



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ELEILTON DA SILVA

Determinação de pK_a utilizando um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada

Versão da Dissertação Corrigida

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

31 de janeiro de 2022

ELEILTON DA SILVA

Determinação de pK_a utilizando um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplado

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Programa de Química).

Orientador:

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

d586d da Silva, Eleilton
Determinação de pK_a utilizando CE-C⁴D / Eleilton
da Silva. - São Paulo, 2022.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: do Lago, Claudimir Lucio

1. CE-C⁴D. 2. pK_a . 3. espécie de referência . 4.
padrão interno. 5. fator de correção. I. T. II. do
Lago, Claudimir Lucio , orientador.

AGRADECIMENTOS

Havendo algum brilho em mim, trata-se apenas do reflexo da luz que pude emanar daquelas pessoas que compartilharam do seu brilho. Algumas destas pessoas são:

Ao Fernando Silva Lopes por ser alguém tão especial na minha vida, e com certeza uma das suas características é deixar o dia mais alegre sob qualquer circunstância.

Ao Eric Tavares da Costa, por estar sempre disponível em dar o suporte necessário diante dos problemas e por compartilhar do seu vasto conhecimento.

À Andreza Santos de Souza, por sua relevante importância na construção de novos equipamentos e na sua destreza com *softwares* de Desenho Técnico, sem o qual este trabalho não teria o seu padrão de qualidade.

Ao professor Claudimir Lucio do Lago, por me aceitar como aluno e ter a paciência necessária para o meu desenvolvimento como cientista. Além disso, pelo tempo de dedicação e por estar sempre em prontidão para ajudar a resolver todos os problemas.

Ao professor Lucio Angnes e ao professor Ivano Gebhardt Rolf Gutz pela excelente recepção no laboratório e constante incentivo, seja na pesquisa ou na minha vida como aluno.

À Faculdade de Tecnologia de São Paulo, pela excelência na qualidade de ensino, infraestrutura e ser responsável pela minha preparação no ingresso ao Mestrado.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e ser exemplar naquilo que foi designado.

Ao CNPq pelo fomento.

Às pessoas que de alguma forma participaram direta ou indiretamente nesta minha trajetória.

“Quando um homem morre, pode ele viver novamente? Esperarei todos os dias do meu serviço obrigatório, até vir o meu livramento.”

(Jó 14:14)

“Pois bem, se proclamamos que Cristo ressuscitou dos mortos, por que alguns de vocês afirmam não haver ressurreição dos mortos? Pois, se não existe ressurreição dos mortos, Cristo não ressuscitou. Nesse caso, todos que adormeceram crendo em Cristo estão perdidos! Mas Cristo de fato ressuscitou dos mortos. Ele é o primeiro fruto da colheita de todos que adormeceram. Mas essa ressurreição tem uma sequência: Cristo ressuscitou como o primeiro fruto da colheita, e depois todos que são de Cristo ressuscitarão quando ele voltar.”

(1 Coríntios 15:12, 13, 18, 20, 23)

“Deus ressuscitou a esse Jesus, e disso todos nós somos testemunhas.”

(Atos 2:32)

“Mas Sião dizia: “Jeová me abandonou, Jeová se esqueceu de mim.” Será que uma mulher pode se esquecer do seu bebê, e não sentir compaixão pelo filho do seu ventre? Mesmo que essas mulheres se esquecessem, eu nunca me esqueceria de você. Veja! Gravei você na palma das minhas mãos!...”

(Isaías 49:14-16)

RESUMO

Silva, E. **Determinação de pK_a utilizando CE-C⁴D**. 2022. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O C⁴D é uma forma de detecção inédita para a caracterização de pK_a, e o trabalho apresenta duas novidades: a primeira é ser pioneiro na quantificação de pK_a utilizando um C⁴D, e a segunda é aplicar o fator de correção para correções de mobilidade efetiva, temperatura e a força iônica do meio, também inédito. Assim, o C⁴D foi utilizado conjuntamente com um equipamento de eletroforese capilar nomeado por BeerBox, ambos sendo manufaturados pelo laboratório onde este trabalho foi realizado. Os dados de mobilidade nessa configuração em função do pH se correlacionaram em (99,4 ± 0,2)% para a determinação de pK_a, mas o BeerBox apresentou um problema no sistema de injeção de modo a tornar a quantificação do valor de pK_a em 0,15 ± 0,05 inferior daquele encontrado na literatura para as espécies caracterizadas, isto é, acetato, benzoato, cloroacetato, fumarato, galato, aspartato, aspirina e HIBA. Em contrapartida, na utilização do equipamento comercial (Agilent Technologies modelo 7100) com um C⁴D manufaturado no laboratório onde este trabalho foi realizado, constatou-se a correlação entre a caracterização de valores de pK_a por este trabalho (utilizando um eletrólito de corrida de β-alanina: Cl⁻) em 99,70% com os dados que podem ser obtidos na literatura, e com eficiência de (97 ± 3)%. Apesar disso algumas considerações devem ser tomadas, e uma delas é que o coeficiente de atrito é uma variável importante na quantificação de pK_a utilizando a eletroforese capilar. Por exemplo, a elevação da concentração de β-alanina implica na redução da mobilidade efetiva das espécies em análise (inclusive daquelas totalmente ionizadas que deveriam permanecer inalteradas, neste trabalho nomeada por espécie de referência). Isso porque, a β-alanina eleva a viscosidade do eletrólito de corrida significativamente, consequentemente limitando a mobilidade efetiva das espécies, tanto do analito como das espécies de referência, em até 72% do valor máximo que elas poderiam assumir em diluição infinita. Assim, essas divergências de mobilidade impactam na exatidão da técnica frente a quantificação de pK_a. Em outras palavras, quando realizado a aplicação do fator de correção por uma espécie de referência o valor quantificado é o pK_a termodinâmico, e não o pK_a aparente porque foi utilizado como referencial uma espécie de referência com os seus dados expressos já em diluição infinita. Destaca-se que o fator de correção, teoricamente, corrige aspectos de temperatura porque tanto a espessura efetiva da atmosfera iônica, a viscosidade e o raio

hidrodinâmico dependem da temperatura. Basta quantificar o intervalo de temperatura onde a correção pode ser aplicada satisfatoriamente. Por fim, a combinação do método utilizando o padrão interno com a espécie de referência tornou a técnica utilizando a CE-C⁴D poderosa para a caracterização de pK_a, e com uma exatidão centesimal.

Palavras-chave: CE-C⁴D, pK_a, espécie de referência, padrão interno, fator de correção.

ABSTRACT

Silva, E. **Determination of pK_a using CE-C⁴D**. 2022. 95 p. Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

C⁴D is an unprecedented detection method for the characterization of pK_a, and the work presents two novelties: the first is to be a pioneer in the quantification of pK_a using a C⁴D, and the second is to apply the correction factor for effective mobility corrections, temperature and the ionic strength of the medium, also unprecedented. Thus, the C⁴D was used together with a capillary electrophoresis equipment named by BeerBox, both being manufactured by the laboratory where this work was carried out. The mobility data in this configuration as a function of pH correlated in (99.4 ± 0.2)% for the determination of pK_a, but the BeerBox had a problem in the injection system in order to make the quantification of the pK_a value in 0.15 ± 0.05 lower than that found in the literature for the characterized species, ie acetate, benzoate, chloroacetate, fumarate, gallate, aspartate, aspirin and HIBA. On the other hand, when using commercial equipment (Agilent Technologies model 7100) with a C⁴D manufactured in the laboratory where this work was carried out, a correlation between the characterization of pK_a values by this work (using a β- alanine: Cl-) in 99.70% with the data that can be obtained in the literature, and with an efficiency of (97 ± 3)%. Nevertheless, some considerations must be taken, and one of them is that the coefficient of friction is an important variable in the quantification of pK_a using capillary electrophoresis. For example, the increase in the concentration of β-alanine implies in the reduction of the effective mobility of the species under analysis (including those fully ionized that should remain unchanged, in this work named by reference species). This is because β-alanine significantly increases the running electrolyte viscosity, consequently limiting the effective mobility of the species, both the analyte and the reference species, to up to 72% of the maximum value they could assume in infinite dilution. Thus, these mobility divergences impact the accuracy of the technique in terms of pK_a quantification. In other words, when applying the correction factor by a reference species, the quantified value is the thermodynamic pK_a, and not the apparent pK_a because a reference species was used as a reference with its data already expressed in infinite dilution. It is noteworthy that the correction factor, theoretically, corrects temperature aspects because both the effective thickness of the ionic atmosphere, the viscosity and the hydrodynamic radius depend on the temperature. Just quantify the temperature range where the correction can be satisfactorily applied. Finally, the combination of the method using the internal standard with the reference species made the

technique using CE-C⁴D powerful for the characterization of pK_a, and with centesimal accuracy.

Keywords: *CE-C⁴D, pK_a, reference species, internal standard, correction factor.*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 Determinação dos valores de pK_a | 12 |
| 1.2 A primeira determinação de pK_a utilizando eletroforese | 13 |
| 1.3 Mobilidade aparente e efetiva..... | 14 |
| 1.4 Equações envolvidas..... | 15 |
| 1.4.1 Caracterização do valor de pK_a | 15 |
| 1.4.2 Translação no valor de pK_a | 17 |
| 1.4.3 Modelo matemático geral | 18 |
| 1.5 Detecção Condutométrica sem Contato | 20 |
| 1.5.1 A origem da detecção condutométrica | 20 |
| 1.5.2 Detecção Condutométrica sem Contato Capacitivamente Acoplada | 21 |
| 1.6 Eletrólise separada..... | 26 |
| 1.7 Eletroforese capilar, uma técnica de elevado potencial para múltiplas e simultâneas quantificações | 27 |
| 2 OBJETIVO..... | 28 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 28 |
| 3.1 Reagentes..... | 28 |
| 3.2 CE-C ⁴ D..... | 28 |
| 3.2.1 BeerBox..... | 28 |
| 3.2.1.1 Estrutura e configuração..... | 28 |
| 3.2.1.2 Eletrólise separada..... | 31 |
| 3.2.2 Agilent Technologies modelo 7100..... | 35 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 36 |
| 4.1 Dados obtidos com o equipamento comercial (Agilent Technologies modelo 7100)..... | 37 |
| 4.1.1 O uso de uma espécie de referência na eletroforese capilar | 37 |
| 4.1.2 Aplicação do fator de correção (δ) e a sua importância..... | 41 |
| 4.1.3 Determinação de pK_a para espécies monopróticas e polipróticas | 48 |
| 4.1.3.1 Determinação usando um modelo monoprótico..... | 48 |
| 4.1.3.2 Determinação usando um modelo poliprótico..... | 51 |
| 4.1.4 O uso de um padrão interno..... | 55 |
| 4.1.4.1 O uso de um padrão interno na eletroforese capilar | 55 |
| 4.1.4.2 O método do padrão interno | 56 |
| 4.1.5 Efetividade da Técnica | 58 |
| 4.2 Dados obtidos com um equipamento de eletroforese capilar manufacturado (BeerBox).... | 61 |
| 4.2.1 Utilizando o modelo linear | 61 |

| | |
|--|----|
| 4.2.2 A evidenciação de um problema | 66 |
| 5 CONCLUSÕES | 71 |
| 6 REFERÊNCIAS | 73 |
| APÊNDICE A – Eletroferogramas gerados utilizando o equipamento comercial | 79 |
| APÊNDICE B – Eletroferogramas gerados utilizando o BeerBox | 89 |
| SÚMULA CURRICULAR..... | 92 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Determinação dos valores de pK_a

O pK_a pode ser quantificado a partir da resposta da ionização/dissociação de uma espécie frente a variação do pH do meio, gerando uma curva não linear (figura 1.1) no qual a sua inflexão remete ao valor de pK_a daquilo que está sendo analisado.

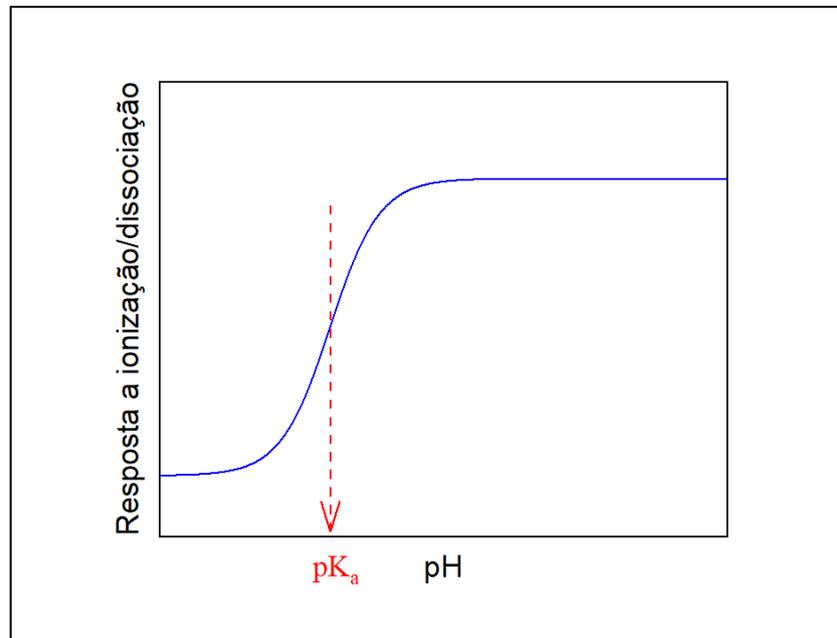


Figura 1.1 – Curva da resposta da ionização/dissociação em função do pH. A inflexão da curva corresponde ao pK_a .

A resposta a ionização/dissociação pode ser obtida pelas mais distintas técnicas possíveis. Porém na eletroforese a resposta é dada em termos da mobilidade, uma vez que o grau de ionização/dissociação do analito é associável com a mobilidade efetiva. Embora o modelo não linear seja mais prático na visualização qualitativa dos parâmetros de interesse, é necessário domínio em *softwares* de análise gráfica para obter tais parâmetros quantitativamente.

