UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional
Tecnologia em Química e Bioquímica

FÁBIO CARDOSO DOS SANTOS

**Determinação de dimetilaminopropilamina (DMAPA)
por eletroforese capilar, após destilação por arraste
de vapor, em formulações do tensoativo
cocoamidopropil betaína (CAPB)**

São Paulo

24/10/2016

Circular CoPGr/0009/2000 de 25/02/2000

FÁBIO CARDOSO DOS SANTOS

**Determinação de dimetilaminopropilamina (DMAPA) por
eletroforese capilar, após destilação por arraste de
vapor, em formulações do tensoativo
cocoamidopropil betaína (CAPB)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências,
Área de Concentração Tecnologia em
Química e Bioquímica.*

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2016

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

Santos, Fábio Cardoso dos
S237det Determinação de dimetilaminopropilamina (DMAPA) por
eletroforese capilar, após destilação por arraste de vapor, em
formulações do tensoativo cocoamidopropil betaína (CAPB) /
Fábio Cardoso dos Santos. -- São Paulo, 2016.
64p.

Dissertação (mestrado profissional) – Instituto de Química da
Universidade de São Paulo.

Orientador : Tavares, Marina Franco Maggi

1. Eletroforese : Química analítica I. T. II. Tavares, Marina
Franco Maggi, orientador.

543.0871 CDD

Dedicatórias

“Agradeço a Deus primeiramente e a Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos alcançadas”.

A minha mãe que em horas escuras da minha vida, me ilumina, fazendo-me acreditar sempre no bem, não importando o quão difícil as situações se apresentem.

A minha esposa Daniele Fernanda, que me motivou durante todos estes anos dedicados a este projeto, não desanimando e principalmente me dando forças para continuar na luta para alcançar meus objetivos.

Aos meus sogros Aristides e Maria da Penha, que me acolheram quando minha saúde ficou debilitada, cuidando de mim em um momento muito delicado.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do programa de Mestrado Profissional do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares, por ter me aceito neste programa e pelas valiosas orientações que permitiram concluir este projeto.

Ao Prof. Dr. Joao P.S. Farah, pelas conversas sempre muito incentivadoras e principalmente pela colaboração crucial no desfecho positivo desta dissertação.

Ao meu gerente Lívio Caribe da Rocha, que possibilitou a minha participação neste programa de mestrado, disponibilizando todos os recursos necessários para conclusão do mesmo.

Ao meu gestor Marcelo Minghetti, que sempre me apoiou neste trabalho, permitindo sempre a minha saída da empresa, mesmo com tantas tarefas a serem executadas.

A Gilberto Santos e Cláudio Leão, que me selecionaram entre muitos para participar deste programa, me possibilitando a realização deste sonho.

A todos do grupo de pesquisa da Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares que do menor ao maior envolvimento com este projeto, ajudaram a elaborá-lo.

Meus sinceros agradecimentos a Carolina Raíssa, Aline Klassen, Pedro Cruz, Daniel Rossado, Gisele Canuto, Ana Rosa, Maicon de Moraes, Andrea Faccio e Karina Trevisan.

Ao meu irmão Rafael Cardoso por toda ajuda na elaboração das figuras desse trabalho.

Também agradeço a colaboração de meus amigos da Clariant, Ricardo Antunes, Erik Okada e Felipe Martinez, que me ajudaram diretamente neste

trabalho, realizando diversas destilações de CAPB e análises via HPLC, que compuseram os resultados expostos neste trabalho, e ao Leonardo Vasconcelos, que suportou minha ausência na empresa, nos momentos em que eu estava na faculdade, trabalhando neste projeto.

Ao Thiago Rodrigues, Raphael Costa, Fabiana Guerra e Leandro Blachechen que de várias maneiras, desde palavras confortantes, ideias e ensaios realizados para o projeto, me apoiaram.

“A nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez”.

(Thomas Edison)

RESUMO

Santos, F. C. **Determinação de dimetilaminopropilamina (DMAPA) por eletroforese capilar, após destilação por arraste de vapor, em formulações do tensoativo cocoamidopropil betaína (CAPB)**. 2016. 64 p. Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação de Tecnologia em Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O tensoativo anfotérico cocoamidopropil betaína (CAPB) é largamente utilizado na indústria de cosméticos, e é considerado um insumo essencial para a formulação de sabonetes líquidos, shampoos e géis de limpeza facial. A síntese deste tensoativo se dá por meio da reação entre ácido graxo de coco e dimetilaminopropilamina (DMAPA) e, posterior reação com o ácido monocloroacético (AMCA). O excesso de DMAPA considerado impureza, precisa ser monitorado devido a sua irritabilidade no contato com a pele, olhos e mucosas podendo em alguns casos provocar dermatite.

Atualmente, o método adotado pela empresa Clariant S/A utiliza para a determinação desta substância, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), entretanto, esta metodologia apresenta elevado tempo de análise e consumo de solventes, comprometendo a produtividade na indústria, por manter os reatores inoperantes na espera do resultado da análise.

Existe uma demanda crescente na indústria de cosméticos para utilização de metodologias que abordem critérios de tempo e custo na determinação de impurezas, para assegurar a qualidade dos produtos finais. Assim, com o intuito de aumentar a eficiência no processo de produção, este trabalho tem como objetivo propor um método rápido e confiável por eletroforese capilar para determinar o teor de DMAPA durante a produção (controles de processo) e no produto final do tensoativo CAPB.

Neste trabalho foram abordadas diversas técnicas de preparo de amostra e condições instrumentais, para se alcançar um limite de quantificação (LOQ) $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$ (especificação exigida pelo cliente no produto final).

O DMAPA foi analisado como cátion, utilizando um eletrólito de corrida com imidazol e HIBA (ácido alpha hidroxibutírico), ambos com concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e pH acertado para 4,0 utilizando uma solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Foi realizada inicialmente, uma tentativa de analisar o CAPB diluindo-o diretamente em água, porém, mesmo após tentativas de pré-concentração *on-line*

como o Stacking (plug de água antes da injeção da amostra) e injeção de amostra no modo eletrocínético, os subprodutos presentes na amostra, interferiram, prejudicando a detectabilidade do método.

Então, foi proposta uma alternativa de preparo de amostra por meio da destilação por arraste de vapor, que permitiu isolar o DMAPA de sua matriz, diminuindo o limite de detecção (LOD) e LOQ do método proposto. Posteriormente foi construída uma curva analítica processada (em CAPB) e o método proposto apresentou boa precisão (%CV < 5) e linearidade ($R^2=0,9955$ faixa linear de 2,0 a 20 mg kg⁻¹), com LOD e LOQ de 0,03 mg kg⁻¹ e 0,1 mg kg⁻¹, respectivamente.

O método proposto nesta dissertação alcançou o objetivo desejado, uma vez que apresentou um LOQ para o DMAPA abaixo da especificação exigida pelos clientes no produto final, e significativamente mais rápido do que o método atualmente utilizado pela Clariant S/A.

Palavras-chave: cocoamidopropil betaína (CAPB), eletroforese capilar, dimetilaminopropilamina (DMAPA), destilação por arraste de vapor

ABSTRACT

Santos, F. C. **steam distillation aided preconcentration of dimethylaminopropylamine (DMAPA) for its capillary electrophoresis determination in formulations of alkyl amidopropyl betaine surfactant.** 2016. 64p. Professional Master Thesis - Graduate Program Technology in Chemistry and Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The amphoteric surfactant cocoamidopropyl betaine (CAPB) is widely used in pharmaceuticals and cosmetics industries, and is considered an essential input for the formulation of liquid soaps, shampoos and facial cleansing gels. Its synthesis is based on the reaction between fatty acid and coconut dimethylaminopropylamine (DMAPA) and subsequent reaction with monochloroacetic acid (MCA). The excess of DMAPA, regarded as an impurity, needs to be monitored because of its skin, eyes and mucous membranes irritability and in some cases, it causes dermatitis.

Currently, the method adopted by Clariant S/A Industry for the determination of this substance is based on high performance liquid chromatography (HPLC). However, this method has a high analysis time and solvent consumption, compromising the productivity because of the inactive reactors which cannot be operated without the results of DMAPA analysis.

There is a growing demand in the cosmetics industry to use methodologies which use time and cost criteria for determination of impurities to ensure the end products quality. Thus, in order to increase efficiency in the production process, this paper aims to propose a fast and reliable method for capillary electrophoresis to determine the DMAPA content during production (process control) and in the end product (CAPB surfactant).

In this study, we addressed several sample preparation techniques and instrumental conditions to achieve an LOQ (limit of quantification) $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$ (specification required by the customer in the final product).

The DMAPA was analyzed as cation, using a running buffer with imidazole and HIBA (α -hydroxybutyric acid), both with concentration of 0.01 mol L^{-1} , and pH adjusted to 4.0 using a solution of HCl 1.0 mol L^{-1} .

First, CAPB was diluted directly in water. However, even after online preconcentration as Stacking (water plug before sample injection) and sample injection using the electrokinetic mode, the by-products present in the sample

interfered in the method detectability. Thus, it was proposed an alternative sample preparation by steam distillation, allowing the isolation of the DMAPA from its matrix, lowering the limit of detection (LOD) and LOQ. Subsequently a processed calibration curve was constructed (in CAPB) and the proposed had good precision (CV% <5) and linearity ($R^2 = 0.9955$, linear range from 2.0 to 20 mg kg⁻¹), with LOD and LOQ of 0.03 mg kg⁻¹ and 0.1 mg kg⁻¹, respectively.

