pode ser obtida experimentalmente a partir da razão entre o comprimento efetivo da coluna capilar (L_D) e o tempo de migração (t_m) da espécie. Como o MS fica posicionado na extremidade do capilar, neste caso o L_D coincide com comprimento total do capilar (L_T), equação 17.

$$v_{ap} = \frac{L_T}{t_m} \quad (17)$$

Realizando-se experimentos a dois diferentes potenciais de separação (V_1 e V_2), podem-se obter diferentes tempos de migração e em cada potencial e, conseqüentemente, as respectivas velocidades aparentes (v_{ap1} e v_{ap2}). De posse destas informações, é possível calcular a mobilidade aparente (μ_{ap}) da espécie química monitorada utilizando a equação 18.

$$\mu_{ap} = \frac{(v_{ap1} - v_{ap2})L_T}{(V_1 - V_2)} \quad (18),$$

onde a μ_{ap} representa a soma das mobilidades das espécies (μ) e do fluxo eletrosmótico (μ_{eof}).

A partir de um dos potenciais aplicados, da velocidade aparente obtida neste mesmo potencial, do comprimento do capilar e da mobilidade aparente, pode-se calcular a velocidade média do fluxo laminar, equação 19:

$$v = v_{ap2} - \mu_{ap} \frac{V_2}{L_T} \quad (19)$$

Finalmente, a diferença de pressão total – causadora do fluxo laminar – (ΔP) pode ser calculada a partir da equação de Hagen-Poiseuille:

$$\Delta P = \frac{8\eta L_T v}{R^2} \quad (20)$$

Se o fluxo laminar provocado pela combinação entre o desnível dos equipamentos e a sucção do provocada pelo ESI, é decorrente de uma diferença de pressão expressa pela equação 20, bastaria aplicar uma diferença de pressão de mesma intensidade, porém de sentido oposto, ao reservatório de eletrólito (*inlet*) durante a análise por CE-MS. Assim, o fluxo laminar seria adequadamente compensado no decorrer do experimento.

Uma avaliação da efetividade desta estratégia pode ser feita pelo acompanhamento da eficiência de separação. A eficiência de uma separação por CE pode ser determinada pelo número de pratos:⁵

$$N = 5,55 \left(\frac{t_m}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (21),$$

onde t_m representa o tempo de migração da espécie química e $w_{h/2}$ a largura à meia altura de seu pico.

A partir da Figura 19 pode-se observar a variação do tempo de migração, largura do pico a meia altura e o número de pratos em função da pressão aplicada durante a separação de padrões de cafeína ($m/z = 195$), nicotinato ($m/z = 122$) e biftalato ($m/z = 165$).

Variando-se a pressão aplicada à coluna capilar durante a análise, obtiveram-se diferentes tempos de migração para cada um analito. Como era esperado, à medida que a pressão aumenta negativamente o tempo de migração aumenta para as três espécies químicas.

A partir dos tempos de migração e das FWHM obtidas, foram calculados os números de pratos na faixa de $3,3$ a $16,2 \times 10^3$, para cafeína $2,8$ a $69,5 \times 10^3$ para nicotinato e $2,4$ a $75,5 \times 10^3$ para ftalato.

Observou-se que o número de pratos para os três analitos aumentou à medida que se aplicou pressões negativas ao sistema, sendo que o número de pratos voltou a reduzir ao se ultrapassar a pressão que, de acordo com os cálculos, anulava a inversão do fluxo no interior da coluna.

Figura 17: Curva de tempo de migração, largura de pico à meia altura e número de pratos para análises de cafeína, nicotinato e ftalato.

Eletroferogramas obtidos na ausência e na presença de *backpressure* em análises de cafeína, nicotinato e ftalato são apresentados na Figura 20. Como o sinal da cafeína apresenta intensidade 100 vezes superior à dos outros analitos, o sinal da mesma foi atenuado graficamente de modo a facilitar a observação dos picos de menor intensidade. Os eletroferogramas do conjunto B foram obtidos aplicando-se um *backpressure* de -16 mbar.

Sem aplicar *backpressure*, o tempo de migração foi consideravelmente menor, no entanto, observou-se um aumento do número de pratos para o ftalato, por exemplo, de 26000 para 75000 ao se aplicar o *backpressure*.

Figura 18: Eletroferogramas de padrões de cafeína, nicotinato e ftalato obtidos na ausência e na presença de *backpressure*, A e B respectivamente.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que ao utilizar o valor do *backpressure* mais adequado, o número de pratos para cafeína, nicotinato e ftalato aumentaram 15, 125 e 192 %, respectivamente. Assim, a melhora significativa do desempenho pode ser obtida para espécies de baixa mobilidade aparente, pois quanto maior for o tempo de migração, maior será a contribuição do fluxo laminar para o alargamento do pico.

De um modo geral, a variação da pressão aplicada interfere diretamente no tempo de migração de todas as espécies e no número de pratos. Em amostras reais e complexas, a aplicação de *backpressure* torna-se mais relevante, uma vez que aumenta o número de pratos e favorece a separação das espécies de interesse na presença de interferentes. Em

situações onde os analitos já se encontram resolvidos, tal como no eletroferograma A da Figura 20, pode-se aplicar uma pressão positiva a fim de aumentar a frequência de análise, mesmo resultando em uma consequente redução do número de pratos. Portanto, nem sempre a aplicação de pressão, seja positiva ou negativa, deverá ser aplicada como regra. Cabe ao analista avaliar a necessidade de resolução em tempo das espécies químicas de interesse.

Considerando que durante o presente experimento o *backpressure* calculado foi -16 mbar e que esta media corresponde a uma coluna de água de aproximadamente 16 cm, conclui-se que o CE deveria permanecer a 16 cm abaixo do MS para que o fluxo laminar causado pela sucção do ESI fosse cancelado.

Portanto, em uma condição típica de análise, em que o comprimento e o diâmetro do capilar, bem como o fluxo de nitrogênio do ESI podem variar conforme otimizações do método de separação, o cálculo de *backpressure* também apresentará resultados que atendam a estas condições. Portanto, a diferença de altura entre os equipamentos ocasionada pela plataforma deslizante é a variável menos significativa.

1.9 IMPLEMENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA COM DUPLA DETECÇÃO

CE-(C⁴D)²-ESI-MS

A presente seção discute a otimização dos detectores C⁴D utilizados, sua implementação no acoplamento CE-MS e o desenvolvimento de um cartucho capaz de garantir a adequada refrigeração do capilar, resultando no acoplamento CE-(C⁴D)²-ESI-MS.

1.9.1 IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA COM DUPLA DETECÇÃO CE-(C⁴D)²-ESI-MS

Os detectores C⁴D utilizados no presente trabalho foram desenvolvidos e publicados em 2009 durante o mestrado do presente autor.¹⁴ Algumas atualizações técnicas foram realizadas em seu processo de confecção e no controle de sincronização com dispositivos externos (*trigger*), sendo este último de grande importância no interfaceamento ao CE-MS. As atualizações realizadas mantiveram todas as características eletrônicas e analíticas conforme apresentado pelos autores em 2009.

Na versão anterior, os eletrodos que compõe a cela de detecção foram desenvolvidos utilizando uma técnica conhecida por *wire up*, onde um fio de pequeno diâmetro é enrolado firmemente em um núcleo rígido que serve de molde. Após o processo de soldagem do fio, o núcleo rígido, geralmente de um material em que a solda de estanho e chumbo não adere (uma agulha de seringa, por exemplo) é removido. Assim, obtém-se um tubo de 2 mm de comprimento e diâmetro interno de aproximadamente 400 μm .¹⁴

A nova cela de detecção apresenta as mesmas dimensões, porém o processo de confecção dos eletrodos foi substituído pela incorporação de furos metalizados recobertos por ouro, Figura 21, em uma placa de circuito impresso (PCB) de 2 mm de espessura. Esta modificação do processo garante uma maior reprodutibilidade no próprio processo de fabricação da cela de detecção do C⁴D.

Figura 21: Eletrodos da cela de detecção do C⁴D. A-Eletrodo confeccionado por *wire up* em um detector montado segundo o projeto apresentado por Francisco e do Lago em 2009 e B-Eletrodo de furo metalizado recoberto por ouro embutido no próprio PCB de 2 mm de espessura.