Por outro lado, as curvas podem ser linearizadas com o objetivo, em alguns casos, educacional porque o coeficiente angular está atrelado a constante de equilíbrio enquanto o coeficiente linear com a mobilidade efetiva da espécie caracterizada ¹⁻³ (ver equação 1.16), e um modelo linear, em termos didáticos, é muito mais fácil de ser interpretado matematicamente do que um que não seja linear. A figura 1.2 distingue a projeção teórica, para a técnica de eletroforese, de um modelo não linear e um modelo linearizado para o ácido benzoico.

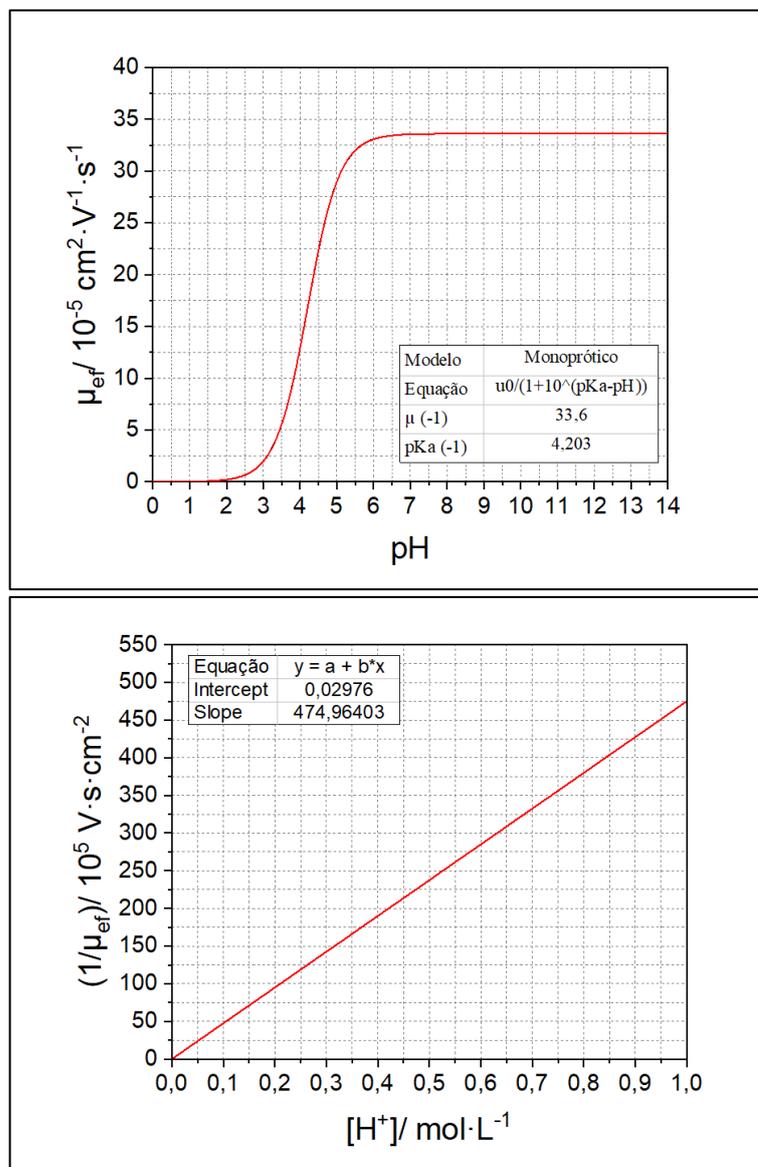


Figura 1.2 – Projeção teórica para o ácido benzoico com $pK_a = 4,203$ e mobilidade efetiva máxima igual a $33,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ em módulo. O modelo não linear foi projetado acima, e o linear abaixo.

1.2 A primeira determinação de pK_a utilizando eletroforese

A primeira correlação entre a mobilidade eletroforética de um ácido/base e o pH foi considerada quando Consden e Martin publicaram seu artigo sobre ionoforese em 1946 sobre a separação de dois analitos com base na diferença de pK_a entre ambos. Na década de 1950 a correlação foi explicitamente aplicada à estimativa das constantes de dissociação ácida por Waldron e por Kiso *et al* na década de 1960 usando uma tira de papel. No entanto, ainda que fosse utilizado uma quantidade diminuta de amostra, o método demonstrou ser inviável por ser impraticável. Somente nas próximas décadas ocasionaria à introdução dos capilares de sílica

fundida. Atualmente os valores de pK_a mais relevantes são aqueles em condições fisiológicas, isto é, em água a 37 °C e com força iônica a 0,9% de NaCl (154 mM). Por exemplo, dentre 700 páginas compiladas de valores de pK_a em uma biblioteca de dados somente metade é listada com detalhes em condições a 25 °C e força iônica nula ⁴.

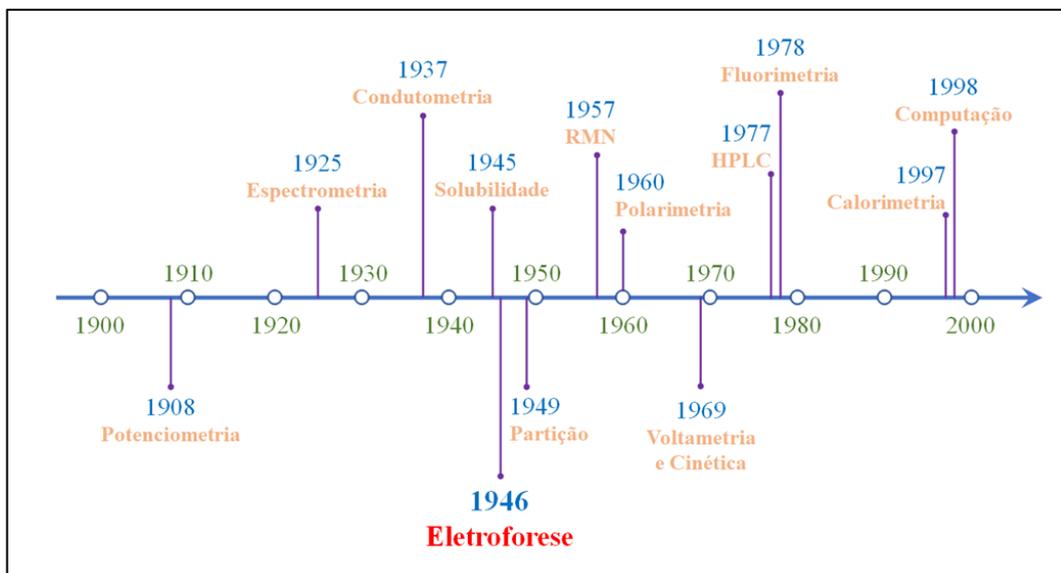


Figura 1.3 - Linha do tempo da primeira noção das várias técnicas para a determinação de pK_a .

Quando é comparado a determinação de pK_a no trabalho de um mesmo autor com a aplicação de distintas técnicas é esperado obter-se uma divergência na ordem de 0,2 no valor encontrado de pK_a entre as técnicas ^{5,6}. Porém, quando comparado entre distintos autores esses valores podem distinguir um dos outros em aproximadamente 0,5 ⁷.

1.3 Mobilidade aparente e efetiva

A mobilidade (μ) é definida como o coeficiente de proporção estabelecido quando uma espécie assume uma determinada velocidade (u) quando submetido a um campo elétrico (E). Evidentemente, a mobilidade pode ser escrita em termos da carga líquida da espécie (q) e do coeficiente de atrito (f) que o meio proporciona em oposição ao movimento ⁸, expresso pela equação 1.1:

$$u = \mu \cdot E = \left(\frac{q}{f}\right) \cdot E \quad (1.1)$$

O coeficiente de atrito por sua vez é dependente do raio hidrodinâmico da espécie (r) e da viscosidade do meio (η) dado pela equação 1.2:

$$f = 6\pi \cdot \eta \cdot r \quad (1.2)$$

No processo é levado em consideração que na presença de um campo elétrico, os cátions migram para o cátodo e os ânions para o ânodo. O excesso de cátions na parte difusa da dupla camada causado pelos grupo silanol, do capilar da sílica fundida, transfere o momento resultante na direção do cátodo e esta ação de bombeamento é denominada por fluxo de eletromose (EOF - *electroosmotic flow*)⁸. Experimentalmente, na eletroforese capilar, a mobilidade pode ser quantificada considerando que a mobilidade aparente (μ_{ap}) deve ter um valor de mobilidade referenciada em zero, no caso o fluxo eletrosmótico (μ_{EOF}) de acordo com a equação 1.3.

$$\mu_{ef} = \mu_{ap} - \mu_{EOF} \quad (1.3)$$

Uma espécie movendo-se na mesma direção do fluxo eletrosmótico, a mobilidade efetiva do analito e a mobilidade do EOF possuem o mesmo sinal, portanto a mobilidade aparente será maior do que deveria. Em contrapartida, para uma espécie movendo-se na direção contrária ao fluxo eletrosmótico a mobilidade efetiva do analito e a mobilidade do EOF apresentarão sinais contrários. Portanto, a mobilidade aparente será menor do que deveria. Logo, uma consequência imediata é que toda espécie que possuir um maior tempo de migração que o EOF terá mobilidade negativa, enquanto aquelas com o menor tempo de migração que o EOF possuirá uma mobilidade positiva. Isso sendo um impacto direto dos sentidos da mobilidade frente ao próprio sentido do EOF.

Considerando alguns aspectos físicos e manipulações algébricas na equação 1.3, a mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser determinada em termos da extensão máxima do capilar (L_t), do comprimento do capilar até o detector (L_d), da diferença de potencial aplicada (V), do tempo de migração do analito (t_m) e do tempo do fluxo eletrosmótico (t_{EOF}) da seguinte forma escrita na equação 1.4.

$$\mu_{ef} = \frac{L_d \cdot L_t}{V} \cdot \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (1.4)$$

1.4 Equações envolvidas

1.4.1 Caracterização do valor de pK_a

A equação que rege todo o processo de inferência depende da fração molar ionizada, $\alpha_{H_{n-i}A^{z-i}}$, sendo a magnitude dada pela mobilidade efetiva máxima que uma espécie que sofreu ionização possa assumir, $\mu_{H_{n-i}A^{z-i}}$ ^{9,10}. A letra n representa o número total de grupos ionizáveis, z é carga máxima assumida pela espécie, e i varia de 0 a n . Logo:

$$\mu_{ef} = \sum_{i=0}^n \alpha_{H_{n-i}A^{z-i}} \cdot \mu_{H_{n-i}A^{z-i}} \quad (1.5)$$

O problema a ser inicialmente elaborado é este: como é possível descrever a fração molar matematicamente em termos da constante de acidez? A resposta para esta pergunta pode ser respondida inicialmente para um ácido monoprótico que sofre a seguinte ionização



Obviamente, a constante de acidez (K_a) pode ser escrita em termos das atividades (a_{H^+} , a_{A^-} , a_{HA}) em:

$$K_a = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{HA}} = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \cdot \left(\frac{\gamma_{H^+} \cdot \gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}} \right) \quad (1.7)$$

Quando ocorre a desconsideração dos coeficientes de atividade (γ_{H^+} , γ_{A^-} , γ_{HA}) e a constante de acidez passa a ser escrita somente em termos da concentração analítica ($[H^+]$, $[A^-]$, $[AH]$), temos então a chamada constante de acidez aparente (K_a^{apar}):

$$K_a^{apar} = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[AH]} \quad (1.8)$$

Sendo a concentração de $[HA]$ dada por:

$$[HA] = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{K_a^{apar}} \quad (1.9)$$

Levando em consideração que a concentração máxima (C_t) do ácido é determinada pela fração que sofreu ionização (C_{A^-}), mas também por aquela que não sofreu ionização (C_{HA}). Teremos:

$$C_t = C_{HA} + C_{A^-} \quad (1.10)$$

Aplicando a equação 1.9 na equação 1.10, a concentração total de um ácido monoprótico pode ser escrita por

$$C_t = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{K_a^{apar}} + [A^-] = [A^-] \cdot \left[1 + \frac{[H^+]}{K_a^{apar}} \right] \quad (1.11)$$

Onde finalmente a fração molar que sofreu ionização para um ácido monoprótico é dada por:

$$\alpha_{A^-} = \frac{[A^-]}{C_t} = \frac{[A^-]}{[A^-] \cdot \left[1 + \frac{[H^+]}{K_a^{apar}} \right]} \quad (1.12)$$

$$\alpha_{A^-} = \frac{K_a^{apar}}{K_a^{apar} + [H^+]} \quad (1.13)$$

Em contrapartida, a fração molar que não sofreu a ionização é expressa como

$$\alpha_{HA} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a^{apar}} \quad (1.14)$$

Assim, considerando a aplicação da equação 1.13 na equação 1.5, para um ácido monoprotico a curva não linear é descrita matematicamente por:

$$\mu_{ef} = \left(\frac{1}{1 + 10^{pK_a^{apar} - pH}} \right) \cdot \mu_{A^-} \quad (1.15)$$

Por outro lado, a equação 1.15 pode ser linearizada do seguinte modo:

$$\frac{1}{\mu_{ef}} = \left(\frac{1}{K_a^{apar} \cdot \mu_{A^-}} \right) \cdot [H^+] + \frac{1}{\mu_{A^-}} \quad (1.16)$$

1.4.2 Translação no valor de pK_a

Na consideração das sucessivas ionizações de um ácido poliprotico é esperado que ocorra uma correção pela desconsideração dos coeficientes de atividades, pela consequência imediata da equação de Debye-Hückel porque em um laboratório a concentração analítica é mais fácil de ser obtida do que o coeficiente de atividade. Havendo as sucessivas ionizações (equações de 1.17 a 1.20) ocorrendo, é esperado os seguintes desvios para os valores de pK_a termodinâmico (pK_{an}^{term}) ¹¹⁻¹⁸:

$$pK_{a1}^{term} = pK_{a1}^{apar} - \log(\gamma_1) \quad (1.17)$$

$$pK_{a2}^{term} = pK_{a2}^{apar} - \log(\gamma_2) + \log(\gamma_1) \quad (1.18)$$

$$pK_{a3}^{term} = pK_{a3}^{apar} - \log(\gamma_3) + \log(\gamma_2) \quad (1.19)$$

⋮

$$pK_{an}^{term} = pK_{an}^{apar} - \log(\gamma_n) + \log(\gamma_{n-1}) \quad (1.20)$$

Onde nas equações acima pK_{an}^{term} é o pK_a termodinâmico, pK_{an}^{apar} o pK_a aparente, n representa o número total de grupos ionizáveis, e o coeficiente de atividade (γ) que é dado por:

$$-\log(\gamma) = \frac{Az^2\sqrt{I}}{1 + Br\sqrt{I}} \quad (1.21)$$

Na equação 1.21 A e B dependem da constante dielétrica do meio e da temperatura do solvente, sendo equivalente para a água quimicamente pura a 25 °C em $0,5085 \text{ L}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ e $0,3281 \text{ L}^{1/2} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ respectivamente. O z representa a carga do íon, r o raio hidratado do íon, e I a força iônica do meio.