The developed method in this thesis has achieved its purpose, since it presented an LOQ for the DMAPA below the required specification by customers in the final product, and significantly faster than the method currently used by Clariant S/A.

Keywords: cocoamidopropyl betaine (CAPB), capillary electrophoresis, dimethylaminopropylamine (DMAPA), steam distillation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
cmc	concentração micelar crítica
CE	eletroforese capilar
CV	coeficiente de variação
CZE	eletroforese capilar de zona
ELSD	detector evaporativo com espalhamento de luz
EOF	fluxo eletroosmótico
HILIC	cromatografia líquida por interação hidrofílica
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
LLE	extração líquido-líquido
GC	cromatografia gasosa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MEKC	cromatografia eletrocinética micelar
R^2	coeficiente de determinação
s	erro da regressão
S	coeficiente angular
SPE	extração em fase sólido
S/R	relação sinal ruído

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Introdução	13
1.1 – Cocoamidopropilbetaina (CAPB).....	14
1.2 – Dimetilaminopropilamina (DMAPA).....	15
CAPÍTULO 2 – Revisão da Literatura	16
2.1 – Métodos Instrumentais	17
2.1.1 – Eletroforese Capilar (CE)	17
2.1.1.1 – Eletroforese Capilar de zona (CE)	20
2.1.1.2 – Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC).....	20
2.1.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	21
2.2 – Determinação de aminas.....	23
CAPÍTULO 3 – Objetivos	27
CAPÍTULO 4 – Materiais e Métodos	29
4.1 – Instrumentação	30
4.2 – Reagentes e soluções.....	31
4.3 – Preparo da curva analítica e amostras	32
CAPÍTULO 5 – Desenvolvimento do método	33
5.1 – Otimização das condições de análises.....	34
5.2 – Otimização da destilação por arraste de vapor	44
5.2.1 – Massa de CAPB a ser destilada	44
5.2.2 – pH ótimo de preparo de amostra e recolhimento do destilado	45
5.2.3 – Volume do destilado	46
5.2.4 – Potência da caldeira de vapor de água.....	47
CAPÍTULO 6 – Validação do método	49
6.1 – Parâmetros da validação	50
6.1.1 – Seletividade	50
6.1.2 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).....	51
6.1.3 – Precisão do método intra-ensaio	53
6.1.4 – Aplicação do método a amostras de CAPB.....	54
CAPÍTULO 7 – Considerações finais	57
CAPÍTULO 8 – Referências	59

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 – Cocoamidopropil betaina (CAPB)

O CAPB é um tensoativo zwiteriônico, ou seja, possui na mesma molécula grupamentos aniônicos e catiônicos. Dados mostram que a produção deste importante tensoativo foi de 59000 toneladas somente na Europa Ocidental no ano de 2002, sendo que metade deste volume de produção é utilizado em cosméticos tais como shampoos e outra metade em produtos de limpeza como detergentes. A proporção deste material nestes produtos citados varia em até 30% como matéria ativa. A síntese deste tensoativo se dá por meio da reação entre ácido graxo de coco e dimetilaminopropilamina (DMAPA), e posterior reação com o ácido monocloroacético (AMCA)¹.

Na Figura 1, são demonstradas as reações envolvidas na produção do CAPB.

Figura 1. Reações envolvidas na produção do coco amidopropil betaína (CLARIANT S/A).

1.2– Dimetilaminopropilamina (DMAPA)

A substância química dimetilaminopropilamina (DMAPA) é um produto intermediário utilizado em grande escala na fabricação de diversos produtos, tais como: tensoativos, sabões moles, betaínas e óxidos de aminas graxas, entre outros.

O método mais comum para obtenção deste importante produto é a hidrogenação catalítica de nitrilas alifáticas, conforme Figura 2.

Figura 2. Reação de hidrogenação catalítica para obtenção do DMAPA².

Segundo um relatório gerado no ano de 2014 pela empresa de consultoria e pesquisa de mercado, Markets and Markets o consumo de aminas até 2018, excederá \$ 17 bilhões de dólares em vendas, sendo que 17% deste mercado será de produtos para higiene pessoal, onde situa-se o uso de DMAPA na produção do tensoativo anfotérico CAPB³.

O efeito alérgico deste composto já foi muito estudado e relatado na literatura. Foti *et al.*, confirmaram que a presença de DMAPA não reagido, utilizado na formulação do tensoativo anfotérico CAPB, é um dos principais componentes causadores de alergias e hipersensibilidade na pele, causando eczemas da face (especialmente pálpebras) axilas e genitálias⁴.

A Figura 3 ilustra alguns destes efeitos.

Figura 3. Efeitos alérgicos DMAPA nas mãos e faces⁵.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Métodos instrumentais

A escolha de métodos instrumentais em análises químicas de controle de qualidade, ambientais, clínicas entre outras, está ligada a sua precisão e a sua capacidade em detectar quantidades pequenas de analitos (ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$) em matrizes complexas, onde na maioria das vezes métodos clássicos como os de via úmida, não conseguem ser eficientes⁶.

Essa escolha também pode se basear no tempo de resposta analítica que estes métodos fornecem, para responder a demanda atual de processos de controle de qualidade, onde a agilidade nas respostas analíticas é cada vez mais exigida.

Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas instrumentais, a cromatografia de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*), revisadas brevemente.

O analito DMAPA foi determinado pelas duas técnicas, a fim de comparar o desempenho da metodologia alternativa (CE) com a clássica (HPLC), empregada na Clariant S/A.

2.1.1 Eletroforese Capilar (CE)

Eletroforese capilar tem por definição o movimento diferencial de espécies carregadas (íons) através da aplicação de um campo elétrico em um capilar preenchido por um eletrólito.

Esta técnica de separação foi introduzida em 1937 por Tiselius, que veio a receber o Prêmio Nobel em 1948, pela demonstração da separação de misturas de proteínas aplicando este conceito⁷.

O avanço desta técnica se deu devido à simplicidade instrumental associada principalmente a mecanismos de separação diferenciados, aplicados a diversos compostos, associando-se a eletrólitos específicos, e utilizando apenas uma única coluna capilar⁸.

Um diagrama esquemático é demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática de um sistema para eletroforese capilar. (Adaptado de GERVASIO, 2008) (**D**) detector, (**C**) computador que recebe o sinal vindo do detector, (**F**) potencial aplicado, **R₁** e **R₂**) eletrodos).

A amostra é introduzida no capilar, e geralmente, no sentido do anodo para o catodo, através de pressão ou da aplicação de um potencial na solução a ser analisada contida em um vial. Após esta etapa, é aplicada uma tensão a este capilar gerando um campo elétrico, e a interação com este campo, faz com que os compostos com carga se movimentem, com velocidades e sentidos diferentes, sendo que os compostos sem carga (moléculas neutras) não sofrem influência do campo elétrico, migrando juntamente com o fluxo eletrosmótico⁸.

O fluxo eletrosmótico (EOF) é gerado na aplicação de uma alta tensão no capilar contendo solução tampão, que faz com que o solvente migre em direção ao catodo. Isto se deve a dupla camada formada na interface entre o eletrólito e as paredes de sílica do capilar⁹. A Figura 5 mostra estas cargas sendo formadas na parede do capilar.

Figura 5. Representação ilustrativa da geração do fluxo eletrosmótico: **A)** cargas negativas sendo geradas nas paredes do capilar (Si-O-); **B)** Cátions hidratados se acumulando próximos da superfície do capilar e **C)** Fluxo de massa migrando para o catodo, quando aplicado o campo elétrico (Adaptado de H. LAUER, H., P.ROZING, G., 2009)⁷

O perfil radial observado pelo fluxo eletroosmótico gerado na parede destes capilares é praticamente plano, contrastando com o perfil parabólico gerado em HPLC, em decorrência do fluxo gerado por pressão em bombeamento da fase móvel.

A consequência direta deste fenômeno observado em eletroforese é a melhor definição dos picos gerados por este sistema (eficiência elevada com 10^5 - 10^6 pratos), comparados aos gerados por HPLC⁹.

Figura 6. (a) Ilustração dos perfis radiais para líquidos em eletroforese (fluxo eletroosmótico) e (b) fluxo induzido por diferença de pressão obtido em HPLC (Adaptado de SKOOG *et al.*, 2006)

Há vários mecanismos de separação ou modos de eletroforese capilar, sendo os mais utilizados, eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *zone capillary electrophoresis*) e cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês *micellar electrokinetic chromatography*).

2.1.1.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona (CZE) é considerada a mais universal das técnicas empregadas em eletroforese; neste modo de separação os analitos são separados de acordo com sua respectiva mobilidade eletroforética, passando pelo detector em “zonas distintas” (razão pelo nome eletroforese de zona)¹⁰.

2.1.1.2 Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar (MEKC)

A técnica de eletroforese capilar de zona (CZE) é limitada a separação de compostos que possuam carga ou compostos neutros que tenham uma grande diferença em suas massas moleculares. A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) é uma das técnicas em eletroforese capaz de separar compostos neutros e carregados, técnica esta, desenvolvida por Terabe *et al.*¹¹. Neste modo, tensoativos em concentrações superiores a concentração micelar crítica (cmc) são adicionados aos eletrólitos e as micelas formadas servem como meio propício para interação diferenciada de solutos.

A Tabela 1 resume as principais vantagens e limitações da eletroforese capilar.

Tabela 1. Comparação das vantagens e limitações encontradas em eletroforese capilar.