A interface microcontrolada originalmente adotada em 2009 contava com uma microcontroladora ATmega 168 (Atmel, San José, CA, EUA) que, apesar de apresentar recursos de hardware suficientes, necessitava de um conversor especial que permitisse sua comunicação via protocolo UART (do inglês *Universal Asynchronous Receiver/Transmitter*) com uma porta USB do computador.¹⁴ Depois de verificadas as necessidades pertinentes ao interfaceamento, adotou-se uma nova interface constituída por uma microcontroladora

mais compacta (ATmega32U4) e com mais recursos produzida pelo mesmo fabricante e distribuída através do projeto Teensy (PJRC, Sherwood, OR, US). Esta interface pode ser conectada diretamente à porta USB do computador por meio de um cabo com o conector padrão USB tipo mini B.

A Figura 19 apresenta uma imagem da interface microcontrolada desenvolvida para controle do C⁴D, seu diagrama elétrico é apresentado no Anexo I. Observa-se que nesta interface foram reservados conectores para instalação de C⁴Ds, expansão de dispositivos externos, tais como marcadores térmicos e um conector multifuncional com pinos reservados para *trigger*, por exemplo.

Figura 19: Placa microcontrolada utilizada no interfaceamento dos detectores C⁴D ao CE-MS. A- placa microcontrolada Teensy; B- conectores para instalação de C⁴Ds; C- conectores para instalação de dispositivos externos e D- conector multifuncional com pinos reservados para *trigger*.

Estabelecida a nova interface microcontrolada, a mesma foi instalada junto ao CE através do conector de sincronização que o mesmo possui para controle de dispositivos externos. Esta porta de comunicação permite a sincronização do CE a outros detectores.

A Figura 20 apresenta o referido conector tipo DB-9 identificado por “*remote*” disponível no painel traseiro do CE 7100 bem como o protocolo de *start* e *stop* utilizando os pinos 3 e 8, reservados para as respectivas funções. Ao iniciar a análise, o CE aplica um pulso 0 V por 150 ms através no pino 3 que, em condição padrão, é mantido em 5 V. Para indicar o término da análise, o CE aplica um sinal de mesma característica através do pino 8. O

dispositivo a ser controlado deve responder às transições de nível lógico alto para baixo, ou seja, de 5 V para 0 V.

Figura 20: Conector tipo DB-9 identificado no painel traseiro como “Remote” e protocolo de *start* e *stop*. a-Largura do pulso de 150 ms em estado lógico 0; b-Transição do nível lógico alto (5 V) para o nível lógico baixo (0 V). Pinos do Conector: 1-GND; 2-Preparação; 3-Start;4-Desligar equipamento; 5-Não usado; 6-Não usado; 7-Ready; 8-Stop; 9-Não usado.

Compatibilizado o *hardware* para a sincronia entre a interface microcontrolada do C⁴D e o CE, necessitou-se atualizar o *firmware* da interface. Foram implementados no *firmware* recursos de reconhecimento de sinais de transição conforme o protocolo apresentado na Figura 20. O *firmware* atual utiliza o protocolo de comunicação *Serine* desenvolvido por do Lago.⁴³ O protocolo permite a comunicação entre dispositivos conectados de diferentes formas (UART, RS232, I2C, USB e Ethernet) através da padronização de comandos.

Assim como o *firmware*, o *frontend* (*software* que realiza a interface entre o analista e o C⁴D) foi atualizado de modo a permitir que as funções de sincronização pudessem ser configuradas conforme a necessidade do analista. O fluxograma do *frontend* compatível com o protocolo *Serine* é apresentado no Anexo II.

A nova versão do *frontend* contempla três modos de início de aquisição de dados. Foi mantido o controle completamente manual, onde o analista pode iniciar e finalizar a

aquisição de dados através dos botões ou finalizar por meio de tempo de aquisição pré-definido pelo próprio analista. O segundo modo de início de aquisição de dados permite que o mesmo seja determinado automaticamente pelo CE com término manual ou por tempo de aquisição. O terceiro modo de início de aquisição de dados permite que o CE tenha total controle do início e do término da aquisição de dados realizada pelo sistema de C⁴D.

Funcionalidades como a escolha da unidade do sinal analítico (valor adimensional disponibilizado diretamente pelo conversor AD ou em condutividade de acordo com o diâmetro interno da coluna capilar) e a indicação do número de C⁴D instalados foram mantidas conforme *software* desenvolvido e disponibilizado em 2009.^{14, 44}

1.9.2 DESENVOLVIMENTO DO CARTUCHO PARA CE-(C⁴D)²-ESI-MS

Embora o módulo de refrigeração apresentado em 4.1.2 permita um bom controle de temperatura do capilar, o conjunto é de operação pouco prática. A inclusão de um detector C⁴D dificultaria ainda mais sua operação, o que definitivamente inviabilizaria a combinação de técnicas pretendida nesta tese. Assim, optou-se pelo desenvolvimento de um novo sistema baseado no conceito de cartucho, similar ao original do equipamento, mas que permitisse o posicionamento de até dois C⁴Ds e o apropriado controle de temperatura interna. Para atingir este último objetivo, a ideia era conduzir o próprio fluxo de ar do equipamento de CE por todo o cartucho, diminuindo, assim, a complexidade do sistema.

O acoplamento do cartucho Agilent compatível com o DAD (*Diode Array Detector*) do CE depende de um movimento angular para o correto encaixe, no entanto, a sonda do ESI necessita de um movimento perfeitamente vertical para seu correto encaixe. Devido à necessidade de dois graus de liberdade distintos e por não ser parte do escopo deste projeto, a parte do cartucho que deveria se acoplar ao DAD foi suprimida do novo cartucho. Portanto o novo cartucho se limita ao uso de dois C⁴Ds e o acoplamento da sonda do ESI.

A imobilização da sonda no cartucho permite que a coluna capilar possa ser cortada, limpa e posicionada adequadamente após sua montagem. Realizados estes preparativos de montagem (cartucho, capilar e sonda), tem um único componente a ser instalado no CE-MS,

unindo os equipamentos e preservando suas características instrumentais necessárias às análises.

Através da fabricação por método de impressão 3D, pôde-se desenvolver um cartucho sob medida para o acoplamento considerando o uso do fluxo de ar proveniente do sistema de termostatização da coluna capilar proveniente do CE, a imobilização da sonda do ESI e a instalação de 2 C⁴Ds como detectores auxiliares no acoplamento CE-MS.

A primeira versão L1 do cartucho é apresentada na Figura 24. Como referência, adotaram-se as medidas externas do cartucho original do equipamento utilizado no acoplamento CE-MS. A reprodução destas dimensões (excluindo a região do DAD) permitiu que o novo cartucho se encaixasse perfeitamente ao CE. Internamente foram realizadas modificações de *design* que permitissem a instalação de um C⁴D.

Uma característica fundamental observada no módulo de refrigeração foi a necessidade de isolamento térmico em sua estrutura construída em acrílico. O acrílico apresenta um coeficiente de condutibilidade térmica superior ao do ar, 0,19 e 0,03 Wm⁻¹K⁻¹, respectivamente. Portanto, foi necessário o revestimento com espuma de polietileno expandido de 6 mm de espessura como isolante.

Um dos parâmetros de impressão 3D é a densidade de preenchimento, ou seja, dependendo da funcionalidade do objeto impresso, o mesmo poderá ser maciço, poroso ou oco em percentual definido pelo projetista.

Um objeto impresso parcialmente maciço pode ser considerado como um objeto composto por várias câmaras preenchidas com ar assemelhando-se a uma estrutura rígida, uma espuma ou colméia. Como o ar é um dos melhores isolantes térmicos e através de corpos de teste impressos, concluiu-se que um preenchimento de 20 % ofereceria a resistência mecânica adequada. Esta característica foi utilizada em benefício da redução de volume e complexidade de montagem, pois não seria necessária a instalação de material termicamente isolante.

Nesta versão do cartucho, foram testadas duas formas distintas de fechamento de suas tampas. Para o fechamento da tampa do lado do CE, foram instalados parafusos internos e para a tampa do lado do MS foram utilizados 3 ímãs de neodímio de 3 x 3 mm.