Dessa forma, é esperado que quanto maior a carga do íon analisado os desvios ocorrerão com divergência quadrática relativo ao seu valor de pK_a termodinâmico. Conforme há aumento da força iônica do meio, maior será também os desvios relativo ao pK_a termodinâmico ¹⁹. O comportamento aqui descrito pode ser visualizado na figura 1.4.

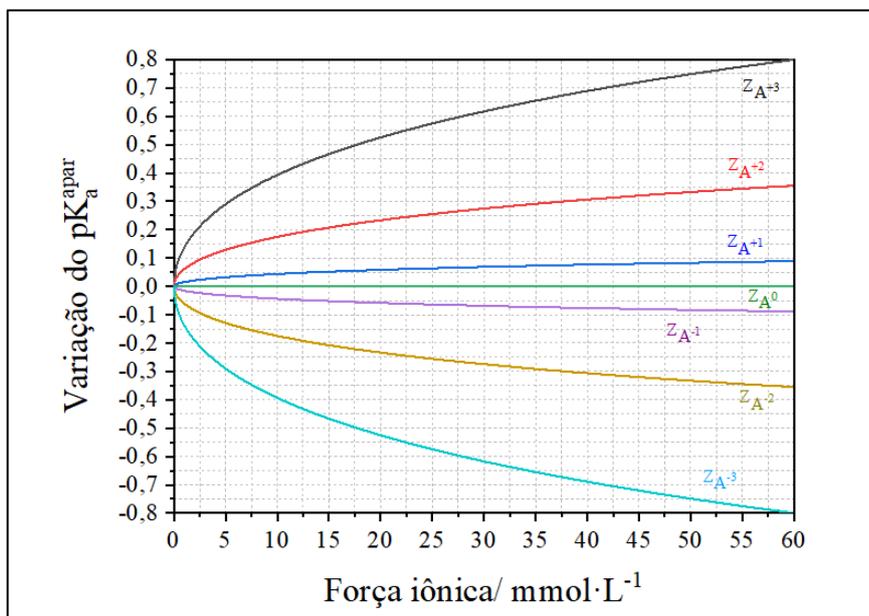


Figura 1.4- Variação entre o pK_a termodinâmico e o pK_a aparente conforme a carga do íon e da força iônica do meio. A projeção foi realizada adotando um íon com raio hidratado igual a 5 nm, e o solvente como sendo a água quimicamente pura a 25 °C.

A partir da figura 1.4 é esperado que para ácidos sempre o pK_a aparente será inferior ao real valor do pK_a termodinâmico, enquanto para bases o valor encontrado experimentalmente sempre será maior. Destaca-se que o parâmetro pK_a aparente é aquele que será obtido em um laboratório.

As correções nem sempre são realizadas utilizando a equação de Debye-Hückel com os coeficientes A e B em condições padrão, ou seja, empregando água como solvente majoritário a 25 °C. Alguns autores adotam os parâmetros A e B como puramente empírico a serem determinados visando a modificação do eletrólito de corrida (por exemplo, utilizando uma porcentagem orgânica)²⁰⁻²⁵, ou correlacionam uma equação de natureza experimental quando há variações de solvente e temperatura²⁶⁻²⁸.

1.4.3 Modelo matemático geral

Provou-se que o grau de ionização está relacionado com as constantes de acidez (ver a equação 1.13). Assim, em uma espécie poliprótica, as sucessivas ionizações ocorrem da seguinte maneira:



⋮



Logo, é esperado que a mobilidade para um composto poliprótico atenda as contribuições de cada estado de ionização expresso como uma função de somatório dada universalmente por ^{9, 10, 12}:

$$\mu_{ef} = \frac{\mu_{H_n A^z} + \sum_{i=1}^n 10^{ipH - \sum_{j=1}^i pK'_{aj}} \cdot \mu_{H_{n-i} A^{z-i}}}{1 + \sum_{i=1}^n 10^{ipH - \sum_{j=1}^i pK'_{aj}}} \quad (1.25)$$

A demonstração da equação 1.25 é obtida analogamente ao modelo monoprótico aqui até então demonstrado no subtópico 1.4.1. A diferença ocorre porque mais de uma fração molar que sofrerá ionização deve ser considerada, dependendo da carga adotada pela espécie, mas no final o resultado é baseado na contribuição geral de todas essas frações molares. O termo $\mu_{H_n A^z}$ remete a mobilidade da espécie quando em estado neutro, sendo esta nula. A simbologia pK'_a representa o pK_a aparente, uma vez que o desenvolvimento matemático foi utilizado a concentração analítica e não a atividade das espécies (a obtenção do pK_a termodinâmico é descrita no subtópico 1.4.2). A letra n representa o número total de grupos ionizáveis, z é carga máxima assumida pela espécie, e i varia de 0 a n . Enquanto K_{a1} , K_{ai} e K_{an} são as dissociações das constantes termodinâmicas sucessivas.

A equação universal 1.25 que serve tanto para uma espécie monoprótica como poliprótica é facilmente manipulável, porém é necessário entender o comportamento do EOF. Logo, considerando uma configuração catódica (o tempo de migração do cátion será menor que o EOF) para um ácido diprótico a descrição é dada pela seguinte equação:

$$\mu_{ef} = \frac{10^{(pH-pK'_{a1})} \cdot \mu_{HA^-} + 10^{(2pH-pK'_{a1}-pK'_{a2})} \cdot \mu_{A^{2-}}}{1 + 10^{(pH-pK'_{a1})} + 10^{(2pH-pK'_{a1}-pK'_{a2})}} \quad (1.26)$$

Para um ácido triprótico teremos:

$$\mu_{ef} = \frac{10^{(pH-pK'_{a1})} \cdot \mu_{H_2A^-} + 10^{(2pH-pK'_{a1}-pK'_{a2})} \cdot \mu_{HA^{2-}} + 10^{(3pH-pK'_{a1}-pK'_{a2}-pK'_{a3})} \cdot \mu_{A^{3-}}}{1 + 10^{(pH-pK'_{a1})} + 10^{(2pH-pK'_{a1}-pK'_{a2})} + 10^{(3pH-pK'_{a1}-pK'_{a2}-pK'_{a3})}} \quad (1.27)$$

Quando se trabalha com espécies que assumem uma transição de mobilidade positiva para uma negativa, basta adotar os sinais do sentido da mobilidade efetiva para a parcela de pH e do pK_a na equação de somatório (equação 1.25). Assim, para o aspartato teremos:

$$\mu_{ef} = \frac{10^{(-pH+pK'_{a1})} \cdot \mu_{H_2A^-} + 10^{(pH-pK'_{a2})} \cdot \mu_{HA^{-2}} + 10^{(2pH-pK'_{a2}-pK'_{a3})} \cdot \mu_{A^{-3}}}{1 + 10^{(-pH+pK'_{a1})} + 10^{(pH-pK'_{a2})} + 10^{(2pH-pK'_{a2}-pK'_{a3})}} \quad (1.28)$$

Uma vez que o aspartato apresenta a mobilidade (em $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) +30,6 para o $pK_a(+1)$, -30,1 para o $pK_a(-1)$ e -55,30 para o $pK_a(-2)$, sendo o sinal entre parênteses simbolizando a carga líquida adotada pela espécie ²⁹.

1.5 Detecção Condutométrica sem Contato

1.5.1 A origem da detecção condutométrica

Na Química, as soluções não ideais só foram bem descritas cientificamente com o trabalho publicado por Peter Debye e Erich Hückel intitulado por “*a teoria dos eletrólitos. I. depressão do ponto de congelamento e fenômenos relacionados*” no ano de 1923 ³⁰. O impacto deste trabalho teve como consequência uma melhor interpretação do que seria uma solução do ponto de vista de íons e a sua respectiva atmosfera que o cerca.

Em 1928 ³¹, Peter Debye e Hans Falkenhagen publicou um artigo, nomeado por “*dispersão de condutividade de eletrólito forte*”, sobre a causa de um tempo finito no relaxamento da atmosfera iônica, e por consequência disto, deveria possuir uma frequência dependente da condutividade elétrica para um eletrólito forte em solução, sendo este fenômeno conhecido como efeito Debye-Falkenhagen. No entanto, os experimentos eram difíceis de ser realizados, porém caso fossem, haveria um estabelecimento da suficiência do modelo de Debye-Falkenhagen para explicar não apenas o comportamento da condutância, mas também para fornecer tratamentos de outros problemas de transporte, como difusão e viscosidade, e novamente para soluções eletrolíticas fortes diluídas.

Em setembro de 1928 a revista “*Zeitschrift für Physik*” recebeu um artigo intitulado por “*sobre a condutividade de eletrólitos fortes para correntes de alta frequência*” do autor Hermann Zahn, como único autor, e neste trabalho foi apontado que seria a primeira evidência experimental quantitativa do efeito Debye-Falkenhagen. No entanto, a revista divulgou uma nota de agosto de 1928 afirmando que Heinrich Sack havia publicado um trabalho na mesma revista e este sim seria o responsável pela primeira comprovação experimental do efeito Debye-Falkenhagen ^{32, 33}.

A respeito do inventor do detector condutométrico sem contato experimentalmente é evidente quando citado em 1929 pelo próprio Hermann Zahn e H. Rieckhoff que o Heinrich Sack foi o primeiro ³⁴. Mas não somente isso, porque em 1931 Hans Falkenhagen mencionou que o efeito Debye-Falkenhagen foi comprovado conforme as evidências experimentais de Sack, Zahn, Rieckhoff, Deubner e coautores, e M. Wien ³⁵.

Portanto, em termos teóricos a invenção do detector condutométrico sem contato é proveniente dos autores Debye-Falkenhagen. No entanto, a comprovação experimental do fenômeno é atribuída ao Heinrich Sack. Hermann Zahn, apesar de não ser o primeiro de fato, por sua originalidade e seus resultados obtidos serem independentes do grupo de pesquisa orientado pelo professor P. Debye deixa claro que também pode ser considerado como um dos inventores do detector condutométrico sem contato.

1.5.2 Detecção Condutométrica sem Contato Capacitivamente Acoplada

A Detecção Condutométrica sem Contato Capacitivamente Acoplada (C^4D) foi primeiramente publicada no ano de 1998, concomitantemente em uma mesma revista por dois grupos de pesquisas independentes: no Brasil do Instituto de Química da USP³⁶, e na Áustria do Instituto de Química Analítica e Radioquímica da Universidade de Innsbruck³⁷. A figura 1.5 apresenta um C^4D manufactured pelo laboratório onde este trabalho foi realizado.



Figura 1.5 – Um C^4D ao lado de uma moeda de R\$1. A moeda possui 27 mm de diâmetro.

O princípio de funcionamento do detector consiste na diferença de condutividade, que possa ser mensurável, do analito em relação ao eletrólito de corrida. Na detecção sem contato os eletrodos (anéis metálicos da figura 1.6) são posicionados do lado externo do capilar (como ilustrado na figura 1.6 por C_1 e C_2), e quando aplicado um sinal oscilatório de tensão (em C_1) uma corrente alternada pode ser acoplada capacitivamente no eletrólito de trabalho que é registrado por um segundo eletrodo (C_2) de medida, e por fim, o sinal obtido pode ser amplificado³⁸⁻⁴⁰, conforme a ilustração a seguir:

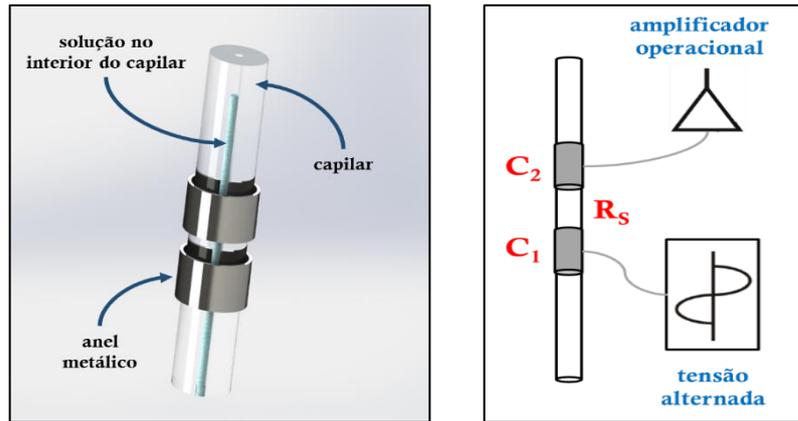


Figura 1.6 – Representação artística em 3D e simbólica do arranjo convencional dos eletrodos para o C⁴D envolto em um capilar. Note que os anéis metálicos, C₁ e C₂, atuam como capacitores cilíndricos. A simbologia de R_s é a resistência da solução eletrolítica dentro do canal do capilar.

As equações envolvidas podem ser encontradas e estimadas a partir de qualquer livro de Física Geral para o funcionamento do C⁴D ou em artigos detalhados por seus inventores^{38, 39, 41}. Assim, um circuito que possa representar a ilustração contida na figura 1.6 pode ser dado conforme a ilustração contida na figura 1.7.

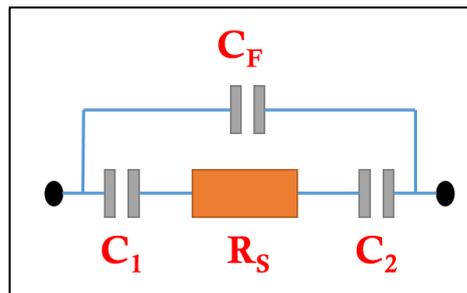


Figura 1.7 – Circuito simplificado de um C⁴D. A legenda é: C₁ e C₂ capacitores cilíndricos, R_s a resistência da solução eletrolítica dentro do canal do capilar, e C_F a capacitância de fuga.