Vantagens	Limitações
<p>Alto poder de resolução</p> <p>Curto tempo de análise</p> <p>Fácil preparação da amostra</p> <p>Baixo custo operacional</p> <p>Grande versatilidade e flexibilidade</p> <p>Menor gasto de reagentes e solventes</p> <p>Poderosa ferramenta de separação e quantificação</p>	<p>Baixa detectabilidade em função da menor quantidade de amostra injetada e caminho óptico proporcionado pelo diâmetro do capilar (ordem de nL).</p>

2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação extremamente importante para análise de diversos compostos, tais como fármacos, biomoléculas, polímeros, e uma grande variedade de outras substâncias.

No modo mais convencional, a separação dos componentes químicos (analitos) ocorre através da distribuição destes entre um líquido (fase móvel) que percola uma fase estacionária, fixa na coluna.

Este líquido pode ser um solvente orgânico como n-hexano, acetato de etila, metanol, acetonitrila, soluções tampão entre outras, que arrastam os analitos por uma coluna que contem partículas de sílica porosa ou sílica modificada, onde acontece a interação com os analitos a serem separados e analisados¹².

A definição do tipo de cromatografia líquida de alta eficiência se baseia no mecanismo de separação, sendo classificada como partição ou cromatografia líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido, troca iônica ou cromatografia de íons, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade e cromatografia quiral⁹.

Dentre estas técnicas cromatográficas presentes em HPLC, a mais utilizada na indústria é a de adsorção ou cromatografia líquido-sólido. Outras classificações se baseiam na polaridade relativa entre as fases móvel e estacionária. O mecanismo de separação envolvido nesta técnica se dá na competição das moléculas do soluto por sítios ativos presentes na fase estacionária com o solvente. A eluição acontece quando um determinado solvente arrasta o soluto da fase estacionária. Quando se emprega uma fase móvel menos polar e uma fase estacionária mais polar, se dá o nome de cromatografia de fase normal, o inverso desta é chamada de cromatografia de fase reversa.

O detector de massas é considerado o mais importante entre os diversos outros tipos de detectores empregados em HPLC, devido a sua capacidade em fornecer informações estruturais dos compostos a serem analisados.

Porém ao seu lado existem vários outros detectores empregados em diversas outras aplicações.

Abaixo são descritos alguns dos principais detectores utilizados nesta técnica.

- **Detector Absorbância - UV:** É o mais amplamente utilizado em HPLC, sua detecção se baseia na absorção de fótons por um cromóforo, por exemplo, compostos com ligações duplas, anéis aromáticos ou algum heteroátomo.

- **Detector de fluorescência:** É considerado um detector como boa sensibilidade a concentrações baixas. O modo de detecção deste detector, se dá na emissão de fótons por moléculas eletronicamente excitadas, sendo observadas, por exemplo, em hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e seus derivados, pois estes possuem grandes sistemas de anéis conjugados; estratégias de derivatização pré e pós coluna, são empregadas para compostos que não possuam estes grupos funcionais.

- **Detector Evaporativo com Espalhamento de Luz (ELSD):** É considerado um detector universal; as partículas das amostras são nebulizadas através de um sistema de nebulização por nitrogênio, e detectadas através da dispersão dos fótons ao atravessarem um feixe de luz policromática¹³.

A Figura 7 mostra os principais componentes que compõe um HPLC, que é basicamente constituído de um reservatório para fase móvel, uma bomba que controla a vazão da fase móvel, que irá ser transportada até a coluna cromatográfica, um amostrador automático ou manual, para inserção da amostra, que seguirá para uma coluna onde acontecerá a separação, e esta, por sua vez, estará instalada em um forno, um detector que responderá a variações de concentração, e por último um computador que analisará estes dados e comandará todo o conjunto descrito anteriormente.

Figura 7. Figura ilustrativa de um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Adaptado de SNYDER *et al.*, 2010)¹³

A Tabela 2 reúne as principais vantagens e limitações da técnica.

Tabela 2. Comparação das vantagens e limitações encontradas na cromatografia líquida de alta eficiência.

Vantagens	Limitações
Curto tempo de análise	Alto custo da instrumentação
Alta resolução	Alto custo de operação
Resultados quantitativos	Falta de detector universal sensível
Boa sensibilidade	Necessidade de experiência no seu manuseio
Versatilidade	
Automação	

2.2 Determinação de aminas

Aminas alifáticas (primárias, secundárias ou terciárias), assim como sais de amônio e aminas aromáticas são compostos nitrogenados de grande importância, utilizados seja como matéria-prima ou como intermediários na indústria química e farmacêutica, na síntese e produção de polímeros, plásticos, adesivos, corantes, fármacos, cosméticos, borracha, têxteis, agroquímicos, como inibidores de corrosão,

entre outras utilidades e aplicações. Ainda, várias aminas alifáticas são produtos de degradação de proteínas e aminoácidos e, podem ser encontradas em tecidos biológicos, e alimentos. O teor de aminas alifáticas em um dado alimento é em geral associado ao seu frescor, e o monitoramento de aminas passa a ser crucial no controle de qualidade, estocagem, e processo de distribuição desses alimentos. Aminas alifáticas e aromáticas são também reconhecidos poluentes ambientais, devido ao seu caráter tóxico, como irritantes da pele, mucosas e trato respiratório, assim como carcinogenicidade.

Dessa forma, a análise de aminas em várias matrizes de importância química, industrial, farmacêutica, clínico/forense, alimentícia, ambiental, em produtos naturais, etc., tem suscitado o interesse de diversos pesquisadores. Artigos de revisão para análise de aminas biogênicas^{14,15,16,17,18} e aminas aromáticas heterocíclicas¹⁹, em matrizes alimentícias são bastante comuns. Apesar de não estarem estritamente relacionadas com o tema dessa dissertação, tais compilações ajudam a melhorar o nosso entendimento sobre as possibilidades e estratégias de análise para aminas, num sentido mais amplo, e foram considerados na presente revisão.

Tradicionalmente, aminas têm sido monitoradas por cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*) acoplada a detectores convencionais e espectrometria de massas^{20,21}, dependendo da matriz estudada e do nível de concentração pretendido. No entanto, a análise direta de aminas alifáticas de baixa massa molecular requer o uso de colunas recheadas, ou de colunas recobertas com filmes espessos de materiais não convencionais²².

Aminas são também passíveis de análise por cromatografia líquida de alta eficiência, gerando métodos com certas limitações práticas. No modo reverso, aminas alifáticas são fracamente retidas em colunas contendo sílica modificada por C18 (octadecilsilica), como fase estacionária, e os picos em geral apresentam assimetria (cauda), devido à forte interação da amina com silanóis residuais nas partículas do recheio, requerendo eventualmente o uso de colunas mais modernas, contendo partículas de alta tecnologia (*core-shell*)²³. Além disso, o fato de certas aminas não possuírem grupamentos cromóforos ou fluoróforos inviabiliza o uso de detectores comuns, como o de absorvância no UV-visível, e o de fluorescência. Alternativas encontradas para análises rotineiras de tais aminas com detectores comuns empregam reações de derivatização, pré- ou pós-coluna^{24,25,26,27}; o uso de equipamentos mais sofisticados, como o espectrômetro de massas, com ou sem

acoplamento com HPLC, e novas técnicas de ionização, principalmente quando matrizes complexas são investigadas, tem se tornado mais presentes na literatura^{28,29}. Outros modos de separação tem sido revisitados recentemente para diversas aplicações, como a cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC, do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography*), e seu uso foi testado com sucesso na análise de aminas aromáticas em águas ambientais³⁰.

As análises de aminas por eletroforese capilar seguem fundamentalmente os mesmos preceitos empregados nas análises por HPLC já descritas acima, com algumas ressalvas. Além da possibilidade de derivatização^{31,32}, para adequar a análise de aminas alifáticas aos detectores comuns (UV-visível e fluorescência), em CE é possível implementar a detecção indireta. Nesse esquema de detecção, um agente cromofórico (ou fluorofórico), catiônico no caso, é adicionado ao eletrólito de corrida. A passagem do analito pelo detector desloca o cátion cromóforo e gera um pico negativo, que corresponde à ausência do sinal do cátion cromóforo; a área do pico negativo responde linearmente à concentração do analito. Tal conceito foi empregado na análise de inibidores de corrosão por CZE³³ e numa extensa compilação de métodos envolvendo amostras ambientais¹⁰. Cabe salientar que nas reações de derivatização, quando o aduto/derivado gerado é neutro, emprega-se a cromatografia eletrocínica micela. Para adutos/derivados carregados, emprega-se a CZE com detecção direta no UV-visível. A análise de aminas aromáticas é em geral conduzida por CZE, exemplos incluem matrizes como fluidos biológicos³⁴, e amostras ambientais de água com detecção por absorção no UV³⁵, e amperométrica³⁶.

A literatura de análise do N,N-dimetilaminopropilamina (DMAPA), analito de interesse para a presente dissertação, é bastante escassa. Constam apenas 3 artigos. Um método para análise de DMAPA em amostras de aminoamida graxa de coco e aminoamida undecilênica emprega cromatografia a líquido no modo isocrático (coluna ciano; fase móvel: metanol/acetato de sódio 80:20, pH 5), detecção no UV (218 nm), com o analito DMAPA derivatizado com salicilaldeído³⁷. O método apresentou boa precisão (%CV < 1), exatidão (recuperações na ordem de 97 – 101%), e linearidade ($R^2=0,9991$, faixa linear de 0,60 a 100 mg L⁻¹), com limites de detecção e quantificação de 0,13 mg L⁻¹ e 0,40 mg L⁻¹, respectivamente. Cinco amostras foram analisadas com tempo de análise menor que 5 min, apresentando teores de DMAPA da ordem de 0.36 a 0.97%.