Embora as duas formas de fixação tenham apresentado o efeito esperado, foram adotados ímãs no fechamento das tampas dos protótipos posteriores, por apresentarem as vantagens adicionais de fechamento e maior facilidade de acesso ao interior do cartucho pelo analista.

Na parte do cartucho que fica sobre o ESI, foi criada uma câmara de recirculação do ar proveniente do CE. Nesta câmara foram instaladas uma ventoinha e um C⁴D. Um segundo C⁴D foi instalado próximo ao *Inlet*, do lado do CE. Logo abaixo (e externamente ao cartucho) foi criado um suporte para a sonda do ESI integrado ao cartucho de modo que o C⁴D e a sonda permanecessem alinhados. O posicionamento externo da sonda permite o fácil acesso à sonda do ESI, ao tubo do *sheath liquid* e ao tubo do gás de nebulização.

Normalmente, a temperatura do gás de nebulização é consideravelmente superior à do método de separação por CE. Portanto, a região do cartucho que acomoda a sonda do ESI foi mantida apenas sob ventilação constante com auxílio de uma ventoinha de 12 V e dimensões 40 x 40 x 10 mm (largura x altura x profundidade) integrada ao cartucho.

Devido à possibilidade de pequenas imperfeições de posicionamento dos equipamentos, optou-se por instalar uma junção flexível, utilizando duas molas para testes conceituais. Estas molas, além de permitir pequenas torções do cartucho durante a montagem, também permitem o direcionamento do fluxo de ar.

Posteriormente, a mola foi substituída por um tubo de PU de 8 mm de diâmetro interno (H). Uma pequena ventoinha de 5 V e dimensões 30 x 30 x 10 mm (largura x altura x profundidade) foi instalada na câmara de recirculação de ar (C) para auxiliar em eventuais restrições de fluxo no sistema.

Figura 21: Protótipo L1 utilizando junta flexível entre as partes CE e MS do novo cartucho. A- parafusos de fixação da tampa do lado do CE; B- ímãs de neodímio de 3 x 3 mm utilizados para fixar a tampa do lado do MS; C- câmara de recirculação do ar proveniente do CE; D- ventoinha; E- C^4Ds ; F- sonda do ESI; G- junção flexível de mola e H- tubo de PU 8 mm de diâmetro interno.

Após testes, observou-se que a ventoinha não apresentou a eficiência desejada na circulação e contribuiu para o aquecimento interno devido seu funcionamento contínuo.

Avaliando as dimensões ocupadas pelos tubos e outros possíveis pontos de flexibilização da estrutura do cartucho, concluiu-se que os tubos de PU poderiam ser substituídos por dutos rígidos com dimensões internas maiores com suas paredes preenchidas como o restante do cartucho (20 %). Com o aumento das dimensões dos dutos, o uso da ventoinha interna presente no protótipo L1 pôde ser dispensado.

A Figura 25 apresenta o cartucho $CE-(C^4D)^2-ESI-MS$ com dois C^4Ds e interface eletrônica. A instalação da interface eletrônica na parte posterior do cartucho garante uma instalação elétrica dos detectores parcialmente definitiva. Apenas os cabos de comunicação USB, alimentação DC e *trigger* são necessários.

Como o duto que liga as partes do cartucho (CE e MS) foi desenvolvido de forma rígida em ABS, a sonda foi imobilizada por uma junta flexível que permitiu pequena flexibilidade e rotação, facilitando seu encaixe ao ESI.

Os dutos de ventilação foram revestidos internamente com fitas de cobre para otimizar a transferência passiva de calor entre as partes do cartucho e permitir o aterramento externo da coluna capilar.

Um segundo modelo de cartucho foi desenvolvido para análises que dispensam o uso de C^4D . Este modelo de cartucho se diferencia do anterior apenas pela ausência dos alojamentos dos C^4D e da parte posterior do cartucho onde fica instalada a interface eletrônica.

Figura 22: Versão final do cartucho para uso em CE-(C^4D)²-ESI-MS. A- C^4D ; B- interface eletrônica; C- conector de comunicação USB; D- conector de alimentação DC para os detectores e a ventoinha do ESI; E- conector para *trigger* compatível com equipamentos Agilent e F- dutos revestidos internamente com fitas de cobre.

1.9.3 ESTUDO COMPARATIVO DA FAIXA LINEAR PARA C⁴D E MS

A utilização de sistemas de detecção em série busca somar as melhores características individualmente oferecidas por cada um. No entanto durante o uso simultâneo dos mesmos devem-se considerar as diferentes faixas e linearidades, uma vez que a proposta é que ambos trabalhem de forma complementar.

Pode-se observar na Figura 23 eletroferogramas de misturas contendo MES e nicotinato obtidos a partir do C⁴D e MS. Os eletroferogramas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 são referentes às concentrações de MES 78, 156, 312, 625, 1250 e 5000 µmol L⁻¹, respectivamente. A concentração de nicotinato foi mantida em 30 µmol L⁻¹. Os tempos de migração das espécies apresentadas na Figura 23 foram corrigidos conforme a equação 22.

Considerando a distância entre o C⁴D e ESI-MS/MS ao longo da coluna capilar, os tempos de migração não são diretamente associados. No entanto, ajustes matemáticos das escalas de tempo dos detectores podem compatibilizá-las permitindo comparar diretamente os sinais obtidos por ambos.

A equação 22 apresenta o cálculo de compatibilização entre os detectores, onde L_T é o comprimento total da coluna capilar, L_D é a distância do ponto de injeção ao detector e t' é o tempo de migração compatibilizado e t o tempo migração relativo ao padrão interno. Considerando que a velocidade dos analitos permanece constante no interior da coluna capilar a mesma torna-se válida.

$$t' = \frac{L_T}{L_D} t \quad (22)$$

Em concentrações acima de 625 µmol L⁻¹, surgem outros picos provenientes de eventual contaminação junto ao padrão de MES, pois se observa que a intensidade dos mesmos aumenta conforme se aumenta a concentração do analito.

Como não foi utilizada nenhuma espécie para marcação do EOF, o sinal referente ao mesmo não pôde ser observado junto aos sinais obtidos por MS, Figura 23, no entanto o tempo de migração do mesmo foi inferido a partir dos sinais registrados pelo C⁴D. Conforme

esperado, os picos de interferentes e contaminantes não foram registrados pelo MS devido sua elevada seletividade.

Figura 23: Eletroferogramas de uma separação de MES e Nicotinato 5,0 mmol L⁻¹, 1, 2 e 3, respectivamente, obtidos a partir do C⁴D com o tempo de migração corrigido (A) a do MS (B). Os analitos foram separados em um eletrólito de corrida constituído de TEA 30 mmol L⁻¹ (pH 11,6). O *sheath liquid* foi preparado a partir da eletrólito de corrida diluído 5 vezes em uma solução 1:1 (v/v) de metanol e água

Embora não seja comum a análise de espécies utilizando curvas de calibração com faixas muito amplas, este estudo permite comparar as faixas de cada sistema de detecção. A Figura 24 apresenta curvas de calibração de MES corrigidas pelas áreas de nicotinato.

As curvas são apresentadas em escala log para facilitar a observação da curva linear na faixa de menor concentração. Ambos os detectores apresentaram boa linearidade na faixa de concentrações exploradas para os analitos. No entanto, como esperado o MS, destaca-se pelo menor erro nos valores de área.

Figura 24: Curvas de calibração das áreas de MES em concentrações 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 e 78 $\mu\text{mol L}^{-1}$ corrigidas pelas áreas de nicotinato 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Ressalta-se que o presente estudo não tem como objetivo apresentar os detectores como concorrentes, pois se trata de sistemas de detecção com propostas e características distintas. O estudo apenas demonstra a capacidade do C⁴D oferecer informações complementares em faixas amplas de concentração onde o MS necessite operar.

Observa-se ainda que os picos registrados pelo C⁴D apresentam um perfil menos simétrico que os obtidos pelo MS. A Figura 25 exibe o fator de simetria dos picos de nicotinato, A_s , obtidos a partir da equação 23:

$$A_s = \frac{L_{cf}}{L_{ic}} \quad (23),$$

onde L_{ic} representa a distância entre o início do pico e o centro do mesmo e L_{cf} a distância entre o centro do pico ao final do mesmo.