De acordo com a regra das malhas, a soma das quedas de tensões de um capacitor (v_C) e um resistor (v_R) em série é igual a força eletromotriz (ε_m) aplicada em um circuito RC de tal modo que:

$$\varepsilon_m = v_C + v_R \quad (1.29)$$

Porém em um circuito eletrônico de corrente alternada a força eletromotriz pode ser descrita em termos de uma função senoidal da seguinte maneira:

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_m \cdot \text{sen}(\omega_d t + \phi) \quad (1.30)$$

Na equação 1.30 nota-se que a força eletromotriz, $\varepsilon(t)$, depende do tempo e do módulo da própria força eletromotriz, ε_m . Considerando que seja dependente também de uma constante de fase, ϕ , e uma velocidade angular de excitação, ω_d . No entanto, como todos os fasores giram com a mesma velocidade angular, a igualdade é mantida para qualquer ângulo de rotação. O ângulo de rotação de cada fasor é igual à fase da grandeza alternada no instante t , implicando que a tensão e a corrente estão em fase; como a tensão e a corrente têm a mesma velocidade angular e o mesmo ângulo de rotação, os dois fasores giram juntos. A fase é dada porque a corrente e a diferença de potencial passam pelo máximo no mesmo instante de tempo.

Assim, a força eletromotriz pode ser descrita como:

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_m \cdot e^{j(\omega_d t + \phi)} = \varepsilon_m \cdot e^{\omega_d t j} \cdot e^{\phi j} \quad (1.31)$$

Na equação 1.31 a unidade imaginária foi representada pela letra j , e como pode ser observado isso implica que o termo $e^{\phi j}$ é uma variável dependente da fase incomum para o R_s , C_1 , C_2 e para a C_F . Por outro lado, o termo $e^{\omega_d t j}$ é comum para o R_s , C_1 , C_2 e para a C_F pelo fato de girarem juntos em função do tempo. Conseqüentemente o fasor é dado universalmente de forma independente do tempo por:

$$\hat{\varepsilon} = \varepsilon_m \cdot e^{j\phi} \quad (1.32)$$

Logo, um fasor é independente do tempo e é dependente exclusivamente da constante de fase, ϕ , como pode ser observado na equação 1.32. Isto é, ε_m é igual a soma vetorial dos fasores V_R e V_C , considerando que um capacitor está a 90° de defasagem de atraso da resistência, isto porque, a tensão do resistor está em fase com a corrente como pode ser visto na figura 1.8.

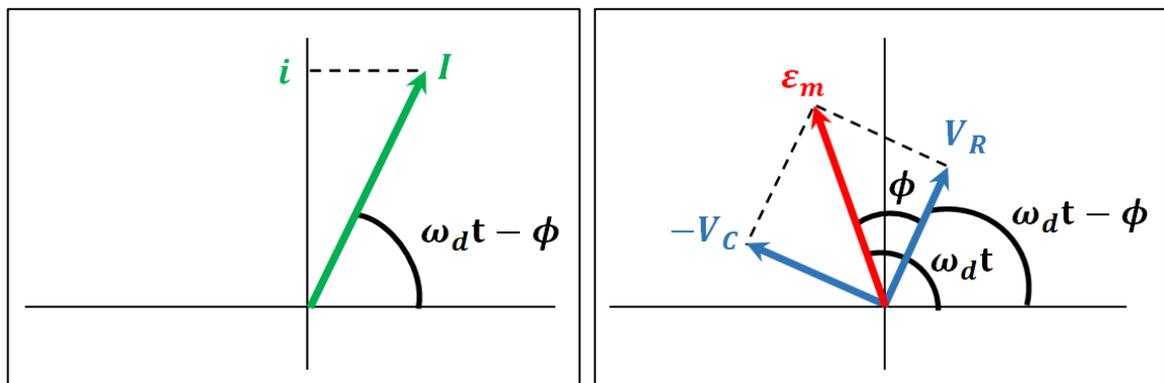


Figura 1.8 – Representação de um fasor que representa a corrente alternada no circuito RC em um instante de tempo t . Contendo fasores que representam as tensões no resistor, V_R , e no capacitor, V_C , orientados em relação ao fasor que representa a corrente (I , representando pela flecha em verde). O fasor de força eletromotriz, representado pela flecha em vermelho, é igual

à soma vetorial dos dois fasores de tensão representados pelas flechas de coloração azul da resistência (V_R) e do capacitor (V_C).

Finalmente, o módulo da força eletromotriz é:

$$\varepsilon_m^2 = V_R^2 + (-V_C)^2 \quad (1.33)$$

Em outras palavras:

$$\varepsilon_m^2 = (R_s \cdot I)^2 + (-X_C \cdot I)^2 \quad (1.34)$$

Onde na equação 1.34, R_s é a resistência da solução eletrolítica dentro do canal do capilar e X_C a reatância do capacitor equivalente do circuito. Portanto, a corrente, I , é igual a

$$I = \frac{\varepsilon_m}{\sqrt{R_s^2 + (-X_C)^2}} \quad (1.35)$$

A fórmula 1.35 é interessante o denominador, porque o termo $\sqrt{R_s^2 + (-X_C)^2}$, a seguir representado pelo símbolo Z , é chamado de impedância do circuito para a frequência de excitação ω_d , uma vez que $I = \varepsilon_m/Z$. Uma outra consideração importante é que a definição da admitância, Y , é equivalente ao inverso da impedância. Portanto:

$$Z = \sqrt{R_s^2 + (-X_C)^2} \quad (1.36)$$

$$Y = \frac{1}{\sqrt{R_s^2 + (-X_C)^2}} \quad (1.37)$$

A resistência pode ser dada em termos da área, a , da distância, l , e da condutividade do eletrólito, κ , da seguinte forma:

$$R_s = \frac{l}{a} \cdot \frac{1}{\kappa} \quad (1.38)$$

Por outro lado, a reatância de um capacitor depende de sua frequência oscilatória, f , e da sua capacitância, C , do seguinte modo:

$$X_C = \frac{1}{2\pi f C} \quad (1.39)$$

Assim, aplicando as equações 1.38 e 1.39 na equação 1.37 teremos:

$$Y = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{l}{a} \cdot \frac{1}{\kappa}\right)^2 + \left(\frac{1}{2\pi f C}\right)^2}} \quad (1.40)$$

Finalmente, o termo $\frac{l}{a}$ é chamado de constante de célula representado pela letra K . Logo, a equação de um C⁴D desconsiderando a capacitância de fuga é expressa em:

$$Y = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{K}{\kappa}\right)^2 + \left(\frac{1}{2\pi fC}\right)^2}} \quad (1.41)$$

A sensibilidade relativa, sr , do C⁴D será melhor expressa como:

$$sr = K \cdot \frac{\partial|Y|}{\partial\kappa} \quad (1.42)$$

Baseado nas equações 1.41 e 1.42 é esperado que em uma frequência elevada de trabalho no detector (na ordem de 5 MHz), alta constante de célula e um meio de baixa condutividade a admitância seja diretamente proporcional (regime linear, dado pela equação 1.43) a condutividade do meio, e implicando em uma sensibilidade relativa igual a 1:

$$Y = \left(\frac{1}{K}\right) \cdot \kappa \quad (1.43)$$

Em contrapartida em frequências tendendo a zero tanto a admitância como a sensibilidade relativa tenderão a zero. O problema de altas frequências, apesar do regime linearizado, se dá por contas da capacitância de fuga que é indesejada e até o momento não foi levada em consideração. Por exemplo, a capacitância de fuga permite um fluxo de corrente que contribui para a intensidade do sinal absoluto da linha de base, e conseqüentemente, afetando negativamente no limite de detecção.

Em condições reais a capacitância de fuga é inevitável, e quanto maior ela a sensibilidade relativa do detector é reduzida, especialmente quanto maior foi a frequência de trabalho do detector. Então, apesar do regime ser linear em altas frequências com a sensibilidade relativa do detector igual 1, a capacitância de fuga passa a ser um problema. Logo, é esperado que o melhor caso de frequência de trabalho de um C⁴D não seja muito elevado e nem baixa, visando estar no regime de pico máximo da sensibilidade relativa do detector ³⁸.

Referente a utilização do C⁴D nos últimos anos (dentre os anos de 2018 a 2020), em 61 trabalhos avaliados 79% destes utilizaram com o método de CZE (*Capillary Zone Electrophoresis* - Eletroforese Capilar de Zona), enquanto em outros 17 trabalhos foram de MCE (*Microchip Electrophoresis* – Eletroforese em Microchip). Os parâmetros adotados para o C⁴D variam de 1 a 200 V e 10 a 2 MHz, além disso os limites de detecção constatado demonstram ser na ordem de 0,1 a 10 mg·L⁻¹ ou 0,01 a 40 µmol·L⁻¹ ⁴².

Os mais variados tipos de amostras já foram analisadas utilizando o C⁴D, por exemplo: água de coco ⁴³, chuva ⁴⁴, etanol ⁴⁵, mono e dissacarídeos ⁴⁶, sangue ⁴⁷, geleia, cerveja, energético, leite fermentado, mel, tecido adiposo, pacotes de fogos de artifício, urina, lágrima, drogas, entre outros ⁴².

Katzmayr e colaboradores deduziram a fórmula que pode ser utilizada em um C⁴D para a projeção de um eletroferograma a partir da sua diferença de condutividade (ΔG) contendo apenas duas espécies complementares e monovalentes. Na consideração é levado em consideração a constante de célula (K), a constante de Faraday (F), a concentração do analito ($c_{A^-}^S$), a condutância iônica equivalente limitante do analito (λ_{A^-}), a mobilidade absoluta do analito (μ_{A^-}), a mobilidade do co-íon (μ_{E^-}) e do contra-íon (μ_{E^+}) do eletrólito de corrida ⁴⁸. Expresso como:

$$\Delta G(\mu_{E^+}, \mu_{E^-}) = \frac{c_{A^-}^S \cdot \left\{ \mu_{E^+} \cdot F \cdot \left[1 - \frac{\mu_{E^-} \cdot (\mu_{A^-} + \mu_{E^+})}{\mu_{A^-} \cdot (\mu_{E^-} + \mu_{E^+})} \right] - \mu_{E^-} \cdot F \cdot \frac{\mu_{E^-} \cdot (\mu_{A^-} + \mu_{E^+})}{\mu_{A^-} \cdot (\mu_{E^-} + \mu_{E^+})} + \lambda_{A^-} \right\}}{10^{-3}K} \quad (1.44)$$

Conforme a equação 1.44, é esperado que quanto maior a diferença entre os valores da mobilidade entre o analito e o co-íon a diferença da condutividade será mais acentuada, e consequentemente maior a intensidade do pico a ser detectado por um C⁴D. Por outro lado, quando as mobilidades são próximas entre analito e o eletrólito de corrida a detecção da condutividade implicará em uma linha base sem pico, ou que seja dificilmente evidenciável para o analito.

1.6 Eletrólise separada

Durante as análises em um equipamento de eletroforese capilar é inevitável a ocorrência da eletrólise nas proximidades do eletrodo. Utilizando sistemas em que ocorre um volume na ordem de 2 mL do eletrólito de corrida a solução pode ser comprometida. Assim, uma forma de contornar esse problema é associar um compartimento no qual os produtos gerados pela eletrólise sofram dificuldades em chegar ao reservatório contendo o eletrólito de corrida, e consequentemente elevando a sua vida útil ⁴⁹.

Baseado na figura 1.9, quando se utiliza um canal largo entre o reservatório da alta tensão e do armazenamento do eletrólito de corrida, ocorre a passagem dos produtos gerados pela eletrólise majoritariamente por difusão. Quando este canal é estreito em sua plenitude, os produtos gerados pela eletrólise serão transportados predominantemente por eletromigração devido a elevação do campo magnético no canal. Porém, o melhor ajuste é obtido quando mesclado um pequeno trecho do canal de forma estreita e em sua maior extensão longitudinal de forma larga, assim tanto a eletromigração quanto a difusão serão bem controladas e o tempo de vida útil do canal é amplificado.

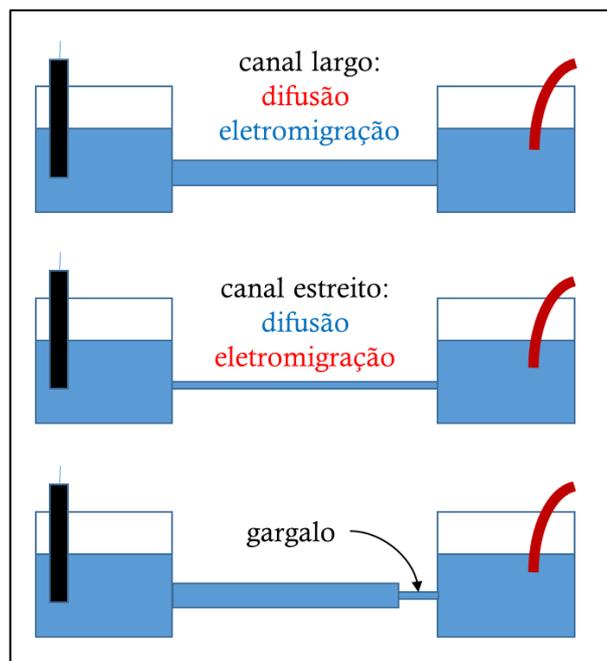


Figura 1.9 – Representação do sistema de eletrólise separada. O retângulo em preto é a ilustração de um eletrodo em que ocorre a aplicação da alta tensão gerando os produtos da eletrólise inevitavelmente. O reservatório à direita contém o eletrólito de corrida que deve ser protegido dos produtos gerados da eletrólise do reservatório à esquerda. O tubo em vermelho representa o capilar que fica em contato com o eletrólito de corrida.

O comprometimento da solução destinada a ser o eletrólito de corrida seja causado por difusão ou eletromigração implica na perda de precisão e exatidão da técnica.

1.7 Eletroforese capilar, uma técnica de elevado potencial para múltiplas e simultâneas quantificações

A compreensão da constante de dissociação ácida (pK_a) como uma propriedade é um dos parâmetros mais comumente usados na química moderna. Tanto o pH quanto o pK_a são essenciais para entender o comportamento das substâncias químicas na vida cotidiana ⁴.