Um segundo artigo demonstra a análise de DMAPA em alquilamido betainas utilizando cromatografia de íons com detecção condutimétrica, em colunas analíticas com grupamentos trocadores fosfônicos (troca catiônica) e fases móveis ácidas³⁸. O método permitiu a eluição do DMAPA em 10 min. Uma curva analítica processada compreendendo concentrações de DMAPA em CAPB de 5 a 25 mg L⁻¹ foi construída apresentando boa linearidade ($R^2=0,999$). Uma amostra comercial de CAPB foi acidulada, diluída 1/5, e submetida a SPE convencional (fase reversa, C18). O eluato foi então analisado apresentando um teor de DMAPA de 3,598 mg L⁻¹. O método apresentou boa precisão (4,8 %CV, calculado com os dados fornecidos no artigo) após injeções consecutivas de amostras fortificadas a 5 mg L⁻¹ e extraídas por SPE. Os autores afirmam que o método apresenta boa exatidão, mas não há nenhum parâmetro, ou procedimento indicativo de exatidão descrito no artigo. Há menção de limite de detecção da ordem de 25 µg L⁻¹, também sem descrição apropriada.

E, finalmente, um terceiro artigo reporta a determinação de impurezas em produtos cosméticos utilizando espectrometria de mobilidade iônica¹. Os autores demonstram a quantificação de DMAPA em amostras fortificadas de derivados graxos de amidopropildimetilamina, utilizando um método validado que exibiu excelente performance, e permitiu a identificação de origem do óleo empregado na formulação cosmética. O método apresentou boa precisão (%CV < 5), e linearidade ($R^2=0,997$, faixa linear de 0,030 a 0,0500 µg mL⁻¹), com limites de detecção e quantificação de 0,028 µg mL⁻¹ e 0,094 µg mL⁻¹, respectivamente.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3. Objetivos

Desenvolver e validar um método rápido e confiável para determinação de DMAPA em CAPB via eletroforese capilar (CE).

Aplicar o método validado, na determinação de DMAPA residual no tensoativo CAPB, produzido pela Clariant S/A.

Comparar os resultados obtidos pelo método adotado em uso pela Clariant S/A (cromatografia líquida de alta eficiência) e proposto (eletroforese capilar), na determinação de DMAPA em amostras industriais de CAPB.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

Os ensaios foram realizados em um sistema de eletroforese capilar (modelo PA800 Beckman Coulter Instruments, Fullerton, CA, EUA), o qual possui um sistema de detecção UV/VIS e software (32 Karat Version 8.0). Este equipamento faz a refrigeração do capilar pela passagem de um líquido refrigerante através de um cartucho que acondiciona o capilar.

Nos ensaios realizados neste método utilizando o modo CZE, utilizou-se capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), com revestimento externo de poliimida, com 75 μm de diâmetro interno (d.i), 375 μm de diâmetro externo (d.e) e 62 cm de comprimento total (48 cm de comprimento efetivo).

Também foi utilizado um HPLC (modelo 1200 Infinity, Agilent Technologies; Santa Clara, CA, EUA), equipado com detector UV/VIS e software (Open Lab Chem Station), uma coluna cromatográfica para fase reversa ODS - 3 (C18) GL Sciences, com dimensões: 4,6 mm x 150 mm, 5 μm . Foi utilizado na destilação das amostras, um destilador por arraste de vapor (modelo Kjelflex - K-360, BUCHI, New Castle, EUA).

Na medição dos pHs foram utilizados dois modelos de pHmetros (modelo 826 pH Mobile, Metrohm, Herisau, Suíça) e (modelo DM22, Digimed, São Paulo, Brasil).

Para pesagem das amostras, padrões e sais dos eletrólitos de corrida bem como para o preparo da fase móvel utilizada na determinação por HPLC, foram utilizados duas balanças analíticas, (modelo XS205, Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) e outra (modelo AB204, Mettler Toledo, Greifensee, Suíça).

A água utilizada em todos os ensaios foi obtida em dois equipamentos, que fornecem água tipo 1; são eles o sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e o ultra purificador de água Gehaka Master System (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Para a dosagem dos micros volumes utilizados na elaboração deste trabalho, foram utilizadas micropipetas de 50, 100, 200 e 1000 μL (modelo Research plus, Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

A destilação foi realizada no destilador por arraste de vapor (modelo Kjelflex - K-360, BUCHI, New Castle, EUA).

4.2 – Reagentes e soluções

Para todos os ensaios, foram utilizados reagentes de grau analítico e água desmineralizada.

Todas as soluções utilizadas na curva analítica foram destiladas e recolhidas conforme metodologia descrita na seção 4.4 desta dissertação.

Os sais utilizados para o preparo do eletrólito de corrida para o CE foram compostos de imidazol (PA, Merck, Alemanha) e HIBA (ácido alpha hidroxibutirico) (PA, Sigma Aldrich, Alemanha). As soluções estoque do eletrólito foram preparadas a partir das soluções de imidazol e HIBA, ambos com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, diluídos para a concentração de trabalho de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com pH acertado para 4,0. Para o acerto do pH deste eletrólito foi utilizado uma solução de HCl (PA, Synth, Brasil) com concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma solução NaOH (PA, Merck, Alemanha) com concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada no condicionamento dos capilares.

Foi utilizado o sulfato de $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Alemanha), em uma concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, como padrão interno, e DMAPA (Merck, Alemanha), como padrão para uso na curva analítica e na fortificação das amostras de CAPB (Clariant S/A, Suíça).

O CAPB possui um aspecto líquido límpido levemente amarelo, com ativo na faixa de 29 a 31%, presença de aproximadamente 5% de NaCl em sua composição e pH de aproximadamente 6,6.

Para o preparo da fase móvel utilizada no HPLC, foram utilizados acetonitrila (grau HPLC, Merck, Alemanha), isopropanol (grau HPLC, Merck, Alemanha), ácido fosfórico (PA, Merck, Alemanha) e perclorato de sódio (PA, Merck, Alemanha). Na derivatização do DMAPA para essa metodologia, foram utilizados etanol (PA, Merck, Alemanha) e trietilamina (PA, Merck, Alemanha).

A limpeza de todos os vials e vidrarias utilizadas nestes ensaios foi realizada com detergente Maxtran Neutro (Merck, Alemanha).

4.4 - Preparo da curva analítica e amostras

Para o preparo da curva analítica, foram realizadas diluições a partir de uma solução de DMAPA com concentração de 10000 mg L^{-1} .

Com o auxílio das micropipetas de $100 \text{ }\mu\text{L}$ e $1000 \text{ }\mu\text{L}$, as soluções descritas na Tabela 3 foram preparadas, fortificando uma massa aproximada de 50 g de CAPB (lote:BRAC325687), pesadas diretamente nos tubos de destilação.

Tabela 3. Descrição das alíquotas de DMAPA e massa de CAPB para elaboração da curva analítica.

<i>Alíquota de DMAPA da solução estoque a 10000 mg L^{-1} (μL)</i>	<i>Massa de CAPB (g)</i>	<i>Concentração DMAPA (mg kg^{-1})</i>
10	50	2,0
30	50	6,0
50	50	10,0
75	50	15,0
100	50	20,0

Após a adição das alíquotas descrita na Tabela 3, foi adicionada uma massa de aproximadamente $10,0 \text{ g}$ de CaCO_3 .

O acerto do pH nesta mistura para 10,5, foi realizado com a adição da solução de $\text{NaOH } 11,0 \text{ mol L}^{-1}$.

A destilação foi realizada no destilador por arraste de vapor com 30% de potência da caldeira e tempo de destilação de 600 s. O destilado foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL contendo água desmineralizada a um pH de 3,5, acertado com solução de $\text{HCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

As amostras foram preparadas da mesma forma que as soluções dos padrões, porém sem a adição das alíquotas de DMAPA, e processadas no destilador.

CAPÍTULO 5

DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

5.1 – Otimização das condições de análise

O método eletroforético aplicado à determinação de DMAPA em CAPB, foi baseado no trabalho realizado por Pereira *et al.*, onde foram analisadas as aminas monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEOA), dietiletanolamine (DEEA), monociclohexilamina (MCHA) e diciclohexilamina (DCHA), provenientes de inibidores de corrosão voláteis³³.

O eletrólito utilizado para o estudo mencionado acima, foi composto por imidazol, ácido 2-hidroxisobutírico (HIBA) e 18-coroa-6 éter, todos na concentração de 0,01 mol L⁻¹ ajustando o pH para 4,0.

Na aplicação de determinação de DMAPA em CAPB, as concentrações do imidazol e HIBA foram as mesmas, e não foi necessária a adição do complexante 18-coroa-6 éter. A separação pode ser visualizada no eletroferograma da Figura 8.

Figura 8. Eletroferograma de uma solução padrão de DMAPA, com concentração de 1000 mg kg⁻¹, em 100 mg de CAPB sem processá-lo por destilação. Composição do eletrólito: imidazol 0,01 mol L⁻¹ / HIBA 0,01 mol L⁻¹; pH 4,0. Capilar: 62 cm de comprimento, 48 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i X 375 µm d.e. Condições instrumentais: injeção eletrocínica, 10 kV durante 5 s; detecção indireta no comprimento de onda 214 nm; e tensão de +25 kV.

Na separação da Figura 8, o pH do eletrólito foi acertado com uma solução de HCl 1,0 mol L⁻¹, para 4,0, com o propósito de protonar o DMAPA (valores de pKa: pK₁ = 3,4; pK₂ = 5,3), possibilitando sua análise via CZE, como cátion.