A assimetria observada para o C⁴D pode ser associada à eletrodispersão dos analitos devido à diferença entre a mobilidade do analito e do ânion do eletrólito. Como o analito apresenta uma mobilidade relativamente maior que a mobilidade do ânion do eletrólito, o analito tende a se dispersar frontalmente. A maior simetria dos picos obtidos por MS estão relacionados ao efeito de maior tempo de residência do analito na fonte de ESI.

Figura 25: Fator de simetria para os picos de nicotinato 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtidos por C⁴D e MS sequencialmente.

1.10 APLICAÇÕES E DEMONSTRAÇÕES DO SISTEMA CE-(C⁴D)²-ESI-MS EM

CONDIÇÕES DE TEMPERATURA CONTROLADA

A presente seção descreve o uso do sistema CE-(C⁴D)²-ESI-MS em diferentes meios (básico, ácido e neutro), as informações adicionais que o C⁴D confere a análise por CE-MS e os efeitos do controle térmico obtidos em análises de espécies termicamente instáveis.

1.10.1 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR CE-(C⁴D)²-ESI-MS

A análise de açúcares por CE geralmente é realizada através de complexação com borato ou de ionização em meio básico. Embora sejam dois métodos eficazes, o uso do borato não é o mais adequado no acoplamento CE-MS, pois o mesmo forma resíduos sólidos que são depositados excessivamente na fonte de ionização resultando, portanto, na necessidade de limpezas mais frequentes do ESI. A ionização de açúcares em pH elevado passa a ser a melhor alternativa, porém sem utilizar os BGEs tradicionais com NaOH e fosfatos, os quais também causariam depósitos de resíduos sólidos. A utilização de NH₄⁺ em sistemas CE-MS reduz a deposição de resíduos no ESI. No entanto, o íon amônio possui mobilidade muito elevada, resultando em um nível de ruído de linha base considerável quando utilizada a detecção por C⁴D.

Alternativamente, o íon trietilamônio (TEA) possui baixa mobilidade quando comparado com o NH₄⁺ e volatilidade suficiente para seu uso como BGE para detecção por C⁴D e MS. Portanto, tais características conferem ao TEA as condições necessárias para se obter resultados satisfatórios através do sistema CE-(C⁴D)²-ESI-MS em pH mais elevados.

A Figura 26 apresenta três eletroferogramas de uma solução padrão contendo 1 mmol L⁻¹ de mio-inositol, galactose, ribose e ácido galacturônico obtidos por CE-(C⁴D)²-ESI-MS utilizando uma solução de TEA 30 mmol L⁻¹ (pH 11,2) como eletrólito de corrida. Como o mio-inositol apresenta um pK_a = 12,29, é esperado que o mesmo co-migre predominantemente com moléculas neutras presentes no EOF.

Os eletroferogramas apresentados em Figura 26-A foram obtidos a partir dos dois C⁴D posicionados a 46 e 67 cm, respectivamente, a partir do ponto de injeção. Como o C⁴D é sensível às variações de condutância decorrentes das diferenças de mobilidade das espécies,

foi possível observar o pico do EOF sem a necessidade de incluir entre os padrões uma espécie que migre juntamente com o mesmo. Nos eletroferogramas obtidos a partir do MS (Figura 26-B), o inositol pôde ser identificado devido à elevada seletividade conferida pelo espectrômetro.

Ao ajustar os tempos de migração obtidos dos eletroferogramas 29-A com os apresentados em Figura 26-B, por meio da equação 22, os eletroferogramas obtidos através do C^4D , agora com o tempo de migração corrigido (Figura 29-C), podem ser diretamente comparados com os obtidos através do MS.

Ao comparar os eletroferogramas, observa-se que os picos dos analitos apresentam intensidades relativas diferentes ao se comparar os obtidos por MS e por C^4D . Esta diferença se dá, pois o MS pode ser ajustado de modo a obter a máxima sensibilidade para o íon m/z de interesse, enquanto que o C^4D se limita à diferença da mobilidade entre o analito e o BGE.

A seletividade do MS possibilitou que o inositol pudesse ser detectado nestas condições, embora o mesmo tenha migrado juntamente com o EOF. No entanto, se a análise dependesse exclusivamente do C^4D o inositol não seria detectado. Por outro lado, o uso C^4D na condição de eletrodo auxiliar indicou que o inositol é inapropriado quanto padrão interno em análise de açúcares, já que o mesmo apresenta mobilidade semelhante à do EOF. O uso do C^4D como detector auxiliar, também permitiu que o íon sódio presente na amostra pudesse ser detectado, embora o mesmo não estivesse previsto como analito de interesse a ser detectado pelo MS.

Portanto, os resultados obtidos a partir do C^4D , neste experimento, reforçam a importância do uso do mesmo concomitantemente ao MS como detector auxiliar. Este tipo de informação adicional permite que os analitos de interesse continuem sendo determinados por MS sem que a presença de outras espécies que compõe a amostra seja omitida, desde que o analito apresente mobilidade diferente do eletrólito.

Figura 26: Eletroferogramas obtidos simultaneamente por A- C^4D e B-ESI-MS/MS para inositol (1), galactose (2), ribose (3) e ácido galacturônico (4). Os eletroferogramas apresentados em **C** foram obtidos reajustando a escala de tempo a partir dos eletroferogramas **A** de modo a compatibilizar os tempos com os eletroferogramas apresentados em **B**.

1.10.2 DETECÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CE-(C⁴D)²-ESI-MS

O consumo de alimentos contendo quantidades elevadas de aminas biogênicas pode causar diversos problemas relacionados à saúde do indivíduo. Tais problemas podem ser desde reações alérgicas relacionadas com o sistema respiratório até vômito e hipertensão.⁴⁵

As aminas biogênicas podem ser analisadas por CE em meio ácido através da protonação do átomo de nitrogênio. O uso do ácido acético como eletrólito de corrida apresenta a volatilidade necessária para a separação por CE-MS sem a formação de resíduos na ESI. O baixo ruído de linha base apresentado pelo ácido acético também o torna favorável na detecção por C⁴D.

Eletroferogramas de putrescina, feniletilamina, triptamina e 1,7-diaminoheptano obtidos simultaneamente a partir de C⁴D e MS são apresentados na Figura 27. A compatibilização dos tempos de migração dos eletroferogramas obtidos através do C⁴D e do MS foi realizada a equação 22.

Figura 27: Eletroferogramas obtidos simultaneamente por C⁴D (A) e ESI-MS/MS (B) para putrescina (1), feniletilamina (2), triptamina (3) e 1,7-diaminoheptano (4). A escala de tempo dos eletroferogramas para C⁴D foram reajustadas de modo a compatibilizar os tempos com os eletroferogramas obtidos por MS. A coluna capilar possui comprimento total de 78,0 cm e os C⁴Ds foram posicionados a 42,8 e 64,5 cm de distância do ponto de injeção.

Os números de pratos de putrescina, triptamina e 1,7-diaminoheptano obtidos a partir dos C⁴Ds (**a** e **b**) e do MS (**c**) são apresentados na Figura . Observa-se que há uma tendência de aumento de N quando se afasta o C⁴D do ponto de injeção, o que está em acordo com a teoria do processo de separação. Como o MS está posicionado na extremidade oposta do capilar, esperava-se que N fosse ainda maior que o calculado para os C⁴Ds. No entanto, o mesmo apresentou valores abaixo do esperado.

Esta redução do número de pratos está associada ao ESI. Para um melhor entendimento do fenômeno, há que se considerarem os fatores que contribuem para o alargamento dos picos.

A variância (σ^2) dos picos em um eletroferogramas pode ser estudada a partir da contribuição individual dos fenômenos que o analito está submetido.

$$\sigma^2 = \sigma_i^2 + \sigma_d^2 + \sigma_l^2 + \sigma_o^2 \quad (24)$$

onde σ_i^2 , σ_d^2 , σ_l^2 e σ_o^2 são as contribuições da injeção, detecção, difusão longitudinal e outros processos, respectivamente. As variâncias referentes à injeção e à detecção podem ser estimadas por $\Delta_i^2/12$ e $\Delta_d^2/12$, respectivamente, onde as variações Δ_i e Δ_d são o comprimento do capilar ocupado pela amostra injetada (5,6 mm) e a extensão do capilar no interior do detector (500 μ m para o C⁴D, que corresponde à distância entre os eletrodos que constituem a cela de detecção). Neste caso, como as outras contribuições são menos significativas que o comprimento da coluna preenchida durante a injeção, a eficiência de separação é limitada pelo mesmo.