O método multiplexado (eletroforese capilar utilizando diversos capilares simultaneamente, chamado de canais) poderia empregar vários canais dispostos em um laboratório farmacêutico ou bioquímico. A finalidade deste método é quantificar a maior quantidade possível de pK_a em um curto intervalo de tempo, e na literatura foi relatado casos em que houve quantificação de pK_a para 128 a 168 compostos em 8 horas ¹⁹, ou diversos compostos pela adoção de 96 canais simultaneamente ^{50, 51}, ou ainda a obtenção do pK_a de 96 compostos em 1 dia de trabalho ⁵².

2 OBJETIVO

A princípio pretendia verificar se o equipamento manufaturado pelo grupo de pesquisa onde este trabalho foi realizado, nomeado de BeerBox, fornecia dados que possibilitasse quantificar valores de pK_a corretamente. Havendo este ponto cumprindo, utilizar um detector C^4D para quantificação de pK_a porque não foi encontrado na literatura (pesquisa realizada no Portal de Periódicos CAPES, contendo 455 bases de dados de conteúdo diversos e 49 mil periódicos⁵³) nenhuma caracterização de pK_a usando este formato de detecção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes que foram utilizados da Sigma-Aldrich são estes: ácido gálico, ácido láctico, β -alanina, aspirina, CTBA (brometo de hexadeciltrimetilamônio), HIBA (ácido 2-hidroxisobutírico) e propan-1-ol. Relacionado aos da Merck, usou-se: ácido benzoico, ácido clorídrico, ácido cloroacético, ácido p-toluenossulfônico, azul de bromotimol, bicarbonato de sódio, cloreto de lítio, fumarato de sódio e sal monossódico de ácido L-aspártico monoidratado. Relativo aos da Synth, foi utilizado: ácido acético, hipofosfito de sódio e hidróxido de sódio. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada a $18 M\Omega \cdot cm$ do equipamento comercial Milli-Q®.

3.2 CE- C^4D

Utilizou-se um equipamento de CE- C^4D – nomeado de BeerBox - manufaturado no Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA) do Instituto de Química da USP, supervisionado pelo professor Claudimir Lucio do Lago. Houve também a utilização de um CE comercial da Agilent Technologies modelo 7100, sendo em ambos os casos a detecção realizada com um C^4D manufaturado pelo LAIA (onde este trabalho foi realizado).

Todos os valores de pK_a e mobilidade efetiva foram consultados em bibliotecas de dados empregadas de *softwares* de simulações^{29,54}.

A temperatura em que realizou-se todos os experimentos foi a 25 °C.

3.2.1 BeerBox

3.2.1.1 Estrutura e configuração

O BeerBox foi um equipamento construído pelo LAIA visando a realização de trabalhos em baixas temperaturas. Portanto, seria possível estimar o valor de pK_a para espécies que possuem uma taxa de degradação relativamente rápida, ou seja, visando a diminuição da

velocidade de reações químicas que podem dificilmente serem acompanhadas em temperatura ambiente.

Logo, é possível realizar experimentos em capilares com comprimentos em torno de 30 cm ou mais, sendo o controle da temperatura interna do sistema realizado via *software* na ordem de 35 °C até 1 °C (ainda não foram realizados testes em temperatura mais extremas do que estas). Além disso, o equipamento possui um sistema que dispensa a necessidade de tamponamento do eletrólito dado o emprego da eletrólise separada.

A técnica de eletroforese de CE-C⁴D é a técnica que permitiu obter, até o momento, o maior número de informações sobre os HECAs (hemiésteres de ácido carbônico) pelo grupo de pesquisa supervisionado pelo professor Dr. Claudimir Lucio do Lago, indo de coeficientes de difusão até constantes cinética de hidrólise. Basicamente, os HECAs são espécies químicas que podem ser vistas como o produto da hidrólise parcial de ácidos alquilcarbônicos (ACAs) que são espécies com estruturas parecidas a do ácido carbônico, porém apresentando um radical alquila no lugar de um hidrogênio. Eles podem ser prontamente sintetizados em meio aquoso pela reação de bicarbonato com um álcool formando, assim, monoalquil carbonatos (MACs) como representado a seguir na figura 3.1.

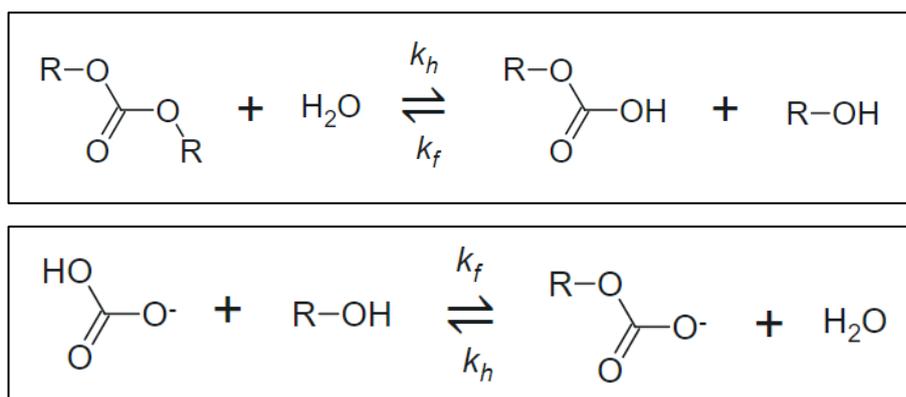


Figura 3.1 – Formação de um ácido alquilcarbônico, e abaixo a síntese de um monoalquil carbonato a partir de bicarbonato e um álcool.

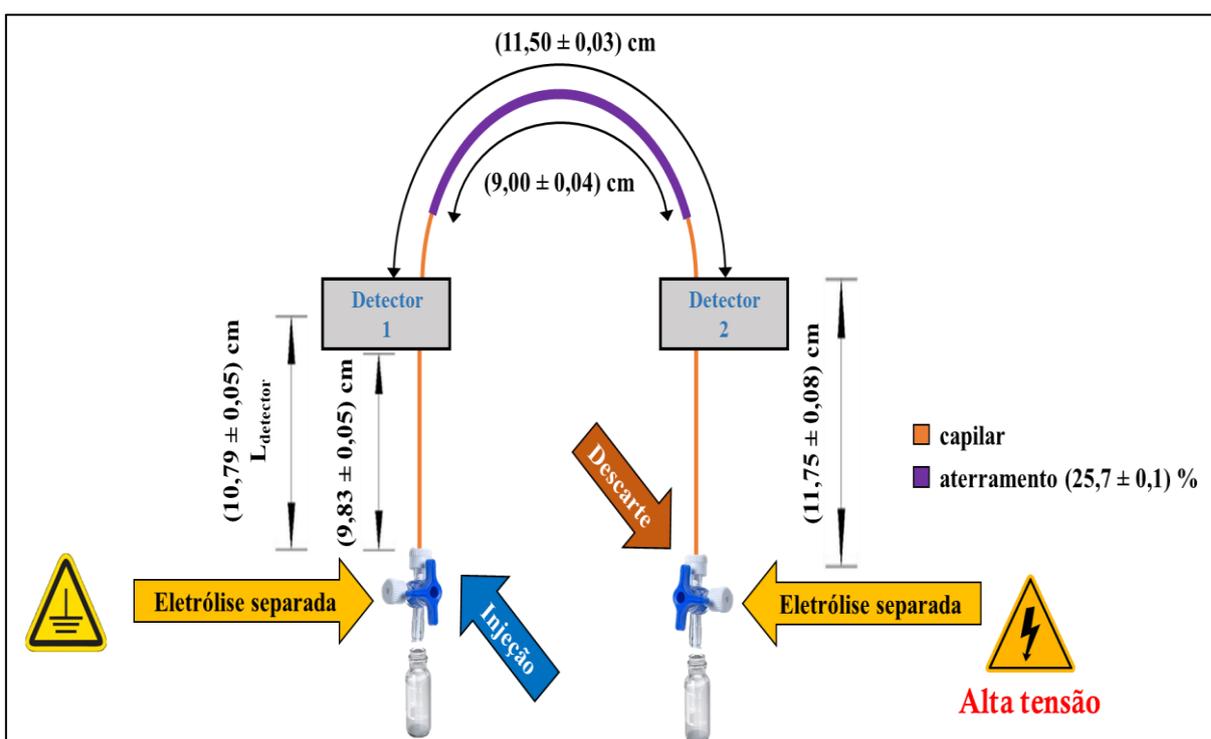
Num primeiro momento, houve a tentativa de reproduzir alguns experimentos realizados pelo Pós-Doutor Denis Tadeu Rajh Vidal e posteriormente pela Pós-Doutora Zuzana Cieslarová (ambos, egressos do grupo de laboratório) com o BeerBox. No entanto, acordado com o período entre o Sétimo e o Oitavo Comunicado à Comunidade Acadêmica da USP, referente ao dia 07/05/20, as atividades presenciais de pesquisa não essenciais foram interrompidas, e havendo o retorno de modo parcialmente estável somente após a comunicação do Plano USP de

Readequação do Ano Acadêmico do dia 05/05/21 (uma defasagem de quase 1 ano). O trabalho foi bastante afetado por conta desse aspecto, mas realizou-se muitos experimentos e o principal problema foi nos ajustes necessários para deixar o equipamento recém fabricado bom o suficiente para gerar resultados satisfatórios. Portanto, diante desse problema buscou-se realizar o trabalho em um tempo relativamente curto como será abordado a seguir:

Utilizou-se um capilar de 50,0 μm de diâmetro interno com 35,0 cm de extensão longitudinal, sendo a limpeza do capilar realizada com a injeção de NaOH a 0,10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 10 minutos aplicando uma pressão hidrodinâmica de aproximadamente 140 mBar, e esse processo se deu também com a água deionizada e posteriormente com o uma solução de LiCl (conforme o pH de interesse a ser trabalhado) nestas mesmas condições.

A determinação do pK_a utilizando esse método foi realizado para estas espécies: ácido benzoico, ácido láctico e aspartato.

A princípio pretendia verificar se o equipamento manufaturado pelo LAIA fornecia dados que possibilitasse quantificar valores de pK_a corretamente. Assim, construiu-se uma curva de LiCl com força iônica variável, mas próxima de 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de força iônica, em diversos valores de pH definido pela adição de HCl com as concentrações previamente calculadas. A configuração do BeerBox utilizada é dada a seguir na ilustração contida na figura 3.2.



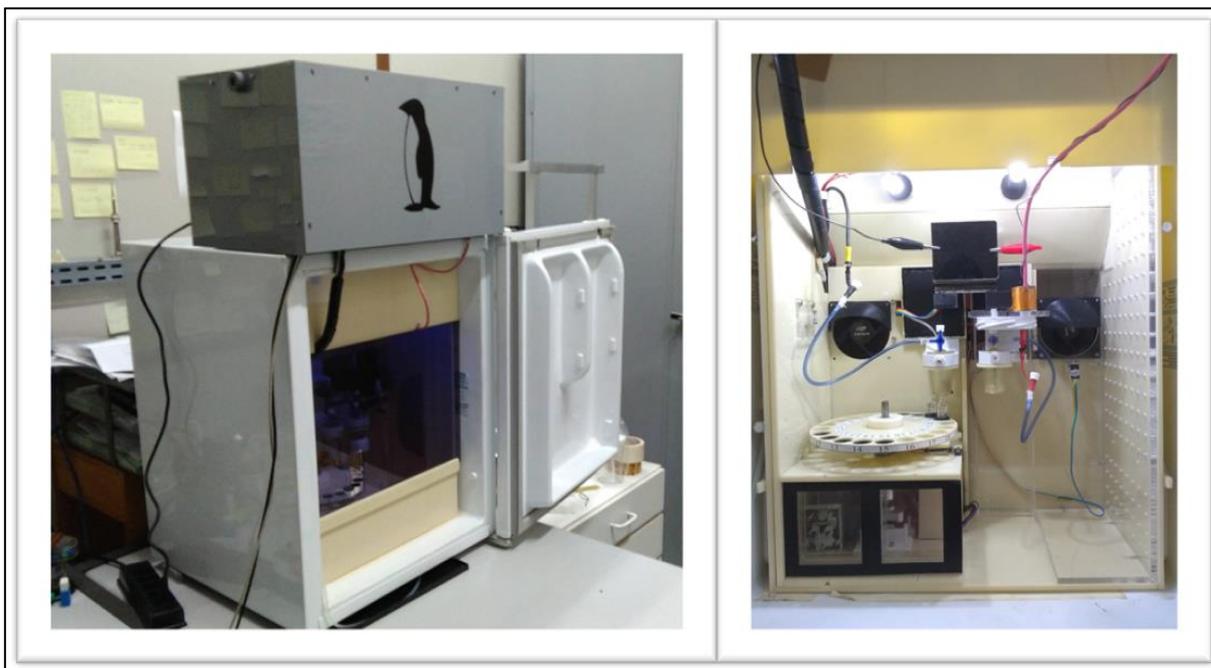


Figura 3.2 – Configuração utilizada no BeerBox. No total, foi utilizado 35,0 cm de comprimento do capilar e com 50 μm de diâmetro interno, e nota-se que há dois pontos onde ocorreram a detecção, isto é, no detector 1 e no detector 2. Abaixo, o BeerBox em sua estrutura real empregada neste trabalho. O aterramento ilustrado em roxo é utilizado para amenizar o impacto que o potencial radial possa causar.

Acordado com a figura 3.2, a amostra ingressa na entrada de injeção pela aplicação de uma pressão hidrodinâmica por 3 segundos na ordem de 30 a 60 mBar a 25 °C. Posteriormente, após a aplicação de uma diferença de potencial de 21 kV a próxima etapa ocorre na passagem do analito do detector 1 em sentido ao detector 2. No final, a amostra é descartada no frasco específico para esta finalidade.

3.2.1.2 Eletrólise separada

No ponto da aplicação da alta tensão ao frasco, seja da injeção ou do descarte, existe um tubo de $(3,0 \pm 0,1)$ mm transversal por $(24,0 \pm 0,01)$ cm longitudinal preenchido com o eletrólito de corrida. Ou seja, do eletrodo ao frasco há um tubo da eletrólise separada para dificultar a passagem dos produtos gerados pela eletrólise por uma determinada quantidade de tempo, evitando a contaminação do frasco posicionado na injeção/descarte conforme a figura 3.3.