Inicialmente, durante o desenvolvimento da metodologia não foi aplicado nenhum tratamento na amostra, a fim de isolar o DMAPA de sua matriz (CAPB), apenas foi dissolvido o CAPB diretamente em água desmineralizada.

Foram testadas diversas condições na metodologia para alcançar a especificação solicitada ($\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$), compiladas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Estudo para determinação da massa de CAPB, tempo de injeção da amostra e plug de água, com injeção hidrodinâmica.

Testes Realizados	Variações Aplicadas
Massa de amostra	100, 200, 300, 400 e 500 mg em 10 mL de água desmineralizada.
Tempo de injeção da amostra	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 s
Tempo de injeção do plug de água (Stacking) anterior à amostra	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 s

Tabela 5. Estudo para determinação da massa de CAPB, tempo de injeção da amostra e plug de água, com injeção eletrocinética.

Testes Realizados	Variações Aplicadas
Massa de Amostra	100, 200, 300, 400 e 500 mg em 10 mL de água desmineralizada.
Tensão aplicada na injeção da amostra	5 e 10 kV
Tempo de Injeção da amostra	5, 10, 20, e 30 s
Tempo de injeção do plug de água (Stacking) anterior à amostra	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 s

Em todos os ensaios das tabelas 6 e 7 foi utilizado um capilar de 62 cm de comprimento total; 48 cm de comprimento efetivo; 75 μm d.i x 375 μm d.e; pressão de 0,5 psi na injeção (no modo de injeção hidrodinâmica); comprimento de onda de 214 nm; detecção indireta e tensão aplicada na separação de +25 kV.

Estas avaliações foram realizadas, preparando independentemente para cada teste, 7 amostras de CAPB contaminadas com 1000 mg kg^{-1} de DMAPA utilizando trietilamina (TEA) na concentração de 50 mg kg^{-1} como padrão interno.

Foram testados inicialmente como padrão interno, o hidróxido de amônio, porém, este migrou no mesmo tempo que o analito (DMAPA); também foi avaliado o cloreto de potássio, e foi observado que o potássio é um contaminante natural do CAPB, oriundo das matérias primas utilizadas em sua fabricação.

As Tabelas 6 e 7, demonstram as melhores condições encontradas após as análises, para os dois modos de injeção estudados nas condições das Tabelas 4 e 5 e os respectivos eletroferogramas estão registrados nas Figuras 9 e 10.

Tabela 6. Melhor condição encontrada com modo de injeção hidrodinâmica (100 mg de massa de CAPB).

Injeção Hidrodinâmica	
Condições Instrumentais	Condição Aplicada
Modo de Injeção	Hidrodinâmica
Tempo de Injeção	5 s
Pressão de Injeção	0,5 psi

Tabela 7. Melhor condição encontrada com modo de injeção eletrocinética (100 mg de massa de CAPB).

Injeção Eletrocinética	
Condições Instrumentais	Condição Aplicada
Modo de Injeção	Eletrocinética
Voltagem aplicada na injeção	10 kV
Tempo de Injeção	5 s

Figura 9. Eletroferograma da melhor condição encontrada com modo de injeção hidrodinâmica. (Composição do eletrólito: imidazol / HIBA 0.01 mol L⁻¹; pH 4,0. Capilar: 62 cm de comprimento ; 48 cm de comprimento efetivo ; 75 um d.i X 375 um d.e. Condições instrumentais: injeção hidrodinâmica, pressão 0.5 psi durante 5 s, detecção indireta no comprimento de onda 214 nm; tensão de +25 kv. Amostra de CAPB (100 mg/10 mL) fortificada com padrão DMAPA 1000 mg kg⁻¹ e TEA 50 mg kg⁻¹)

Figura 10. Eletroferograma da melhor condição encontrada com modo de injeção eletrocinética. (Composição do eletrólito: imidazol / HIBA 0.01 mol L⁻¹; pH 4,0. Capilar: 62 cm de comprimento; 48 cm de comprimento efetivo; 75 um d.i X 375 um d.e. Condições instrumentais: injeção eletrocinética, 10 kV durante 5s, detecção indireta no comprimento de onda 214 nm; tensão de +25 kv. Amostra de CAPB (100 mg/10 mL) fortificada com padrão DMAPA 1000 mg kg⁻¹ e TEA 50 mg kg⁻¹).

As duas condições de injeção otimizadas, foram avaliadas com base na relação de Sinal / Ruído (S/R) para o pico de DMAPA e coeficiente de variação (%CV) da área relativa, como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8. Avaliação do melhor S/R e %CV da área relativa para as duas condições de injeção otimizadas.

Modo de Injeção	S/R *	%CV
Injeção Hidrodinâmica	345	1,31
Injeção Eletrocinética	316	9,82

* Ruído= $1/5 E_{p-p}^{39}$.

Entre os dois modos de injeção avaliados, a injeção hidrodinâmica apresentou melhor resultado, tanto em termos de S/R quanto %CV, porém, esperava-se uma melhor performance da metodologia que emprega a injeção eletrocinética, no que se concerne a S/R.

Uma possível causa deste resultado é a presença de subprodutos na matriz (CAPB) tais como: glicolato de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e ácido monocloroacético, além do próprio DMAPA; o cátion Na^+ é injetado preferencialmente durante a injeção eletrocinética, devido a sua alta mobilidade, o que deve diminuir substancialmente o teor de DMAPA no plug de amostra injetado.

Após a otimização das condições de injeção, foram realizadas várias injeções de CAPB fortificado com concentrações de 10 a 100 mg kg⁻¹ de DMAPA, para avaliar preliminarmente qual seria a menor concentração detectável por estes dois modos, com base ainda na avaliação S/R e %CV destes ensaios.

Os ensaios estão documentados na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação entre o modo de injeção hidrodinâmica e eletrocinética, para concentrações crescentes de DMAPA.

Concentração DMAPA (mg.kg ⁻¹)	Injeção Hidrodinâmica		Injeção Eletrocinética	
	S/R*	%CV**	S/R*	%CV**
10	5,0	48	9,9	39
20	8,6	20	17	14
30	12	18	16	39
40	15	9,9	15	26
50	43	3,6	22	41
100	-	-	54	5,2

* Ruído = $1/5 E_{p-p}$ ³⁹

** 10 injeções consecutivas

Para o modo de injeção hidrodinâmica, a concentração com maior S/R e menor %CV para 10 injeções sucessivas, foi a concentração de 50 mg kg⁻¹, e para o modo de injeção eletrocinética foi a concentração de 100 mg kg⁻¹. Não foram obtidos resultados para concentração de 100 mg kg⁻¹ na injeção hidrodinâmica, pois o pico apresentou perfil disperso não sendo possível integrá-lo corretamente. Apesar de se ter atingido o limite de especificação para DMAPA exigido pelos clientes (10 mg kg⁻¹ deste contaminante), a repetibilidade do método está bastante comprometida (alta %CV). Sendo assim, os resultados encontrados até o momento mostraram inadequados para o controle de DMAPA em CAPB. Após estes testes, foi constatado que a matriz do produto interfere negativamente na determinação do DMAPA, nas duas metodologias, sendo que na metodologia que emprega injeção eletrocinética, a presença de sais de sódio que compete com a injeção do DMAPA é a provável causa, e na metodologia que emprega injeção hidrodinâmica, a viscosidade da solução de CAPB injetada, pode ser a causa da variabilidade encontrada.

Então, foram iniciadas tentativas para isolar o DMAPA do CAPB, através de extrações líquido/líquido, líquido/sólido, precipitação do tensoativo, e por destilação simples.

Na extração líquido/líquido (LLE, do inglês liquid-liquid extraction), o pH de uma solução de 1,0 g de CAPB dissolvido em 25 mL de água, fortificado com 10 mg kg⁻¹ de DMAPA, foi acertado para 11,0, com a adição de NaOH 11,0 mol L⁻¹,

e em seguida, a solução foi extraída com três porções de 10 mL de clorofórmio em um funil de separação. Logo em seguida os extratos de clorofórmio combinados foram transferidos para um outro funil de separação onde foram realizadas extrações com água acidulada a pH 4,0, com HCl 1,0 mol L⁻¹ em três porções de 10 mL.

A extração líquido-líquido descrita acima, se baseia no controle do pH: na primeira etapa, um aumento de pH para 11,0, deixaria o DMAPA neutro ou desprotonado, facilitando sua extração para o clorofórmio e em seguida, seria usada uma solução ácida a pH 4,0, onde o DMAPA estaria protonado, sendo extraído pela sua maior afinidade com a água nesta forma.

O extrato aquoso foi injetado no equipamento de CE utilizando as condições citadas nas Tabelas 6 e 7, para avaliar uma possível melhora no sinal de DMAPA, porém não houve melhora significativa. Também foram testados os solventes diclorometano e acetonitrila, e os resultados encontrados foram os mesmos.

Uma extração em fase sólida (SPE, do inglês solid-phase extraction), utilizando cartuchos de troca iônica (Strata-X –C da Phenomex) foi testado, porém o protocolo de eluição após a passagem da amostra pelo cartucho, solicitava a eluição em uma solução hidróxido de amônio 5% em metanol, e esta solução interfere na análise eletroforética do DMAPA, pois o pico do cátion amônio elui no mesmo tempo de migração que o analito de interesse.