O termo σ_o^2 representa outras fontes de alargamento de pico, tais como eletrodispersão, adsorção à parede interna do capilar, fluxo laminar, entre outros. Este termo pode ser calculado a partir das outras variações. Neste caso, considera-se que σ_o^2 aumenta continuamente ao longo da coluna capilar permitindo, portanto, estimar sua contribuição na extremidade do capilar.

Deste modo, é possível estimar a contribuição do ESI-MS para o alargamento dos picos. Diferente da injeção e do C⁴D, sua contribuição poderá ser entendida em termos de contribuição para o alargamento dos picos em escala de tempo. Os valores estimados de σ_d para putrescina, feniletilamina e triptamina são 1,105, 1,015 e 1,098 s, respectivamente. Obtendo-se, portanto, a média de $1,07 \pm 0,05$ s. Este valor sugere que, ainda que se considerasse uma situação hipotética na qual nenhuma dispersão ocorresse após injetar uma quantidade infinitesimal de amostra, a largura do pico registrado no eletroferograma do MS teria aproximadamente 2 s de largura. Considerando que os processos no interior do MS são rápidos e que o tempo de acúmulo de dados (*dwell*) foi de apenas 50 ms, pode-se estimar que o alargamento dos picos é proveniente do próprio ESI.

A nebulização da solução por ESI gera material que ou é amostrado pelo MS, ou é descartado pelo sistema de exaustão. No entanto, este processo de remoção do excesso de material não é instantâneo, e a câmara de nebulização permanece com as gotículas geradas por tempo maior que o desejado, o que acaba por gerar com atraso picos cromatográficos ou eletroforéticos mais largos.

Figura 31: Número de pratos para putrescina (■), triptamina (●) e 1,7-diaminoheptano (▲) obtidos a partir do primeiro C^4D (a), do segundo C^4D (b) e do ESI-MS (c) e d representa a estimativa caso os C^4D s estivessem posicionados na extremidade da coluna capilar tal como o ESI-MS.

1.10.3 DETECÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS POR CE-(C^4D)²-ESI-MS

A análise de ácidos carboxílicos pode ser realizada por CE em meio básico. No entanto, devido aos valores de pK_a destes compostos serem aproximadamente 5, os mesmos podem ser analisados em meio neutro, pois apresentam a forma aniônica em proporção suficiente para que possam ser separados por CE. Assim, o bicarbonato de TEA ($(CH_3CH_2)_3NH^+HCO_3^-$) ajustado em pH 7,5 apresenta características que contemplam a detecção simultânea por C^4D e MS.

Eletroferogramas da separação de formiato, acetato, lactato e nicotinato obtidos simultaneamente a partir de C^4D e ESI-MS são apresentados na Figura 32. O tempo de migração do eletroferograma C^4D foi ajustado utilizando a equação 22. Este ajuste permitiu observar que, mesmo com um pequeno comprimento efetivo até o C^4D , obteve-se uma separação de linha base, onde formiato apresentou pico positivo enquanto os outros analitos apresentaram picos negativos devido à diferença de mobilidade entre analitos e BGE.

Ao aplicar o potencial de separação (-25 kV) a migração dos analitos seria influenciada também pelo EOF e pela sucção gerada pelo ESI. Assim, utilizou-se um capilar recoberto internamente com PVA com o objetivo de suprimir o EOF. Embora a supressão do EOF seja considerável, observou-se um pico negativo intenso provocado pela sucção gerada pelo ESI durante a análise, destaque da Figura 32-A. Apesar de ser um pico decorrente da sucção causada pelo ESI, ao fazer uma comparação com um pico de EOF em uma eventual análise o mesmo levaria cerca de 33 min para que o analito fosse detectado pelo MS. Neste caso, o uso do C^4D em série com o MS permitiu que o pico fosse observado antes do mesmo alcançar o MS, favorecendo a otimização do tempo necessário entre cada corrida.

Figura 32: Eletroferogramas de 1-formiato, 2-acetato, 3-lactato e 4-nicotinato $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtidos simultaneamente a partir de C^4D (A) e de ESI-MS (B). Entre parênteses, é indicado o valor da relação sinal-ruído para cada uma das espécies analisadas. Em destaque na figura A, um pico negativo intenso provocado pela sucção provocada pelo ESI durante a separação.

Ao comparar a relação sinal-ruído (SNR) para cada um dos analitos nos eletroferogramas obtidos por C^4D , observou-se que os valores apresentaram a mesma ordem de grandeza, 140, 89, 130 e 260 para formiato, acetato, lactato e nicotinato, respectivamente.

Os eletroferogramas obtidos por MS durante a mesma separação apresentaram maior variação entre os valores de SNR, 20, 7, 340 e 11000 para formiato, acetato, lactato e nicotinato, respectivamente.

Como a fonte ESI foi otimizada para a detecção de nicotinato, esperava-se que sua SNR fosse expressivamente maior em relação aos outros analitos, quando observados os eletroferogramas obtidos por MS. Alguns parâmetros do MS podem ser alterados dinamicamente durante a aquisição de dados, porém a temperatura, a pressão e o fluxo de gás do ESI impõe limitações a estas otimizações. Por outro lado, o C^4D não apresenta contato direto com o BGE ou mesmo com os eletrólitos, além de possuir um funcionamento mais simples, que dispensa ajustes específicos para cada espécie a ser detectada.

Na figura 32-B, observou-se que o sinal para o acetato apresentou uma SNR demasiadamente baixa. Por ser o mesmo também utilizado na composição de eletrólitos de corrida em outros experimentos, problemas de contaminação interna do MS favorecem o aumento do ruído de linha base para sua respectiva m/z . Observações como esta evidenciam que o mesmo comportamento seria esperado para outros analitos na mesma condição.

Em condições normais, tal como observado para nicotinato, os resultados obtidos por MS, são mais significativos, uma vez que apresentam elevada SNR. No entanto, os resultados para formiato e acetato podem ser obtidos a partir do próprio C^4D , pois em tais condições de análise o mesmo apresenta SNR maior que o próprio MS.

Deve-se destacar que ambos os sistemas de detecção não competem entre si, pois como discutido anteriormente, o MS apresenta vantagens superiores ao C^4D . No entanto este último se torna atrativo como sistema de detecção auxiliar em condições experimentais que limitam as potencialidades oferecidas pelo MS e por ventura favoreçam a detecção pelo C^4D .

1.10.4 CONTROLE DE TEMPERATURA E ESPÉCIES TERMICAMENTE INSTÁVEIS

Um teste relevante em CE que define o comportamento resistivo do sistema é também conhecido como teste do desvio da Lei de Ohm. Embora seja um teste simples baseado no aumento aproximadamente linear da condutância com a temperatura, o mesmo permite avaliar indiretamente a capacidade do sistema de termostatização dissipar o calor gerado pela coluna capilar durante uma análise.

Os testes do desvio da Lei de Ohm foram realizados utilizando os cartuchos apresentados na figura 33, que reúne os cartuchos originais do equipamento e o modelo mais avançado desenvolvido nesta tese.

Por permanecer completamente dentro do CE e continuamente ventilado em seu interior, adotou-se um cartucho Agilent exclusivo para análises por CE como referencial (Figura 33-A). Segundo o fabricante, um fluxo de ar de $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ é capaz de remover o calor gerado durante uma análise por CE de forma compatível a um sistema de refrigeração líquida.⁹ O cartucho para CE-MS desenvolvido pela Agilent (Figura 33-B) basicamente deriva do primeiro, com uma extensão lateral que visa dar controle de temperatura para a porção do capilar que fica interna ao equipamento de CE. No entanto, como já salientado, este controle não se estende à porção do capilar que fica externa.