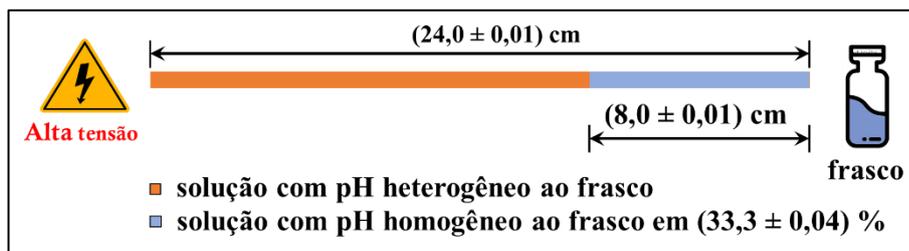


Figura 3.3 – Arranjo da eletrólise separada utilizada no BeerBox. Os produtos gerados da eletrólise ocorrem no eletrodo da alta tensão em sentido ao frasco.

Um outro fator importante a ser ressaltado foi que durante as análises no BeerBox em nenhum momento houve a utilização de uma solução tampão como eletrólito de corrida. Além disso, durante as mudanças sucessivas de pH – visando a construção da curva da mobilidade contra o pH do meio – ocorreu apenas uma sucção da solução a ser trocada de modo a tornar em 1/3 da extensão longitudinal do tubo da eletrólise separada idêntica ao pH do frasco, evitando assim, uma divergência no valor de pH entre a solução contida no tubo da eletrólise separada e do pH da solução contida no frasco conforme ilustrado também na figura 3.3.

A princípio o tempo de vida útil do tubo da eletrólise separada foi estimado usando-se os seguintes reagentes: água deionizada (Milli-Q), $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de LiCl, $0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaOH, e uma solução do indicador de azul de bromotimol. A solução, conforme a figura 3.4, de LiCl foi empregada como eletrólito de corrida, enquanto a de NaOH para ajuste do pH. Inicialmente a solução teve seu pH mensurado em $6,86 \pm 0,04$ com auxílio do pHmetro da Metrohm (modelo 827 pH lab).



Figura 3.4 – Eletrólito de corrida (solução de LiCl a $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ com pH igual a $6,86 \pm 0,04$) utilizado para determinação do tempo de vida útil no mecanismo de eletrólise separada adotado no BeerBox.

A solução de LiCl foi caracterizada pela técnica de cronopotenciometria, nesta empregou-se o equipamento Autolab da Metrohm (modelo PGSTAT302N). Durante todo o

processo a corrente foi fixada em $15,0 \mu\text{A}$, enquanto a variação da tensão pôde ser analisada conforme a figura a seguir:

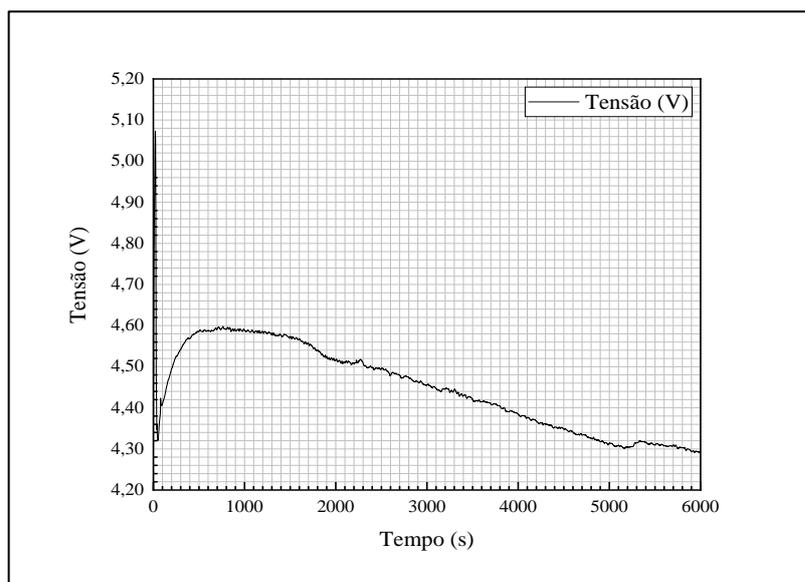


Figura 3.5 – Gráfico da tensão em função do tempo para uma corrente fixada em $15,0 \mu\text{A}$. O eletrólito de corrida utilizado foi uma solução de LiCl a $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ com pH igual a $6,86 \pm 0,04$.

Todo o processo visual foi gravado com um celular (Motorola, modelo Moto G6), e transcorrido o tempo de análise quantificou-se o grau de avanço das espécies formadas com auxílio de um *software* para análises de imagens (ImageJ). Conforme a sequência temporal contida na figura 3.6.

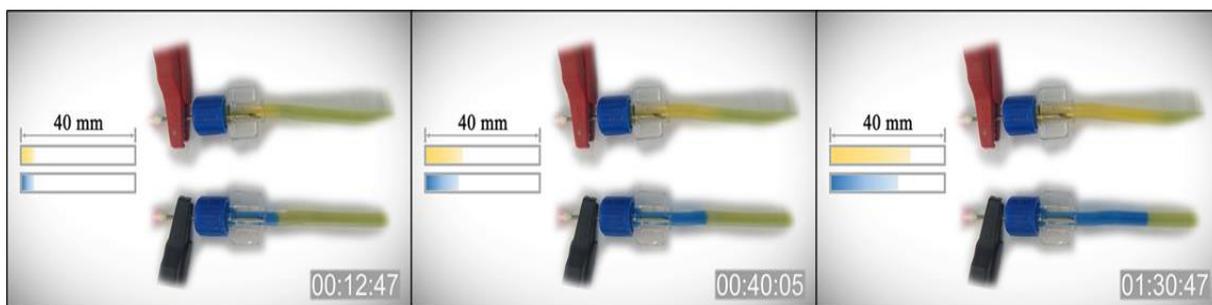


Figura 3.6 – Avanço de H^+ , OH^- , e os outros produtos gerados pela eletrólise separada. O tempo descrito no lado inferior das figuras sucessivas remetem em horas, minutos e segundos respectivamente da esquerda para a direita. O indicador azul de bromotimol em pH de caráter básico possui a coloração azul característica da presença majoritária de OH^- , enquanto em pH de caráter ácido possui a coloração amarela característico da presença majoritária de H^+ .

Levando-se em consideração que a velocidade é definida como a taxa do descolamento relativo ao tempo, temos que o coeficiente angular da regressão linear dada no gráfico das figuras 3.7 e 3.8 representam a respectiva velocidade das espécies H^+ e OH^- , considerando que os outros produtos gerados pela eletrólise sejam irrelevantes ao processo. Assim a velocidade dos íons H^+ foi de $(1,78 \pm 0,06) \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ enquanto do OH^- de $(1,45 \pm 0,02) \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$.

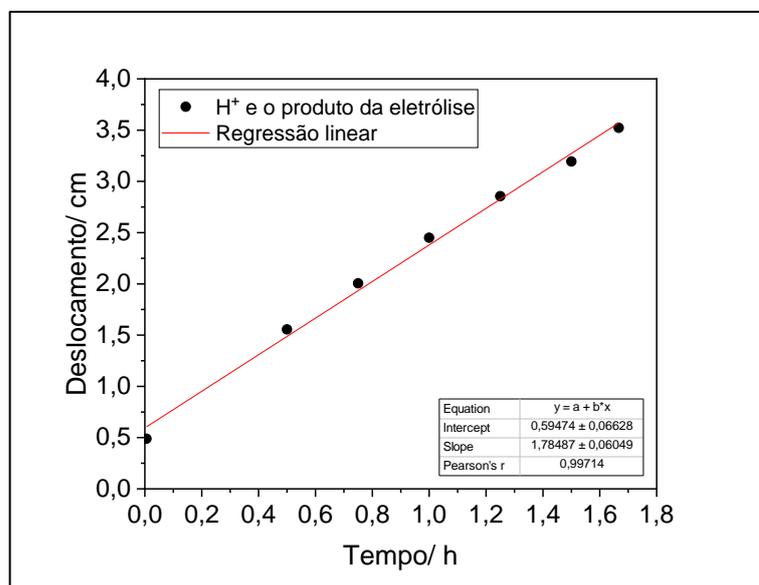


Figura 3.7 – Deslocamento do H^+ e o produto gerado pela eletrólise separada no tubo em função do tempo.

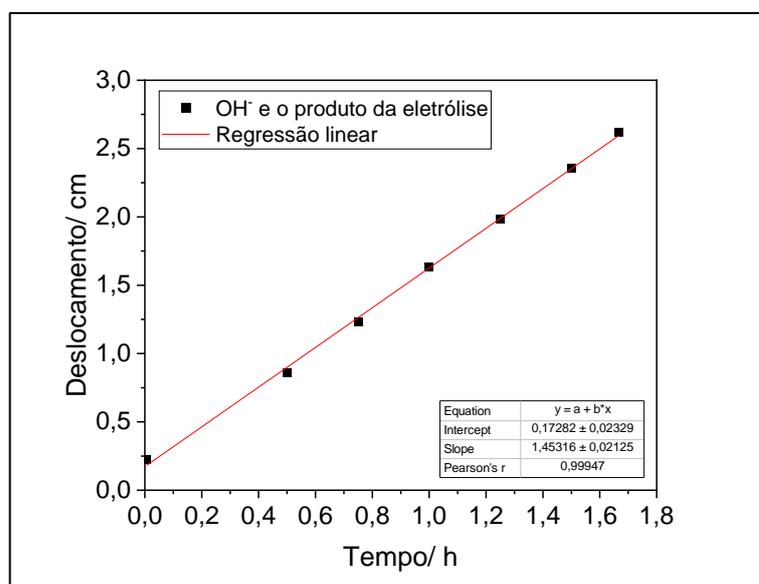


Figura 3.8 – Deslocamento do OH^- e o produto gerado pela eletrólise separada no tubo em função do tempo.

Considerando que a extensão do tubo destinado para a eletrólise separada utilizada foi de $(24,0 \pm 0,1)$ cm, é de se esperar que o tempo de vida útil utilizando uma única solução sem a sua troca seja no máximo de $(13,5 \pm 0,5)$ h utilizando o BeerBox.

3.2.2 Agilent Technologies modelo 7100

A configuração foi parecida do BeerBox, exceto pelo fato da ausência da eletrólise separada como pode ser visto na figura 3.9. Utilizou-se um capilar de $50,0 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e $50,0$ cm de extensão longitudinal, fazendo a sua limpeza com uma solução de NaOH a $0,10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 10 minutos com uma aplicação de pressão hidrodinâmica de aproximadamente 938 mBar , e esse processo se deu também com a água deionizada e com o tampão de β -alanina: Cl^- (conforme o pH de interesse a ser trabalhado apresentado na tabela 3.1) nestas mesmas condições.

Posterior ao processo de limpeza, as amostras foram injetadas com uma aplicação de pressão hidrodinâmica de 30 mBar por 6 segundos. Sendo a corrida realizada em 21 kV e com tempo fixado em 6 minutos independente da amostra analisada.

A determinação do pK_a utilizando esse método foi realizada para estas espécies: acetato, benzoato, cloroacetato, fumarato, galato, aspartato, aspirina e HIBA.

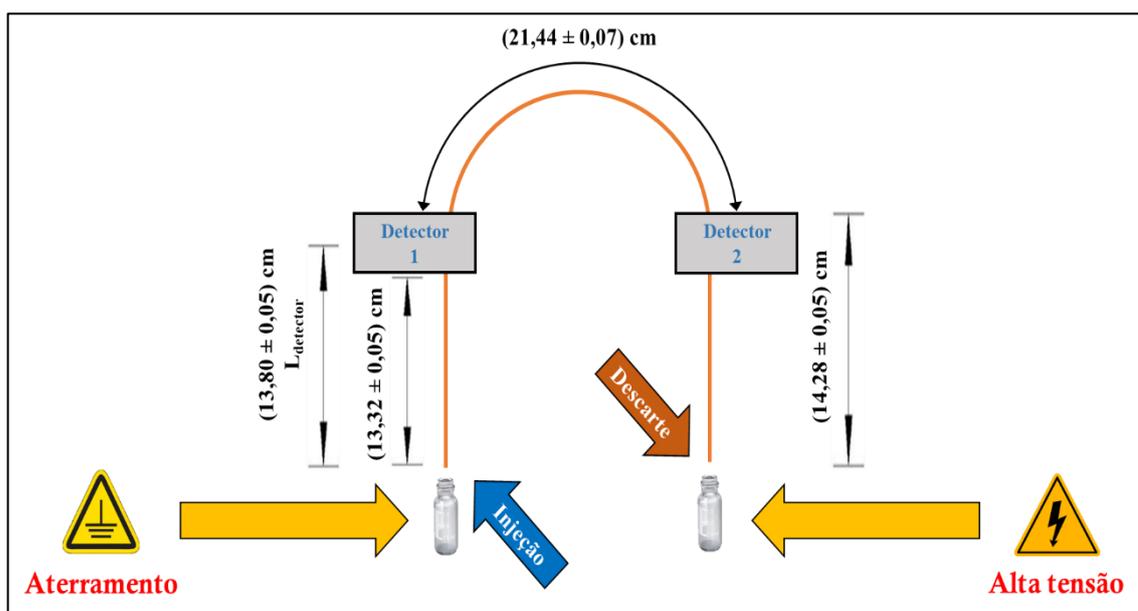


Figura 3.9 - Configuração utilizada no equipamento comercial, Agilent Technologies modelo 7100. No total, foi utilizado $50,0$ cm de comprimento do capilar com $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, e nota-se que há dois pontos onde ocorreram a detecção, isto é, no detector 1 e em sequência no detector 2.