Também foram realizados testes com cartuchos C18 (C148-E e C18-SDB-L da Phenomex), passando a solução de CAPB a pH 7,0, fortificada da mesma forma descrita nas extrações anteriores, estando neste pH, o DMAPA na forma protonada e o CAPB na forma neutra. A solução recolhida após a passagem pelos cartuchos foi analisada e também não houve melhoria na resposta de sinal de DMAPA.

Em outro teste, usando este mesmo protocolo de SPE, o CAPB foi dissolvido em uma solução a 20% metanol em água com a finalidade de romper a micela do tensoativo, liberando o contaminante DMAPA, para retenção na fase estacionária do cartucho, entretanto, não houve resposta positiva na melhora do sinal de DMAPA, na análise eletroforética posterior.

Com o propósito de isolar o DMAPA de sua matriz, foi tentada uma precipitação em água dura (solução aquosa saturada de cloreto de cálcio), e em seguida, o pH da solução foi aumentado para aproximadamente 11,0, a fim de

desprotonar o DMAPA, liberando-o de sua matriz, porém, novamente não foi observada uma melhora significativa no sinal do DMAPA.

Após este teste, também foi tentado realizar uma destilação simples, com uma solução de 1,0 g de CAPB dissolvido em 25 mL de água, fortificada com 10 mg kg^{-1} de DMAPA, e pH acertado para 11,0 com a adição de NaOH 11 mol L^{-1} , novamente sem resposta positiva para a melhoria do sinal de DMAPA na solução destilada.

Todos os testes descritos anteriormente, também foram realizados sem a presença de CAPB, apenas em água desmineralizada contaminada com 100 mg.L^{-1} de DMAPA, e entre todos os testes realizados, apenas o da destilação simples, houve a detecção de DMAPA após a destilação.

Tal constatação serviu de base para o aprimoramento desta destilação, sendo aplicada como *clean-up* para a metodologia final deste trabalho, onde o limite de quantificação pretendido para DMAPA em CAPB foi atingido com sucesso.

O aprimoramento da metodologia de destilação se baseou também na forma como este reagente residual é eliminado durante sua fabricação de CAPB, onde é realizada por adição de vapor superaquecido ao produto, fazendo uma destilação por arraste de vapor.

Um destilador por arraste de vapor de bancada foi utilizado nesta etapa para mimetizar o processo de destilação utilizado na produção.

Neste novo teste, a uma solução de CAPB fortificada com 10 mg kg^{-1} DMAPA, pH acertado para aproximadamente 11,0, com uma solução de NaOH 11 mol L^{-1} , foi realizada a adição de aproximadamente 10 g de carbonato de cálcio, sal que possibilita a liberação do DMAPA da matriz de CAPB por deslocamento, já que a interação do carboxilato com o Ca^{2+} é mais forte que o DMAPA protonado com o carboxilato (par iônico).

A Figura 11 mostra a ligação entre o átomo de Ca^{2+} e o grupo carboxilato, presente na estrutura química do CAPB.

Figura 11. Ilustração da ligação entre o íon Ca^{2+} e o grupo carboxilato presente na estrutura química do CAPB, favorecendo sua precipitação e liberando o DMAPA para ser posteriormente destilado por arraste com vapor.

Os resultados encontrados foram promissores, pois diferentemente de outras metodologias até aqui testadas, o sinal de DMAPA analisado pelo método descrito na Tabela 7, teve um aumento considerável de intensidade.

Um novo método de preparo de amostra com destilação por arraste de vapor foi então estudado. Uma avaliação preliminar se deu após a destilação de um ponto médio da curva analítica proposta para a análise de DMAPA, que utiliza 15 mg kg^{-1} , fortificado com $100 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão interno de sulfato de lítio de concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os itens avaliados são descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Estudo para determinação da melhor condição a ser aplicada a metodologia eletroforética com modo de injeção hidrodinâmico (solução de 50 g de CAPB fortificado com DMAPA 15 mg kg^{-1} e $100 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão interno de sulfato de lítio de concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, processada).

Testes Realizados	Variações Aplicadas
Tempo de Injeção	5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 s
Plug de água (Stacking)	Sim / Não

Tabela 11. Estudo para determinação da melhor condição a ser aplicada a metodologia eletroforética com modo de injeção eletrocinético (solução de 50 g de CAPB fortificado com DMAPA 15 mg kg⁻¹ e 100 µL de padrão interno de sulfato de lítio de concentração de 1,0 mmol L⁻¹, processada).

Testes Realizados	Variações Aplicadas
Tensão aplicada na injeção	2, 5 e 10 kV

As Tabelas 12 e 13 demonstram as melhores condições encontradas após as análises, variando as condições descritas nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 12. Estudo para determinação da melhor condição a ser aplicada a metodologia eletroforética com modo de injeção hidrodinâmica (solução de 50 g de CAPB fortificado com DMAPA 15 mg kg⁻¹ e 100 µL de padrão interno de sulfato de lítio de concentração de 1,0 mmol L⁻¹, processada).

Injeção Hidrodinâmica	
Condições Instrumentais	Condição Aplicada
Modo de Injeção	Hidrodinâmica
Tempo de Injeção	5 s
Pressão de Injeção	0,5 psi
Plug de água (Stacking)	Sim (5s)

Tabela 13. Estudo para determinação da melhor condição a ser aplicada a metodologia eletroforética com modo de injeção eletrocinético (solução de 50 g de CAPB fortificado com DMAPA 15 mg kg⁻¹ e 100 µL de padrão interno de sulfato de lítio de concentração de 1,0 mmol L⁻¹, processada).

Injeção Eletrocinética	
Condições Instrumentais	Condição Aplicada
Modo de Injeção	Eletrocinética
Tensão aplicada na injeção	10 kV
Tempo de Injeção	5 s

A metodologia que apresentou melhor detectabilidade com a amostra destilada foi avaliada com base relação na S/R e %CV da área relativa, como demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação dos modos de injeção eletroforética otimizados com amostra destilada.

Modo de Injeção	S/R*	%CV
Hidrodinâmica	316	1,6
Eletrocínética	2293	1,3

* Ruído = $1/5 E_{p-p}$ ³⁹

Após a definição da melhor condição do método de corrida a ser utilizado para a amostra destilada preliminarmente testada, o método de destilação foi otimizado, a fim de se determinar as condições ideais para os seguintes parâmetros:

- Massa de CAPB a ser destilada;
- pH ótimo de preparo de amostra e recolhimento do destilado;
- Volume do destilado;
- Potência da caldeira de vapor de água;
- Tempo de destilação.

5.2 – Otimização da destilação por arraste de vapor

5.2.1 - Massa de CAPB a ser destilada

Para a avaliação de massa do CAPB, foram testadas duas massas diferentes, 50 e 100 g, pois devido à necessidade de um limite de quantificação baixo, a quantidade de massa de amostra pesada influencia diretamente neste parâmetro.

A avaliação da melhor massa de CAPB a ser utilizada foi obtida fortificando as mesmas (50 e 100 g) com 30 mg kg^{-1} de DMAPA e $100 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão interno de $\text{Li}_2(\text{SO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Também foi avaliado o coeficiente de determinação (R^2), pois apenas a repetitividade não assegura a avaliação da melhor massa, pois a curva analítica é processada na matriz da amostra, com o propósito de eliminar interferências através da destilação por arraste de vapor.

As duas massas foram contaminadas com as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 mg kg^{-1} de DMAPA, com a adição de $100 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão interno de $\text{Li}_2(\text{SO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Os resultados encontrados nos testes destas massas são demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15. Avaliação da melhor massa de CAPB a ser utilizada para a elaboração da curva analítica, através da avaliação do melhor CV (fortificação de 30 mg kg⁻¹ de DMAPA para triplicata) e R² (curva analítica, intervalo de 5-25 mg kg⁻¹ de DMAPA).

Massa Testada (g)	%CV	R ²
50*	4,7	0,997
100	28	0,88

*A massa de 50 g propiciou os melhores resultados.

5.2.2 - pH ótimo de preparo de amostra e recolhimento do destilado

Para avaliação do pH ótimo de preparo de amostra e recolhimento do destilado foi utilizada uma massa de 50 g de CAPB, fortificada com 15 mg kg⁻¹ de DMAPA e adição de 100 µL de padrão interno Li₂(SO₄).H₂O 1,0 mmol L⁻¹.

As variações de pH nas duas situações, estão descritos na tabela 16.

Tabela 16. Estudo para determinação do melhor pH de preparo de amostra e recolhimento da amostra após destilação.

Testes Realizados	Variações de pH
Preparo da Amostra	9, 9,5, 10, 10,5, e 11
Recolhimento da amostra após destilação	2, 2,5, 3, 3,5 e 5,5

A metodologia que apresentou melhor resultado foi avaliada com base na relação S/R e %CV da área relativa dos picos, como demonstrado na tabela 17.

Tabela 17. Avaliação do melhor pH de preparo de amostra e recolhimento da amostra após destilação (fortificação de 30 mg kg⁻¹ de DMAPA para triplicata 50 g de CAPB).

Testes Realizados	pH Ótimo	S/R*	%CV
Preparo da Amostra	10,5	728	1,1
Recolhimento da amostra após destilação	3,5		

* Ruído = 1/5 E_{p-p}³⁹

5.2.3 - Volume do destilado

Foram avaliados dois volumes de recolhimento para a destilação, 50 e 100 mL, pois estes volumes são apropriados para o recolhimento do destilado, devido à necessidade de se adicionar um volume de 30 mL para cobrir a saída dos destilados a fim de minimizar a perda por volatilização do DMAPA.

A Figura 12, exemplifica este processo.