Figura 28: Diferentes cartuchos utilizados no estudo do desvio da Lei de Ohm. A- cartucho Agilent compatível com o CE 7100 para análises exclusivamente por CE, B- cartucho Agilent compatível com o acoplamento CE-MS e C- cartucho desenvolvido no presente projeto compatível com o acoplamento CE- $(\text{C}^4\text{D})^2$ -ESI-MS.

Nos experimentos utilizando o cartucho CE-MS, os equipamentos foram mantidos a 11 cm de distância (19 cm mais próximo que em uma instalação padrão realizada pelo fabricante dos equipamentos).²⁴ Nos experimentos utilizando o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS os equipamentos foram mantidos a 0,5 cm devido às dimensões e modo de acoplamento deste cartucho. A figura 34 apresenta as curvas que representam curvas que representam o desvio da Lei de Ohm do sistema utilizando os diferentes cartuchos sob as mesmas condições.

cartucho do próprio CE apresente este desvio a elevadas correntes, o mesmo pode ser considerado uma referência no desenvolvimento de novas propostas para o controle térmico do cartucho utilizado no acoplamento CE-MS.

A curva obtida utilizando o cartucho para CE-MS disponível pelo fabricante dos equipamentos apresenta um desvio da linearidade que se torna mais acentuado para correntes superiores a 72 μA . Este comportamento está principalmente associado à falta de controle térmico na parte da coluna capilar que permanece externa ao CE. Nesta condição, o controle térmico do capilar depende diretamente das condições térmicas da sala e da velocidade do ar no entorno do capilar.

A curva de corrente versus potencial utilizando o cartucho $\text{CE}-(\text{C}^4\text{D})^2\text{-ESI-MS}$ revelou uma estabilidade térmica que se aproxima do cartucho para CE utilizado como referência. Apesar de boa parte do cartucho estar fora do gabinete do CE, suas paredes ocas e espessuras contribuíram diretamente para o isolamento térmico do seu interior.

Embora o desvio se inicie em uma corrente abaixo do apresentado pelo cartucho para CE, o perfil da curva do novo cartucho é muito próximo e bem melhor que o do CE-MS, tornando-se mais pronunciado em correntes elevadas.

Além do estudo para avaliação do desvio da Lei de Ohm, foram realizadas análises de MES, ácido nicotínico e MEC em concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 430 mmol L^{-1} , respectivamente. Os dois primeiros analitos apresentam estabilidade térmica suficiente para não sofrerem degradação térmica durante a separação por CE. No entanto, o MEC sofre degradação térmica perceptível com o aumento da temperatura durante a análise.⁴⁰

Foram utilizados três modos de controle térmico do capilar. No primeiro, foi utilizado o cartucho CE-MS segundo as recomendações de instalação do fabricante. O segundo modo consistiu em montagem similar à anterior, mas utilizando um ventilador circulando o ar do laboratório sobre a parte do capilar que permanece externa aos equipamentos. No terceiro, utilizou-se o cartucho desenvolvido para $\text{CE}-(\text{C}^4\text{D})^2\text{-ESI-MS}$. A figura 35 apresenta eletroferogramas de uma solução contendo nicotinato, MES e MEC obtidos por CE-MS nestes três modos.

O ácido nicotínico e o MES apresentam estabilidade térmica. Porém, devido ao aquecimento excessivo, nota-se a redução do pico referente ao MEC, quando o controle

térmico não é eficiente (Figura 35-A e B). Há que se considerar ainda que no segundo modo (B), utilizando o ventilador, o ar que circunda o capilar é termicamente condicionado pelo aparelho de ar do laboratório, ou seja, susceptível a quaisquer variações o ambiente.

Figura 30: Eletroferogramas de nicotinato (m/z 122 e célula de colisão a 4 V), MES (m/z 194 e célula de colisão a 3 V) e MEC (m/z 89 e célula de colisão a 4 V) em concentração $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 430mmol L^{-1} , respectivamente. MS programado em modo SIM com o potencial do ESI foi ajustado a 4,0 kV. O *scan time* foi ajustado em 200 ms. A- cartucho Agilent para CE-MS sem auxílio de ventilador, B- cartucho Agilent para CE-MS com auxílio de ventilador, C- cartucho desenvolvido para CE- $(\text{C}^4\text{D})^2$ -ESI-MS

As áreas de nicotinato, MES e MEC foram calculadas partir dos eletroferogramas obtidos. Considerando que o nicotinato possui estabilidade térmica nas condições experimentais utilizadas, o mesmo foi utilizado como padrão interno.

O gráfico apresentado na figura 36 correlaciona as áreas obtidas com os três tipos de termostatização estudados: *L*, utilizando o cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS, *C*, utilizando o cartucho fornecido pelo fabricante dos equipamentos para uso no acoplamento CE-MS com auxílio de um mini ventilador recirculando ar do laboratório sobre a coluna capilar e *S*, o mesmo cartucho sem o uso de ventilador, ou seja, nas condições padrão sugeridas pelo fabricante.

Pode-se observar que a área corrigida do MES mantém um comportamento estável independente do modo de termostatização adotado. No entanto, devido à instabilidade térmica do MEC, o controle inadequado da temperatura da coluna capilar resulta em sua decomposição e, conseqüentemente, na supressão de seu sinal analítico.

Observa-se que o acoplamento CE-MS sem qualquer tipo de condicionamento térmico, tal como sugerido pelo fabricante dos equipamentos, pode ser considerada a pior condição para análise de espécies mais sensíveis à elevação da temperatura.

Ao utilizar um ventilador recirculando o ar do laboratório diretamente sobre a coluna capilar, a área para o MEC foi aumentada em aproximadamente três vezes. Utilizando o cartucho desenvolvido para CE-(C⁴D)²-ESI-MS, a área do MEC foi aumentada em aproximadamente seis vezes. Estas variações das proporções das áreas de MEC demonstraram a vantagem do uso do cartucho no controle térmico no acoplamento em questão e a influência do aquecimento Joule sobre determinados compostos.

Figura 31: Valores de áreas corrigidas de MES e MEC em relação à área de nicotinato. L-Cartucho CE-(C⁴D)²-ESI-MS, C-Cartucho CE-MS com ventilação e S-Cartucho CE-MS sem ventilação.

CONCLUSÕES

Conforme os resultados apresentados e discutidos, a presente tese relata os aprimoramentos do acoplamento CE-MS através da implementação de um duplo sistema C^4D em série com MS, do controle de temperatura adequado e do uso de colunas capilares de menor comprimento que as comumente utilizadas no mesmo acoplamento. A instalação de dois C^4D s ao CE-MS resultou na configuração inédita $CE-(C^4D)^2$ -ESI-MS.

O acoplamento $CE-(C^4D)^2$ -ESI-MS apresentado tornou-se viável após a construção de uma plataforma deslizante capaz de permitir o deslocamento linear do CE e desenvolvimento de um novo cartucho impresso em ABS por uma impressora 3D. O desenho do cartucho permitiu a instalação de dois C^4D s, a utilização do sistema de refrigeração a ar proveniente do próprio CE e a instalação da sonda do ESI.

Observou-se ainda que, embora o fabricante oriente, através de seus manuais, que o CE e o MS devam permanecer à mesma altura para evitar efeitos de sifonamento, concluiu-se que o fluxo laminar causado pela sucção do ESI é muito mais significativo. O experimento de variação do fluxo laminar demonstrou que o CE deveria permanecer 16 cm abaixo do MS para que tal fluxo fosse cancelado e que esta altura deveria variar dependendo da otimização que é realizada para cada análise. Através deste estudo, foi possível aplicar uma metodologia que permitiu o cálculo da pressão necessária para cancelar os efeitos da sucção provocada pelo gás de nebulização do ESI.

A fim de compatibilizar a interpretação dos eletroferogramas obtidos nos três detectores, os tempos de migração dos analitos obtidos por C^4D foram corrigidos para representarem um posicionamento similar ao do ESI-MS.

Conforme esperado, ao afastar um sistema de detecção, tal como o C^4D , da fonte de injeção, o número de pratos tende a ser maior. No entanto, o número de pratos obtido pelo ESI-MS foi menor que o esperado, o que demonstra que o C^4D causa um alargamento menor dos picos que o ESI.