O tampão de β -alanina com HCl teve as seguintes características descritas uma a uma dada na tabela 3.1:

Tabela 3.1 – Dados da solução tampão para uma força iônica igual a $15,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

| pH teórico | pH experimental ($\pm 0,01$) | [β -Alanina] teórica (mmol/L) | [HCl] teórica (mmol/L) | Capacidade tamponante teórica (mmol/L) |
|------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--|
| 5,80 | 5,82 | 2385,00 | 14,903 | 36,25 |
| 5,40 | 5,40 | 959,00 | 14,985 | 35,71 |
| 5,20 | 5,19 | 610,00 | 14,994 | 35,35 |
| 5,00 | 5,02 | 391,00 | 14,998 | 34,82 |
| 4,80 | 4,80 | 252,00 | 15,000 | 34,02 |
| 4,60 | 4,62 | 164,20 | 15,000 | 32,82 |
| 4,40 | 4,41 | 109,00 | 15,000 | 31,10 |
| 4,20 | 4,20 | 74,20 | 15,000 | 28,72 |
| 4,00 | 4,01 | 52,20 | 15,000 | 25,64 |
| 3,80 | 3,81 | 38,25 | 15,000 | 21,96 |
| 3,60 | 3,62 | 29,39 | 15,000 | 18,01 |
| 3,40 | 3,33 | 23,72 | 15,000 | 14,26 |
| 3,20 | 3,20 | 19,97 | 15,000 | 11,16 |
| 3,00 | 2,93 | 17,35 | 15,000 | 9,10 |
| 2,60 | 2,64 | 13,39 | 15,000 | 9,16 |

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico os assuntos serão descritos em ordem lógica e não cronológica. Em outras palavras, a princípio foram obtidos os dados utilizando o BeerBox, porém, como os dados utilizando o equipamento comercial demonstrou aspectos mais claros e que devem ser levados em consideração em primeira instância, optou-se por assim iniciar as discussões. Todos os eletroferogramas obtidos cujos dados de mobilidade foram utilizados para a construção dos gráficos apresentados a seguir podem ser consultados no apêndice A e B.

Nas figuras onde há todos os gráficos de mobilidade contra o pH, a linha contínua em azul é uma inferência teórica usando um modelo para um ácido monoprótico ou poliprótico dependendo da espécie analisada em diluição infinita (manipulando a equação 1.25 descrito no subtópico 1.4.3). Nesta inferência teórica os valores de pK_a e mobilidade efetiva (μ) foram utilizados aqueles que são encontrados na literatura em diluição infinita. Enquanto a curva contínua em vermelho é uma determinação dos dados experimentais utilizando o mesmo

modelo adotado na inferência teórica, mas desta vez determinando a mobilidade efetiva e o valor de pK_a experimental.

O sinal contido nos parênteses remete a carga adotada pela espécie, ou seja, quando existe a simbologia de pK_a (-2) e μ_1 (-2) isso quer dizer que se trata do pK_a e a mobilidade efetiva assumida por aquela espécie quando apresenta carga líquida igual a -2.

Como apresentado na introdução deste trabalho, a determinação de pK_a por CE demanda o uso de diferentes eletrólitos de corrida, para se obter ambientes nos quais o analito irá migrar em diferentes valores de pH.

Na tentativa de manutenção da força iônica – que é importante para se estabelecer o valor correto de pK_a – a concentração de β -alanina é levada a extremos, o que acaba por alterar significativamente a viscosidade do meio. Assim, a estratégia proposta neste trabalho é utilizar um ou mais íons adicionados a amostra e que se supõe que terão suas mobilidades afetadas da mesma forma que a do analito, com exceção do pH, já que estas espécies teriam pK_a muito distantes da região de pH investigada. Estas espécies servem, portanto, como uma espécie de referência porque o seu valor de mobilidade será constante em todo o processo devido a sua ionização ser dada em 100%. No entanto, é importante ressaltar que foi utilizado um outro método no qual é empregado o padrão interno que é discutido no subtópico 4.1.4. Logo deve-se levar em consideração que uma espécie de referência (subtópico 4.1.1) é diferente de um padrão interno (subtópico 4.1.4).

4.1 Dados obtidos com o equipamento comercial (Agilent Technologies modelo 7100)

4.1.1 O uso de uma espécie de referência na eletroforese capilar

Uma espécie de referência é aquela no qual a sua mobilidade efetiva deve ser constante em todos os ensaios, e será responsável pela correção da mobilidade efetiva do analito caso ocorram divergências. O valor da magnitude da correção, neste trabalho, foi determinado por fator de correção.

O ácido p-toluenossulfônico e o ácido hipofosfórico, que foram utilizados neste trabalho como espécies de referência, possuem o pK_a igual a -2,00 e 1,10 e seus ânions com a mobilidade efetiva em diluição infinita de -31,1 e -45,1 (em $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) respectivamente. Assim, no intervalo de pH adotado aqui de 2,64 a 5,82 é esperado que tanto o p-toluenossulfonato como o hipofosfito estejam 100% ionizados porque os valores de pK_a assumidos por estas espécies são inferiores a 2,64, e conseqüentemente a mobilidade efetiva para as espécies de referência em todas as situações deveriam permanecer constantes teoricamente. Evidentemente, em uma

situação real isso pode não ocorrer e a mobilidade da espécie de referência variar por causa das características do meio não serem uniformes.

Por uniforme, significa que o pK_a é determinado realizando uma curva de mobilidade efetiva contra o pH. Logo, é necessário a preparação de diversos eletrólitos de corrida com distintos valores de pH, conseqüentemente estas soluções terão viscosidade, constante dielétrica, calor específico, entre outras características distintas quando comparado os eletrólitos de corrida um com o outros. Por exemplo, uma solução de pH igual a 5,0 possui características distintas daquelas em pH igual a 4,0. Uma forma de contornar esse problema, até então inédito e proposto por este trabalho, é considerar que haverá valores de mobilidade efetiva que sofrem desvios para cada solução de eletrólito preparado conforme o pH empregado. Ocorrendo os desvios tanto para o analito como para a espécie de referência.

Uma maneira simples de contornar este problema é utilizar a espécie de referência para caracterizar o desvio causado pelo meio que está sendo feita a análise. Por fim, encontrar o fator de correção (nomeado desta maneira neste trabalho) do meio para inferir na real mobilidade efetiva do analito.

Logo, é possível obter a mobilidade efetiva da espécie de referência ($\mu_{ef, \text{referência}}$) para cada eletrólito de corrida particular considerando a equação 1.4 (do subtópico 1.3) seguindo o seguinte raciocínio:

$$\mu_{ef, \text{referência}} = \frac{q}{f_{\text{referência}}} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta_{\text{referência}} \cdot r_{\text{referência}}} \quad (4.1)$$

Na equação 4.1 o coeficiente de atrito é expresso pelo símbolo (f), e por sua vez é dependente do raio hidrodinâmico da espécie (r) e da viscosidade do meio (η).

Porém, o interesse é saber qual é a divergência do valor da mobilidade efetiva da espécie de referência observada com aquele valor em condição de diluição infinita ($\mu_{ef, \text{referência}}^\infty$) que pode ser encontrado na literatura dado por:

$$\mu_{ef, \text{referência}}^\infty = \frac{q}{f_{\text{referência}}^\infty} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta_{\text{referência}}^\infty \cdot r_{\text{referência}}^\infty} \quad (4.2)$$

Dividindo a equação 4.2 pela equação 4.1 temos:

$$\frac{\mu_{ef, \text{referência}}^\infty}{\mu_{ef, \text{referência}}} = \frac{f_{\text{referência}}}{f_{\text{referência}}^\infty} = \frac{\eta_{\text{referência}} \cdot r_{\text{referência}}}{\eta_{\text{referência}}^\infty \cdot r_{\text{referência}}^\infty} = \delta \quad (4.3)$$

A letra grega δ (delta) foi denominada de fator de correção, e é uma variável de correção da viscosidade do meio e das variações que possam ocorrer no raio hidrodinâmico da espécie a ser analisada. Portanto, utilizando uma espécie de referência é possível inferir qual o real valor do fator de correção (δ) para cada eletrólito de corrida utilizado na construção da curva de pH.

Conseqüentemente, a real mobilidade do analito em diluição infinita ($\mu_{ef, analito}^{\infty}$) será dada por aquela quantificada no laboratório ($\mu_{ef, analito}$) e levando-se em consideração o fator de correção do meio para cada eletrólito de corrida particularmente preparado:

$$\mu_{ef, analito}^{\infty} = \mu_{ef, analito} \cdot \delta \quad (4.4)$$

Portanto, é esperado que realizando estas correções haverá ajustes tanto de aspectos relativos à viscosidade como no raio hidrodinâmico das espécies analisadas. Isso porque, o raio hidrodinâmico (r) poderia ser quantificado sabendo-se a viscosidade do meio (η), da temperatura termodinâmica (T), do coeficiente de difusão (D) e da constante de Boltzmann (k_B) segundo a equação de Einstein–Stokes⁵⁵ dada pela equação 4.5:

$$r = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (4.5)$$

Baseado na equação 4.5, é esperado que uma mudança de viscosidade do meio altere o raio hidrodinâmico do analito.

Por outro lado a viscosidade (η) do eletrólito de corrida é alterada pela força iônica do meio⁵⁵, ou simplesmente pela sua concentração analítica dada a equação de Jones-Dole^{56, 57}. Por exemplo, de 0 a 1 mol·L⁻¹, a viscosidade relativa (η_r) depende da concentração analítica do meio (C) e do valor da viscosidade intrínseca (η_0) dado pela equação 4.6:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = 1 + A \cdot C^{1/2} + B \cdot C + D \cdot C^2 \quad (4.6)$$

Onde na equação 4.6 o coeficiente A é caracterizado pela atmosfera iônica efetiva, e possui grande relevância principalmente em concentrações baixas. O coeficiente B é dependente do tamanho (e forma) dos íons e as interações soluto-solvente. Alguns eletrólitos requerem um termo adicional, coeficiente D , dependente do quadrado da concentração⁵⁸.

A atmosfera efetiva iônica é baseada no postulado da teoria de Debye-Hückel^{30, 59}, em que cada íon pode ser considerado cercado por uma atmosfera iônica de sinal oposto, no entanto é possível definir a espessura efetiva dessa atmosfera iônica ou o chamado de comprimento de Debye ($1/\kappa$) dado por:

$$\frac{1}{\kappa} = \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0}{I} \cdot \frac{1000 \cdot k_B T}{8\pi \epsilon^2 N_A} \right)^{1/2} \quad (4.7)$$

Conforme a equação 4.7, a simbologia $\epsilon_r \epsilon_0$ se trata da constante dielétrica do meio, T a temperatura termodinâmica, I a força iônica, $k_B T$ é a energia de Boltzmann, ϵ uma constante que remete a carga elétrica, e N_A o número de Avogadro. Logo, é notável destacar que a mudança da força iônica modifica a espessura efetiva da atmosfera iônica, viscosidade do meio, e conseqüentemente o raio iônico hidratado.

Portanto, o uso de uma espécie de referência corrige tanto o raio hidrodinâmico como a viscosidade do meio. Por fim, quando se realiza a aplicação do fator de correção é esperado que se determine o pK_a termodinâmico diretamente, e não o pK_a aparente porque foi utilizado como referencial uma espécie de referência com os seus dados expressos em diluição infinita.

Destaca-se que o fator de correção (δ) corrige também aspectos de temperatura, porque tanto a espessura efetiva da atmosfera iônica, a viscosidade e o raio hidrodinâmico dependem da temperatura. Basta quantificar o intervalo de temperatura onde a correção pode ser aplicada satisfatoriamente.

Idealmente é esperado que a projeção da mobilidade da espécie de referência em função do pH seja constante, e o fator de correção seja igual a 1,0 conforme apresentado na figura 4.1.1. Havendo divergências, a correção será aplicada ao analito que sofre o desvio equivalentemente a espécie de referência.

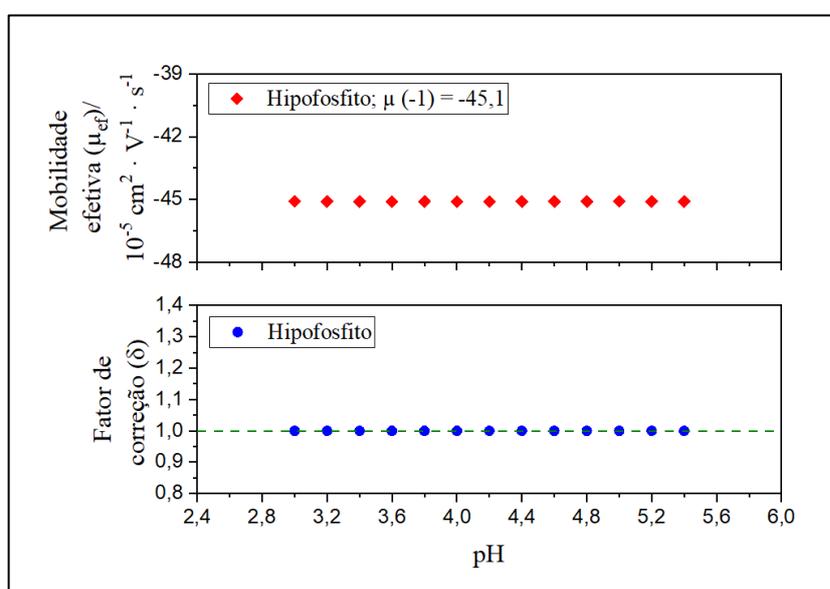


Figura 4.1.1 – Projeção teórica para o hipofosfito como uma espécie de referência. A mobilidade efetiva para a espécie de referência e o fator de correção serão constantes no intervalo de pH estudado, em termos de um eletrólito de corrida ideal (ou seja, que proporcione todas as características físicas e químicas para o eletrólito de corrida preparados para toda a curva de pH). A linha tracejada em verde no fator de correção em torno de 1,0 remete ao valor encontrado se a mobilidade experimental fosse equivalente ao da literatura para a espécie de referência em diluição infinita.

4.1.2 Aplicação do fator de correção (δ) e a sua importância

Em todos os casos empregou-se nas análises o hipofosfito como uma espécie de referência no intervalo de pH entre 4,20 e 5,82, enquanto o p-toluenossulfonato foi utilizado no pH entre 2,64 e 4,01. Mas em primeiro momento é interessante projetar a mobilidade efetiva dos analitos contra o pH sem a quantificação inicial do fator de correção (δ).

Assim, utilizando o ácido acético, ácido benzoico e o HIBA como exemplo percebe-se a ocorrência de um desvio bastante significativo no valor da determinação de pK_a destas espécies (ver as figuras 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3) quando comparado com os dados encontrados na literatura, e isso se deve pelos desvios encontrados na mobilidade efetiva destas espécies.