Figura 12. Processo de destilação do DMAPA por arraste de vapor.

Novamente os resultados foram avaliados com base na relação S/R e %CV da área relativa, como demonstrado na tabela 18.

Tabela 18. Avaliação do melhor volume para o recolhimento da amostra após destilação.

Volume de recolhimento do destilado (mL)	%CV	R ²
50	5,7	0,97
100	4,7	0,997

*O volume de 100 mL propiciou os melhores resultados.

Após a determinação da melhor condição de massa a ser pesada, pH de preparo e volume de recolhimento do destilado, a potência da caldeira que é responsável pela geração de vapor foi avaliada.

5.2.4 - Potência da caldeira de vapor de água

Utilizando as melhores condições alcançadas, foram testadas 3 potências de caldeira, 30, 60 e 100%. A avaliação foi realizada através da construção de uma curva analítica, com as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 mg kg⁻¹ de DMAPA, com a adição de 100 µL de padrão interno Li₂(SO₄).H₂O 1,0 mmol L⁻¹.

A potência que apresentou melhor desempenho foi avaliada com base no coeficiente de determinação, como demonstrado nas Figuras 13, 14 e 15.

Figura 13. Teste de caldeira com 100% de potência no processo de destilação do DMAPA por arraste de vapor.

Figura 14. Teste de caldeira com 60% de potência no processo de destilação do DMAPA por arraste de vapor.

Figura 15. Teste de caldeira com 30% de potência no processo de destilação do DMAPA por arraste de vapor.

A potência aplicada na caldeira que apresentou o melhor resultado foi a de 30%, a qual apresentou um R^2 de 0,997.

CAPÍTULO 6

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

6.1 – Parâmetros de Validação

6.1.1 – Seletividade

A avaliação da seletividade do método, foi obtida através da comparação do eletroferograma obtido do CAPB (Lote utilizado BRAC325687) sem fortificação e outro fortificado com 15 mg kg^{-1} de DMAPA, como demonstrado na Figura 16.

Figura 16 – Eletroferogramas sobrepostos de CAPB sem fortificação e CAPB fortificado com 15 mg.kg^{-1} de DMAPA, em 50 g de CAPB. Composição do eletrólito: imidazol / HIBA $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$; pH 4,0. Capilar: 62 cm de comprimento; 48 cm de comprimento efetivo; 75 μm d.i x 375 μm d.e. Condições instrumentais: injeção eletrocínica, 10 kV durante 5 s; detecção indireta no comprimento de onda 214 nm; e tensão de +25 kV.

6.1.2 – Linearidade, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para a construção da curva analítica, soluções padrão de DMAPA destiladas foram injetadas em um intervalo de concentração entre 2,0 e 20 mg kg⁻¹ (com adição de 100 µL de Li₂(SO₄).H₂O 1,0 mmol L⁻¹, como padrão interno). A curva analítica foi construída com base na razão das áreas dos picos do DMAPA e do padrão interno, versus a concentração e posterior regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Figura 17. Curva analítica processada do DMAPA.

O método apresentou linearidade com R^2 de 0,996, na faixa de calibração ensaiada, sendo que um método analítico é considerado linear, quando seu coeficiente de determinação for acima de 0,95, segundo o INMETRO, e 0,99 segundo a ANVISA.

Na Tabela 19 são resumidos os valores encontrados para os parâmetros da regressão linear. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o DMAPA foram de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ respectivamente.

Tabela 19. Validação do método para DMAPA em relação a linearidade, limite de detecção e quantificação.

Parâmetros	Dados estatísticos
Faixa linear ^a (mg kg ⁻¹)	2,0 – 20
Coeficiente linear	0,048 ± 0,009
Coeficiente angular (S)	0,0190 ± 0,0007
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9955
Erro da regressão (s)	0,0105
Limite de detecção ^b (mg kg ⁻¹)	1,82
Limite de quantificação ^c (mg kg ⁻¹)	5,52

^a cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível

^b LOD = 3,3(s/S)

^c LOQ = 10(s/S)

O LOQ e o LOD do método também foram estimados através da relação S/R do pico do DMAPA. Para esta determinação, foram analisadas concentrações de DMAPA menores que o primeiro ponto da curva analítica (2,0 mg kg⁻¹), a fim de se encontrar uma relação S/R de 10. A Tabela 20 demonstra os valores encontrados.

Tabela 20. Avaliação do S/R do pico do DMAPA.

Concentração de DMAPA (mg kg ⁻¹)	S/R*	%CV
2,0 ^a	225	4,9
1,0 ^a	114	10,3
0,5 ^a	54	10,9

^a Injeção em triplicata de cada nível

* Ruído = 1/5 E_{p-p}³⁹³⁹

Com os resultados demonstrados na Tabela 20, foi traçada uma curva de regressão do S/R versus concentração de DMAPA, para realizar uma estimativa do LOD e LOQ. A Figura 18 apresenta esta curva.

Figura 18. Curva de correlação de concentrações próximas ao LOQ de DMAPA versus seus valores de S/R.

Os valores obtidos através desta curva para o LOD e LOQ, foram aproximadamente 0,03 mg kg⁻¹ e 0,1 mg kg⁻¹, respectivamente. Estes valores não corroboram com os valores obtidos da curva analítica, pois a relação S/R do DMAPA na concentração de 2,0 mg kg⁻¹ é de 225 (22,5 vezes maior que o LOQ).

6.1.3 – Precisão do método – intra-ensaio

A precisão foi obtida pela injeção de três níveis de concentração (2,0, 10 e 20 mg.kg⁻¹), com três determinações em cada nível.

A repetitividade foi obtida através dos coeficientes de variação (%CV), onde os valores obtidos na Tabela 21, individualmente para os valores ensaiados, foram menores que 5%, contatando uma boa precisão segundo Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos da ANVISA.

Tabela 21. Validação do método para DMAPA com relação repetilidade intra-ensaio

Concentração da amostra (mg kg ⁻¹) ^a	%CV
2,0	4,1
10	2,0
20	1,5

^a Três determinações para cada nível

6.1.4 – Aplicação do método a amostras de CAPB

Para demonstrar a aplicabilidade do método de quantificação do DMAPA em CAPB, desenvolvido neste trabalho, três lotes diferentes foram analisados por CE e também pela técnica utilizada atualmente na empresa Clariant S/A, que é via HPLC, onde o DMAPA reage com o fenilisotiocianato (PITC) em pH alcalino, formando um derivado de feniluréia. A separação do derivado de DMAPA de outros componentes é feita em uma coluna C18 com eluição por gradiente e sistema de detecção a 254 nm. A quantificação é realizada por padronização externa.

Os resultados encontrados na análise pelas duas técnicas são demonstrados na Tabela 22.

Tabela 22 – Validação do método para DMAPA com relação a exatidão (métodos independentes).

Lote de CAPB analisado ^a	DMAPA (mg kg ⁻¹)	DMAPA (mg kg ⁻¹)
	Via CE	Via HPLC
BRAC325687	< 2,0	9,0
BRAC340975	< 2,0	11,1
BRAC353052	< 2,0	11,0

^a Triplicata de preparo pada cada lote, para posterior análise nas duas técnicas.

Estes dados demonstram que os métodos não produzem resultados concordantes, pois há uma diferença muito grande nos valores encontrados entre as duas técnicas.

Isto provavelmente se deve a não seletividade apresentada pelo método HPLC, como demonstrado nas Figuras 19, 20 e 21, onde nota-se que há uma co-eluição de um pico presente no branco (todos os reagentes utilizados no preparo de amostra, menos a amostra), com o mesmo tempo de retenção do DMAPA ($\pm 10,313$ min).

Figura 19. Cromatograma da solução branco do preparo de amostra para determinação do DMAPA. Condições cromatográficas: Coluna: ODS - 3 (C18) GL Sciences (150 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel A: tampão perclorato (pesar 5,6 g de perclorato de sódio em um frasco de 2,0 L, pH ajustado para 3,2 usando a solução de ácido fosfórico 10%): isopropanol: acetonitrila (80:10:10 v/v), fase móvel B: acetonitrila vazão 1,0 mL/minuto, volume de injeção 25,0 μ L, detecção no ultravioleta a 254 nm, temperatura do forno 25 $^{\circ}$ C.

Figura 20. Cromatograma da solução de branco de preparo de amostra e padrão do DMAPA. Condições cromatográficas: Coluna: ODS - 3 (C18) GL Sciences (150 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel A: tampão perclorato (5,6 g $\pm$ 1,0 g de perclorato de Sódio em um frasco de 2,0 L, pH ajustado para 3,2 usando a solução de ácido fosfórico 10%): isopropanol: acetonitrila (80:10:10 v/v), fase móvel B: acetonitrila vazão 1,0 mL/minuto, volume de injeção 25,0 μ L, detecção no ultravioleta a 254 nm, temperatura do forno 25 $^{\circ}$ C.

Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas das soluções branco do preparo de amostra e padrão do DMAPA. Condições cromatográficas: Coluna: ODS - 3 (C18) GL Sciences (150 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel A: tampão perclorato (pesar 5,6 g de perclorato de sódio em um frasco de 2,0 L, pH ajustado para 3,2 usando a solução de ácido fosfórico 10%): Isopropanol: acetonitrila (80:10:10 v/v), fase móvel B: acetonitrila vazão 1,0 mL/minuto, volume de injeção 25,0 μ L, detecção no ultravioleta a 254 nm, temperatura do forno 25°C.