As análises de açúcares, aminas biogênicas e ácidos carboxílicos permitiram demonstrar a capacidade do acoplamento $CE-(C^4D)^2$ -ESI-MS realizar separações e detecções simultâneas em meio básico, ácido e neutro, respectivamente. Estas aplicações, embora não

representem a totalidade de possíveis problemas analíticos, demonstram que deve ser possível conseguir condições apropriadas para os dois tipos de detectores, desde que se possua um bom conhecimento e prática de ambos.

Mesmo com a elevada capacidade de separação de íons através da razão m/z e do baixo limite de detecção, o MS apresentou limitações quando necessitou realizar análises de ácidos acético e fórmico. Devido a uma eventual contaminação interna do MS por estas espécies, o C^4D obteve valores de SNR maiores que aqueles obtidos pelo MS. Assim, apesar do grande poder do ESI-MS, a detecção condutométrica se mostrou bastante útil, formando um conjunto complementar com o primeiro.

O MS é considerado um detector destrutivo e o C^4D , por ser sem contato e não apresentar efeito dispersor, podendo operar de forma transparente antes de outros detectores.

Como perspectivas vislumbra-se (1) a possibilidade de integração dos programas de aquisição de dados de modo a permitir, em um único programa, a obtenção dos eletroferogramas de MS e C^4D e (2) o contínuo desenvolvimento de métodos para diversos tipos de problemas analíticos de modo a divulgar a técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kekwick, R. A.; Pedersen, K. O., Arne Tiselius 1902-1971. *Biogr Mem Fellows R Soc.* **1974**, 20, 401-28.
2. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M., Concentration Distributions in Free Zone Electrophoresis. *J Chromatogr* **1979**, 169 (Feb), 1-10.
3. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D., Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. *Analytical Chemistry* **1981**, 53 (8), 1298-1302.
4. Skoog, D. A. H.; Nieman, T. A., *Principes of Instrumental Analysis*. 1998.
5. Tavares, M. F. M., Capillary electrophoresis: Basic concepts. *Quimica Nova* **1996**, 19 (2), 173-181.
6. Tavares, M. F. M., Separation mechanisms in capillary electrophoresis. *Quimica Nova* **1997**, 20 (5), 493-511.
7. Kestin, J.; Sokolov, M.; Wakeham, W. A., Viscosity of Liquid Water in Range - 8-Degrees-C to 150-Degrees-C. *J Phys Chem Ref Data* **1978**, 7 (3), 941-948.
8. Rogacs, A.; Santiago, J. G., Temperature Effects on Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **2013**, 85 (10), 5103-5113.
9. Technologies, A. *Capillary thermostating in capillary electrophoresis*; 5990-3407EN; Agilent Technologies: Redmond, OR, EUA, 2009; pp 1-8.
10. da Silva, J. A. F.; do Lago, C. L., An oscillometric detector for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1998**, 70 (20), 4339-4343.
11. Zemann, A. J.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G. K., Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1998**, 70 (3), 563-567.
12. Brito-Neto, J. G. A.; da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; do Lago, C. L., Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. *Electroanalysis* **2005**, 17 (13), 1207-1214.

13. Brito-Neto, J. G. A.; da Silva, J. A. F.; Blanes, L.; do Lago, C. L., Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. *Electroanalysis* **2005**, *17* (13), 1198-1206.
14. Francisco, K. J. M.; do Lago, C. L., A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. *Electrophoresis* **2009**, *30* (19), 3458-3464.
15. Gas, B.; Zuska, J.; Coufal, P.; van de Goor, T., Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2002**, *23* (20), 3520-3527.
16. Macka, M.; Hutchinson, J.; Zemmann, A.; Zhang, S. S.; Haddad, P. R., Miniaturized movable contactless conductivity detection cell for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, *24* (12-13), 2144-2149.
17. Katzmayer, M. U.; Klampfl, C. W.; Buchberger, W., Optimization of conductivity detection of low-molecular-mass anions in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1999**, *850* (1-2), 355-362.
18. Downard, K. M., Francis William Aston: the man behind the mass spectrograph. *Eur J Mass Spectrom* **2007**, *13* (3), 177-190.
19. Assuncao, N. A.; Bechara, E. J. H.; Simionato, A. V. C.; Tavares, M. F. M.; Carrilho, E., Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry (Ce-Ms): Twenty Years of Development. *Quimica Nova* **2008**, *31* (8), 2124-2133.
20. Ban, E.; Song, E. J., Recent developments and applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection in biological samples. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2013**, *929*, 180-186.
21. Grundmann, M.; Matysik, F. M., Fast capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry using capillaries with inner diameters ranging from 75 to 5 μ m. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *400* (1), 269-278.
22. Ro, K. W.; Liu, H.; Knapp, D. R., Plastic microchip liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using monolithic columns. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1111* (1), 40-47.

23. Olivares, J. A.; Nguyen, N. T.; Yonker, C. R.; Smith, R. D., Online Mass-Spectrometric Detection for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1987**, 59 (8), 1230-1232.
24. Technologies, A. *Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS - Site Preparation Checklist*; G2571-90018; Agilent Technologies: Redmond, OR, EUA, 23/07/2014, 2014; pp 1-13.
25. SPIE-Professional Chuck Hull: Pioneer in Stereolithography. (accessed 01/06/2017).
26. Gross, B. C.; Erkal, J. L.; Lockwood, S. Y.; Chen, C. P.; Spence, D. M., Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Analytical Chemistry* **2014**, 86 (7), 3240-3253.
27. RepRap. www.reprap.org (accessed 02/05/2017).
28. Cajal, C.; Santolaria, J.; Velazquez, J.; Aguado, S.; Albajez, J., Volumetric error compensation technique for 3D printers. In *Manufacturing Engineering Society International Conference*, AguilarMartin, J. J.; YagueFabra, J. A., Eds. Elsevier Science Bv: Amsterdam, 2013; Vol. 63, pp 642-649.
29. Celi, R.; Sempertegui, A.; Morocho, D.; Loza, D.; Alulema, D.; Proano, M., Study, Design and Construction of a 3D printer implemented through a Delta Robot. *2015 CHILEAN Conference on Electrical, Electronics Engineering, Information and Communication Technologies (CHILECON)* **2015**, 717-722.
30. Kayfi, R.; Ragab, D.; Tutunji, T. A.; Ieee, Mechatronic System Design Project: A 3D Printer Case Study. *2015 Ieee Jordan Conference on Applied Electrical Engineering and Computing Technologies (Aeect)* **2015**, 6.
31. Pilch, Z.; Domin, J.; Szlapa, A.; Ieee, The impact of vibration of the 3D printer table on the quality of print. *2015 Selected Problems of Electrical Engineering and Electronics (Wzee)* **2015**, 6.
32. Amin, R.; Knowlton, S.; Hart, A.; Yenilmez, B.; Ghaderinezhad, F.; Katebifar, S.; Messina, M.; Khademhosseini, A.; Tasoglu, S., 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication* **2016**, 8 (2), 16.

33. Bishop, G. W.; Satterwhite-Warden, J. E.; Kadimisetty, K.; Rusling, J. F., 3D-printed bioanalytical devices. *Nanotechnology* **2016**, 27 (28), 8.
34. Garg, A.; Bhattacharya, A.; Batish, A., Chemical vapor treatment of ABS parts built by FDM: Analysis of surface finish and mechanical strength. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* **2017**, 89 (5-8), 2175-2191.
35. Percoco, G.; Lavecchia, F.; Galantucci, L. M., Compressive Properties of FDM Rapid Prototypes Treated with a Low Cost Chemical Finishing. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology* **2012**, 4, 3838-3842.
36. Bual, G. S.; Kumar, P., Methods to improve surface finish of parts produced by fused deposition modeling. *Manufacturing Science and Technology* **2014**, 2, 51-55.
37. PJRC Electronic Projects. www.pjrc.com (accessed 05/05/2017).
38. Arduino. www.arduino.cc (accessed 05/05/2017).
39. AliExpress. www.aliexpress.com (accessed 07/07/2017).
40. Vidal, D. T. R.; Nogueira, T.; Saito, R. M.; do Lago, C. L., Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **2011**, 32 (8), 850-856.
41. Kasicka, V.; Prusik, Z.; Sazelova, P.; Chiari, M.; Miksik, I.; Deyl, Z., External electric field control of electroosmotic flow in non-coated and coated fused-silica capillaries and its application for capillary electrophoretic separations of peptides. *J Chromatogr B* **2000**, 741 (1), 43-54.
42. Rossi, M. R.; Vidal, D. T. R.; do Lago, C. L., Monoalkyl carbonates in carbonated alcoholic beverages. *Food Chemistry* **2012**, 133 (2), 352-357.
43. Serine Protocol. github.com/claumir-lago/Serine-Protocol (accessed 05/05/2017).
44. Open Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector - openC4D. www.sites.google.com/site/openc4d/home (accessed 02/03/2017).
45. Leuschner, R. G. K.; Hristova, A.; Robinson, T.; Hugas, M., The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database in support of risk analysis of biogenic amines in food. *J Food Compos Anal* **2013**, 29 (1), 37-42.