Portanto conclui-se com estes dados, que o método utilizado atualmente pela empresa na determinação de DMAPA em CAPB apresenta interferência, gerando um valor falso positivo de DMAPA, comprometendo a obtenção dos dados de exatidão do método por CE, via comparação entre estas duas técnicas.

CAPÍTULO 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. Considerações finais

O método proposto nesta dissertação para a análise de DMAPA em CAPB mostrou-se seletivo, linear, preciso e reprodutivo.

Além disso, pode-se constatar que o método proposto é 2,6 vezes mais rápido que o adotado na indústria (método HPLC, Clariant S/A), pois enquanto o método por HPLC utiliza aproximadamente 8,5 h para uma determinação de DMAPA em CAPB, o método por eletroforese utiliza aproximadamente 3,3 h.

A comparação da precisão e a exatidão entre os dois métodos não foi possível devido à falta de seletividade do método clássico atualmente em uso na Clariant S/A.

Contudo é possível concluir que o método CE, se apresenta como uma alternativa confiável e mais rápida na determinação de DMAPA no produto final, e também nas amostras de controle de CAPB, atingindo com folga o limite de DMAPA exigido no produto.

A exatidão do método para determinação de DMAPA em CAPB via CE se mostra necessária, uma vez que o método tradicional para determinação de DMAPA no tensoativo CAPB, utilizado atualmente pela Clariant S/A, não é seletivo, comprometendo a avaliação entre os dois métodos.

O método analítico por HPLC utiliza derivatização com fenil isotiocianato (PITC) para posterior detecção em um detector de UV; esta etapa de derivatização também pode ser desenvolvida para análise por eletroforese capilar utilizando MEKC, pois o composto formado nesta derivatização não possui carga, impossibilitando sua análise no modo CZE.

Atualmente a Clariant S/A não possui um instrumento de eletroforese capilar para controle de seus processos, e com este desenvolvimento realizado para controle de betaínas via CE, as possibilidades de investimento nesta técnica para análise de outras substâncias, se torna uma excelente alternativa, pois com os estudos realizados nesta dissertação, se torna evidente a capacidade analítica da técnica, bem como seu baixo consumo de reagentes e uma resposta muito mais rápida que outras técnicas atualmente utilizadas pela Clariant S/A.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS

8. Referências

- ¹ Zamora, D., Alcalá, M., Blanco, M. Determination of trace impurities in cosmetic intermediates by ion mobility spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 708, **2011**, 69-74.
- ² Sowa, J., *Catalysis of Organic Reactions*. New York: Taylor & Francis, **2005**.
- ³ Hunstman. Chemical Engineering World, <<http://www.cewindia.com>> acesso em 16 abril. **2016**.
- ⁴ Foti, C., Bonamonte, D., Mascolo, G., Corcelli, A., Labosso, S., Rigano, L., Angeline, G., The role of 3-dimethylaminopropylamine and amidoamine in contact allergy to Cocamidopropylbetaine. *Contact Dermatitis*, 48, **2003**, 194–198.
- ⁵ Bartoszmowi, PL, <http://nedo.gumed.edu.pl/wszpziu/skrypty/Atlas%20Dermatol/P_Derma/003P.pdf>, acesso em 16 de abril. **2016**.
- ⁶ Harvey, D. *Modern analytical chemistry*. New York: McGraw Hill, **2000**.
- ⁷ H. LAUER, H., P. ROZING, G., *High Performance Capillary Electrophoresis*, Agilent Technologies **2009**, 2-10.
- ⁸ Tavares, M. F. M. *Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos*. Química Nova, **1996**, v.19, p173-181.
- ⁹ Skoog, D.A; Holler, F.J; Nieman, T.A *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Boockman, 2006.
- ¹⁰ Tonin, F. G., Tavares, M. F. M. *Separation Strategies for Environmental Analysis*. In: Landers, J. P. (Ed.). *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. Boca Raton: CRC Press, **2008**, 3ª ed., cap. 31, p. 914-963.
- ¹¹ KHALEDI, M. G, *High-Performance Capillary Electrophoresis – Theory, Techniques, and Applications*, Chemical Analysis, v. 146, **1998**
- ¹² W.Dong, M., *Modern HPLC for Practicing Scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, **2006**.
- ¹³ Snyder, L.R., J.Kirkland., W.Dolan.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*: Wiley, **2010**.
- ¹⁴ Mohamed, G. I., Bashammakh, A. S., Alsibai, A. A., Alwael H., El-Shahawi, M. S. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *Trends Anal. Chem.*, 78, **2016**, 84-94.
- ¹⁵ Ordonez, J. L., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. del C., Callejon, R. M. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – a review. *Anal. Chim. Acta*, 939, 2016, 10-25.
- ¹⁶ Erim, F. B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends Anal. Chem.*, 52, **2013**, 239-247.
- ¹⁷ Onal, A., Tekkeli, S. E. K., Onal, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.*, 138, **2013**, 509-515.
- ¹⁸ Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V. High-performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Rev. Internat.*, 28, **2012**, 71-96.
- ¹⁹ Alaejos, M. S., Ayala, J. H., Gonzalez, V., Afonso, A. M. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *J. Chromatogr. B*, 862, **2008**, 15-42.

-
- ²⁰Akyuz, M. Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in ambient air and airborne particulate matters by gas chromatography-mass spectrometry. *Atmos. Environ.*, 42, **2008**, 3809-3819.
- ²¹Akyuz M., Ata, S. Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples by ion-pair extraction and gas-chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1129, **2006**, 88-94.
- ²²Sacher, F., Lenz, S., Brauch, H. J. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in wastewater and surface water by gas chromatography mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride. *J. Chromatogr. A*, 764, **1997**, 85-90.
- ²³Preti, R., Antonelli, M. L., Bernacchia, R., Vinci, G. Fast determination of biogenic amines in beverages by a core-shell particle column. *Food Chem.*, 187, **2015**, 555-562.
- ²⁴Manetta, A. C., Di Giuseppe, L., Tofalo, R., Martuscelli, M., Schirone, M., Giammarco, M., Suzzi, G. Evaluation of biogenic amines in wine: determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control*, 62, **2016**, 351-356.
- ²⁵Wang, C-Y., Tung, S-Y., Lo, Y-S., Huang, H-L., Ko, C-H. Sensitivity enhancement in the fluorometric determination of aliphatic amines using naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization followed by vortex-assisted-liquid-liquid microextraction. *Talanta*, 152, **2016**, 475-481.
- ²⁶Jastrzebska, A., Piasta, A., Kowalska, S., Krzeminski, M., Szlyk, E. A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines. *J. Food Comp. Anal.*, 48, **2016**, 111-119.
- ²⁷Hayat, A., Jahangir, T. M., Khuhawar, M. Y., Alamgir, M., Hussain, Z., Haq, F. U., Musharraf, S. G. HPLC determination of gamma amino butyric acid (GABA) and some biogenic amines (Bas) in controlled, germinated, and fermented brown rice by pre-column derivatization. *J. Cereal Sci.* 64, **2015**, 56-62.
- ²⁸Manikandan, M., Zazibwe, Z., Hasan, N., Deenadayalan, A., Gopal, J., Pradeep, T., Chun, S. Biological desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) – unequivocal role of crucial ionization factors, solvent system and substrates. *Trends Anal. Chem.*, 78, **2016**, 109-119.
- ²⁹Aznar, M., Canellas, E., Nerín, C. Quantitative determination of 22 primary aromatic amines by cation-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216, **2009**, 5176-5181.
- ³⁰Li, R., Zhang, Y., Lee, C. C., Lu, R., Huang, Y. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatographic method for determination of aromatic amines in environmental water. *J. Chromatogr. A*, 1217, **2010**, 1799-1805.
- ³¹Underberg, W. J. M., Waterval, J. C. M. Derivatization trends in capillary electrophoresis: an update. *Electrophoresis*, 23, **2002**, 3922-3933.
- ³²Xie, J., Li, Y., Zhang, J., Zeng, L., Lu, D., Liu, Y., Yang, Y., Sun, C. Simultaneous determination of four aliphatic amines in aquatic products by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction couples with high performance capillary electrophoresis. *Anal. Methods*, 6, **2014**, 5140-5146.
- ³³Pereira, E. A., Tavares, M. F. M. Determination of volatile corrosion inhibitors by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1051, **2004**, 303-308.
- ³⁴Swann, L. M., Forbes, S.L., Lewis, S.W. A capillary electrophoresis method for the determination of selected biogenic amines and amino acids in mammalian decomposition fluid. *Talanta*, 81, **2010**, 1697-1702.

-
- ³⁵Zhou, Q., Jiang, G., Liu, J., Cai, Y. Combination of microporous membrane liquid-liquid extraction and capillary electrophoresis for the analysis of aromatic amines in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 509, **2004**, 55-62.
- ³⁶Sun, Y., Liang, L., Zhao, X., Yu, L., Zhang, J., Shi, G., Zhou, T. Determination of aromatic amines in water samples by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Water Res.*, 43, **2009**, 41-46.
- ³⁷Prieto-Blanco, M. C., López-Mahía, P., Prada Rodríguez, D. Determination of dimethylaminopropylamine in alkylaminoamides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 35, **1997**, 265-269.
- ³⁸Koshti, N. M., Naik, S. D., Pai, N. R. Analysis of trace levels of toxic N,N-dimethylaminopropylamine in alkylamido-betaines by ion-chromatography. *J. Indian Chem. Soc.*, 79, **2002**, 450-451.
- ³⁹Jr.Ingle,J.D., Crouch, S.R., Spectrochemical Analysis. New Jersey: Prentice Hall, **1998**.