ANEXO I: DIAGRAMA ELÉTRICO DA INTERFACE MICROCONTROLADA

ANEXO II: FLUXOGRAMA DO SOFTWARE DE AQUISIÇÃO DE DADOS PARA C⁴D

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: Kelliton José Mendonça Francisco

Data de nascimento: 05/05/1983

Naturalidade: Brasileiro

Educação

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2010 – Mestrado em Química Analítica;

Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, 2007 – Bacharelado e Licenciatura em Química;

Escola Estadual Dilermando Costa Cruz, Juiz de Fora – MG, 2000 – Ensino Médio.

Formação Complementar

Manutenção de sistemas para vácuo, Alcatel Vacuum Technology, Annecy, FR, 2009;

Capacitação Pedagógica. Prefeitura Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, 2006;

Tornearia Mecânica, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, Juiz de Fora – MG, 1999;

Ocupação

Especialista em Laboratório, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2010 - atual

Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2007 – 2009

Atuações em monitorias

- 1- Monitor nas aulas teóricas de Licenciatura em Química do curso de Licenciatura em Química da Universidade de São Paulo - USP. Estagiário do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE-USP), 2008.
- 2- Monitor nas aulas práticas de Química Analítica Instrumental do curso de graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP. Estagiário do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE-USP), 2008.
- 3- Estagiário do Curso Pré-Vestibular Comunitário da Prefeitura de Juiz de Fora, Secretaria de Política Social Prefeitura de Juiz de Fora, 2006.
- 4- Monitor nas aulas práticas de Química Analítica Qualitativa do curso de graduação em Química Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, 2005.

Artigos Completos

- 1- DOS SANTOS, VAGNER BEZERRA ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA ; DUCATI, LUCAS COLUCCI ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Formation of isomers of anionic hemiesters of sugars and carbonic acid in aqueous medium. Carbohydrate Research (Chicago, Ill.. Print) , v. 428, p. 18-22, 2016.
- 2- FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA; DO LAGO, Claudimir Lucio . A capillary electrophoresis system with dual capacitively coupled contactless conductivity detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. Electrophoresis (Weinheim. Print) , v. 37, p. 1718-1724, 2016.

- 3- JUNIOR, GERSON FRANCISCO DUARTE ; DA SILVA, JOSÉ ALBERTO FRACASSI ; FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA ; LUCIO DO LAGO, CLAUDIMIR ; CARRILHO, EMANUEL ; COLTRO, WENDELL K. T. . Metalless electrodes for capacitively coupled contactless conductivity detection on electrophoresis microchips. *Electrophoresis (Weinheim. Print)* , v. 36, p. 1935-1940, 2015.
- 4- DO LAGO, Claudimir Lucio ; FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA ; DANIEL, DANIELA ; VIDAL, DENIS T. R. ; DOS SANTOS, VAGNER BEZERRA . A capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry approach for the determination of monoalkyl carbonates. *RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences* , v. 4, p. 19674-19679, 2014.
- 5- DO LAGO, Claudimir Lucio ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA ; DOS SANTOS, VAGNER BEZERRA . A simple approach to compensate the suction caused by the electrospray ionization source in capillary electrophoresis-mass spectrometry systems. *Electrophoresis (Weinheim. Print)* , v. 35, p. n/a-n/a, 2014.
- 6- Francisco, Kelliton José Mendonça; DO LAGO, Claudimir Lucio . A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. *Electrophoresis (Weinheim. Print)* , v. 30, p. 3458-3464, 2009.

Trabalhos Completos publicados em Anais de Congressos

- 1- JUNIOR, GERSON FRANCISCO DUARTE ; FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA ; DO LAGO, Claudimir Lucio ; CARRILHO, EMANUEL ; COLTRO, WENDELL K. T. . Ionic electrodes for capacitively coupled contactless conductivity detection on electrophoresis microchips. In: *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS, 2014, San Antonio. International*

Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS, 2014. p. 2149-2151.

Resumos em Congressos

- 1- DO LAGO, Claudimir Lucio ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; SANTANA, M. A. ; NICOLAI, L. G. ; Francisco, Kelliton José Mendonça ; SANTOS, V. B. ; DANIEL, D. . Carbonatomics by Mass Spectrometry. In: V Congresso da BrMASS, 2013, Campinas. V Congresso da BrMASS, 2013.
- 2- SILVA, T. R. ; Francisco, Kelliton José Mendonça ; CAMPANA, P. T. . Development of an automated electrospinning system for polymeric scaffolds production. In: XII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - Campos do Jordão, 2013, Campos do Jordão. XII Encontro da SBPMat - Campos do Jordão.
- 3- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; LOPES, F. S. ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Caracterização de detector Condutométrico sem contato multicanal C4D. In: 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.
- 4- LOPES, F. S. ; FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; BLANES, L. ; HOTTA, G. M. ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Um equipamento de eletroforese capilar (CE) com oito detectores condutométricos sem contato (C4D) e eletrólise separada. In: 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.
- 5- VIDAL, Denis Tadeu Rajh; LOPES, F. S. ; FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Sistema para controle de fluxo eletrosmótico (EOF) em eletroforese capilar (CE) com detecção condutométrica sem contato (C4D). In: 14º

ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. 14º ENQA – 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007.

- 6- BLANES, L. ; LOPES, F. S. ; FRANCISCO, Kelliton José Mendonça ; VIDAL, Denis Tadeu Rajh ; Dos Santos, T. G. ; DO LAGO, Claudimir Lucio . Development of a multi-capillary electrophoresis instrument with contactless conductivity detection and a module for separated electrolysis. In: 13th LACE - 13th Latin-American Capillary Electrophoresis, 2007, Santiago. 13th LACE - 13th Latin -American Capillary Electrophoresis, 2007.
- 7- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça; MATOS, R. C.; CONDE, C. P. K. . Construção e aplicação de válvulas solenóide de baixo custo para análise on-line de pH e condutividade em amostras de água de chuva. In: 46º Congresso Brasileiro de Química, 2006, Salvador. Anais do 46º Congresso Brasileiro de Química, 2006.
- 8- FRANCISCO, Kelliton José Mendonça; MATOS, R. C.; CONDE, C. P. K. . Construção de Coletores Pluviométricos Automáticos Utilizando Sensor Condutométrico a Base de Cd's Graváveis de Platina. In: 13º ENQA – 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói. Anais do 13º Encontro Nacional de Química Analítica, 2005.

Patentes e Registros

- 1- CAMPANA, P. T. ; FRANCISCO, KELLITON JOSÉ MENDONÇA . Dispositivo para electrospinning horizontal automatizado. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140237976, título: "Dispositivo para electrospinning horizontal automatizado" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante (s): Patrícia Targon Campana;Universidade de São Paulo, Depósito: 25/09/2014

- 2- CAMPANA, P. T. ; Francisco, Kelliton José Mendonça . ES-TETRIS. 2014. Patente: Programa de Computador. Número do registro: BR512014001192-5, data de registro: 10/10/2014, título: "ES-TETRIS" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante (s): Patrícia Targon Campana;Universidade de São Paulo,

Website

- 1- Francisco, Kelliton José Mendonça; DO LAGO, Claudimir Lucio . Open Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector - openC4D. 2010; Tema: Detecção Condutométrica sem Contato Capacitivamente Acoplada. (Site).