Um primeiro olhar sob as figuras de 4.1.1 a 4.1.3 é que em pH igual ou superior a 5 foi evidenciado que os pontos experimentais (em preto) formaram uma concavidade independente da espécie analisada. Isso significa que o eletrólito de corrida utilizado não é ideal, ou seja, indica que as suas características físicas e químicas não são uniformes de um ponto a outro.

O comportamento pode ser visualizado nos gráficos de mobilidade efetiva contra o pH (figuras 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3), construídas com o auxílio do *software Origin*.

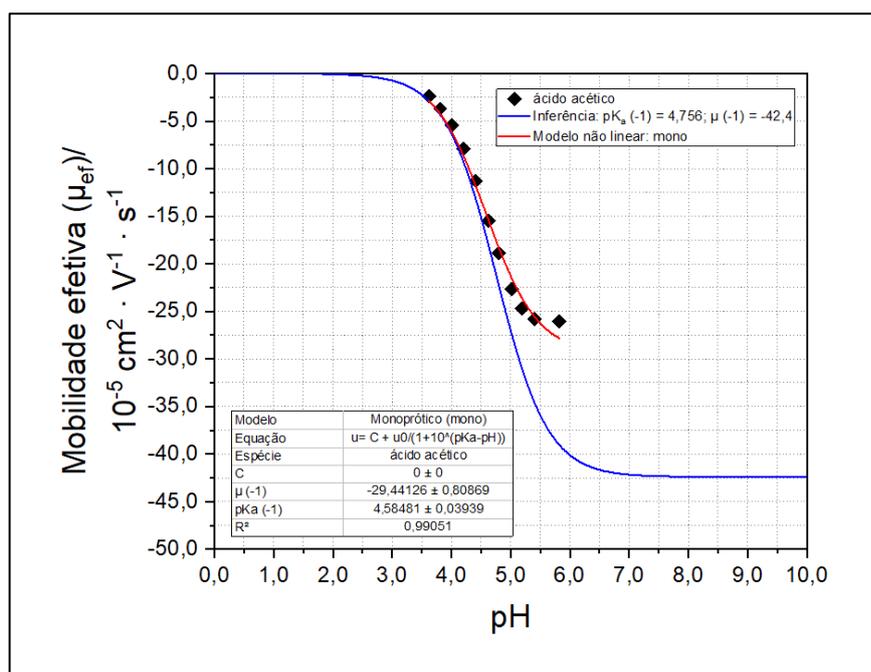


Figura 4.1.2 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido acético com o fator de correção não aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo qual a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido

monoprótico, o valor do pK_a do ácido acético obtido foi de $4,58 \pm 0,04$, com a mobilidade de $(-29,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99051$.

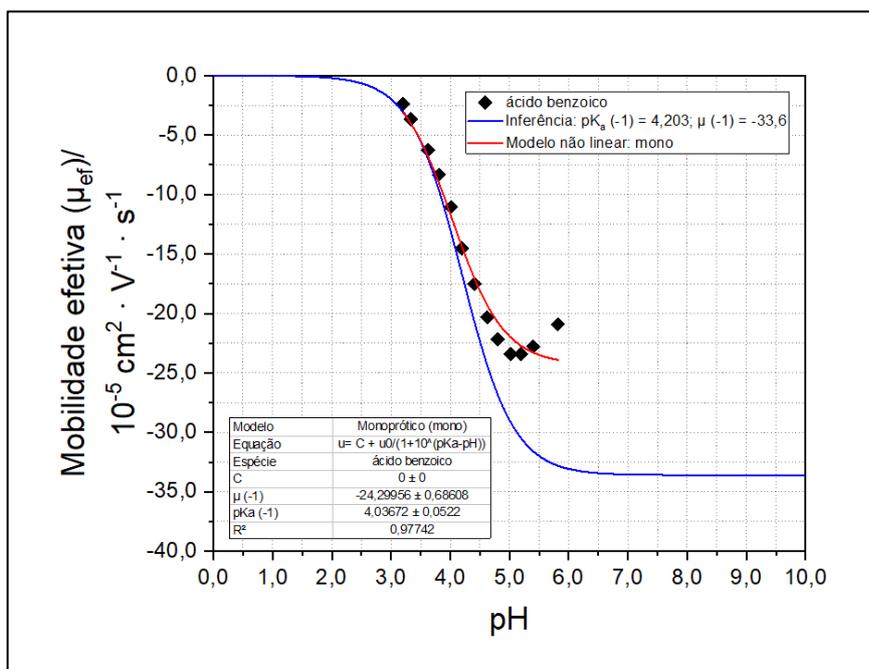


Figura 4.1.3 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido benzoico com o fator de correção não aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do ácido benzoico obtido foi de $4,04 \pm 0,05$, com a mobilidade de $(-24,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,97742$.

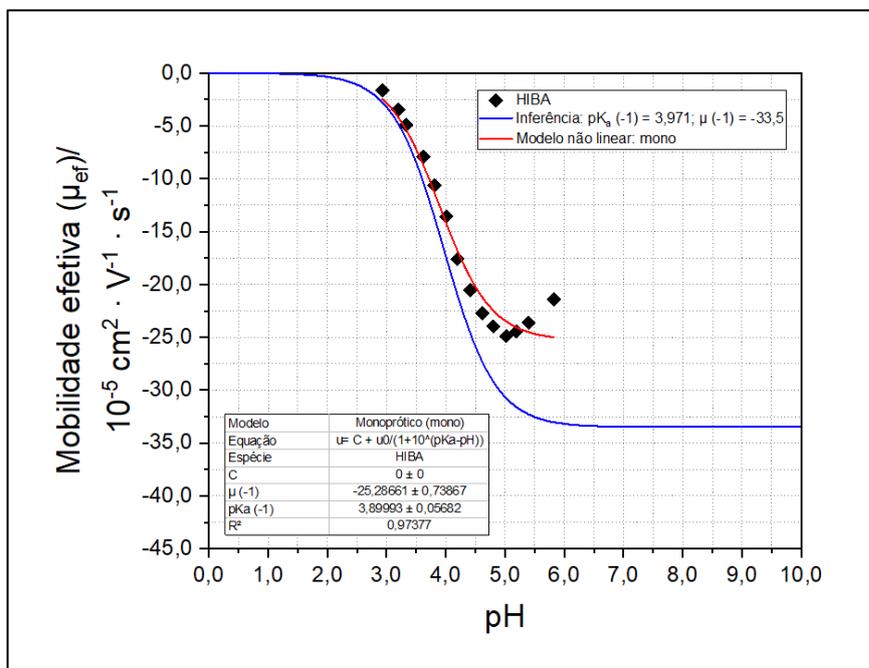


Figura 4.1.4 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o HIBA com o fator de correção não aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do HIBA obtido foi de $3,90 \pm 0,06$, com a mobilidade de $(-25,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,97377$.

Obviamente, uma correção deve ser realizada na mobilidade efetiva dos analitos. Inicialmente deve ser estudado o comportamento da espécie de referência frente a variação do pH, e em condições ideais tanto a mobilidade efetiva como o fator de correção devem permanecer constante. Porém isso não foi observado conforme ilustrado na figura 4.1.5.

A comprovação de que a viscosidade foi amplificada é atrelada a limitação da mobilidade efetiva das espécies, tanto do analito como das espécies de referência, em até 72% do valor máximo que elas poderiam assumir em diluição infinita.

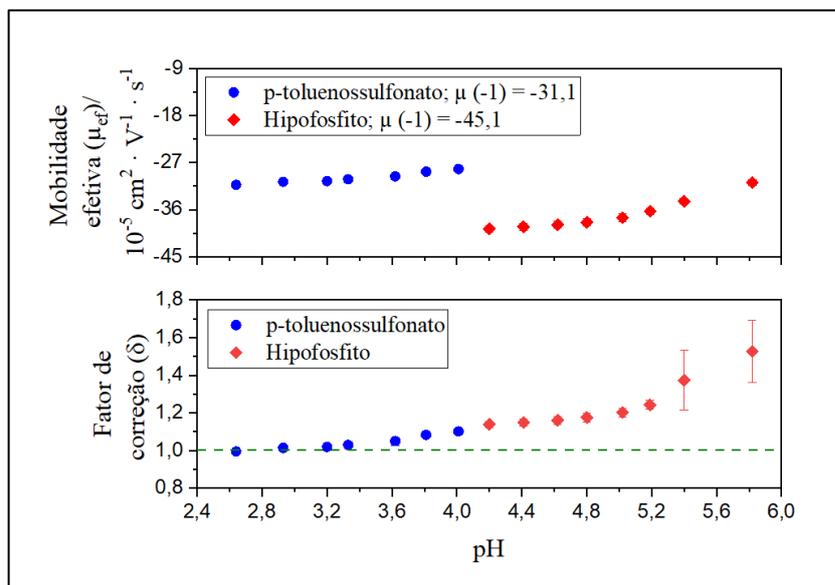


Figura 4.1.5 – Mobilidade efetiva e o fator de correção em função do pH utilizando β -alanina: Cl^- como um eletrólito de corrida para uma força iônica igual a $15,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. A linha tracejada em verde no fator de correção em torno de 1,0 remete ao valor encontrado se a mobilidade experimental fosse equivalente ao da literatura para a espécie de referência em diluição infinita.

A figura 4.1.5 indica que a mobilidade das espécies de referência não permaneceu constante no intervalo de pH trabalhado. Por outro lado, o aumento da concentração da β -alanina implica na redução da mobilidade efetiva da espécie de referência e dos analitos, ocasionada pela elevação da viscosidade do meio. Essa informação é verdadeira porque a concentração de HCl foi aproximadamente constante em torno de $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (ver a tabela 3.1 no subtópico 3.2.2), enquanto a concentração de β -alanina variou de $13,39$ a $2385 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ conforme apresentado na figura 4.1.6.

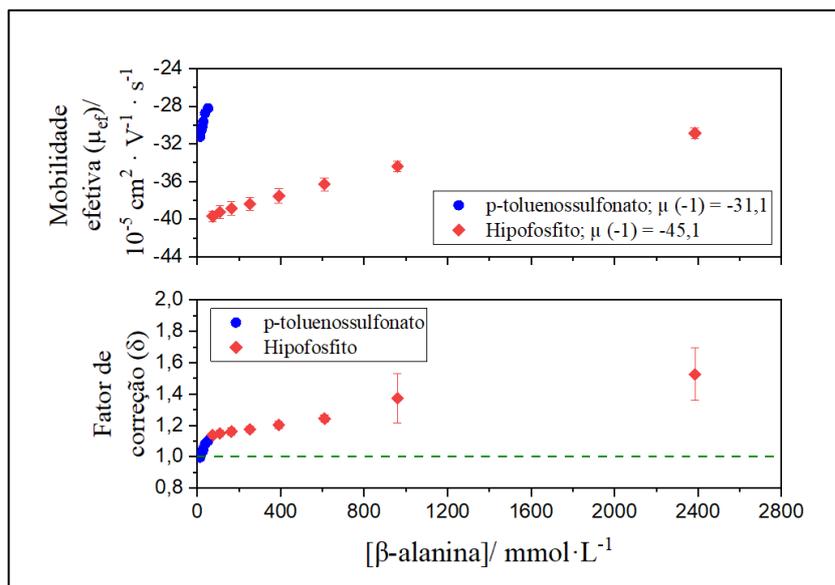


Figura 4.1.6 – Dependência da mobilidade efetiva das espécies de referência (p-toluenosulfonato e hipofosfito) em função da concentração de β -alanina. A concentração de HCl é aproximadamente constante em torno de $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, por isso o decaimento da mobilidade efetiva da espécie de referência é atribuível em função da concentração de β -alanina predominantemente. A linha tracejada em verde no fator de correção em torno de 1,0 remete ao valor encontrado se a mobilidade experimental fosse equivalente ao da literatura para a espécie de referência em diluição infinita.

Assim, trabalhando-se com os dados obtidos para o ácido acético, ácido benzoico e HIBA (ver as figuras 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3), mas agora com a aplicação do fator de correção (com auxílio da equação 4.4) foi possível projetar novas curvas para estas espécies conforme as figuras de 4.1.7 a 4.1.9.

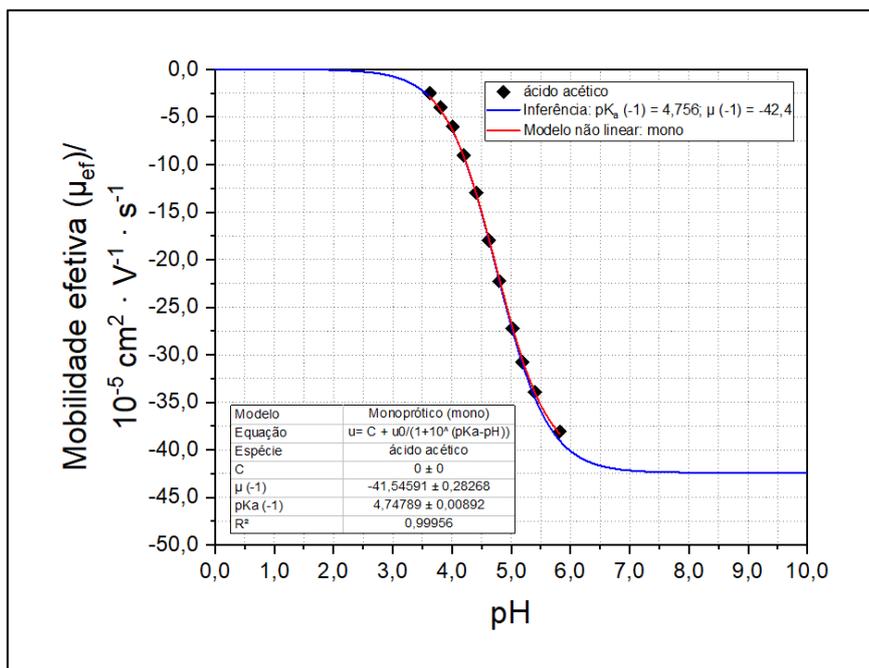


Figura 4.1.7 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido acético com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do ácido acético obtido foi de $4,748 \pm 0,009$, com a mobilidade de $(-41,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99956$.

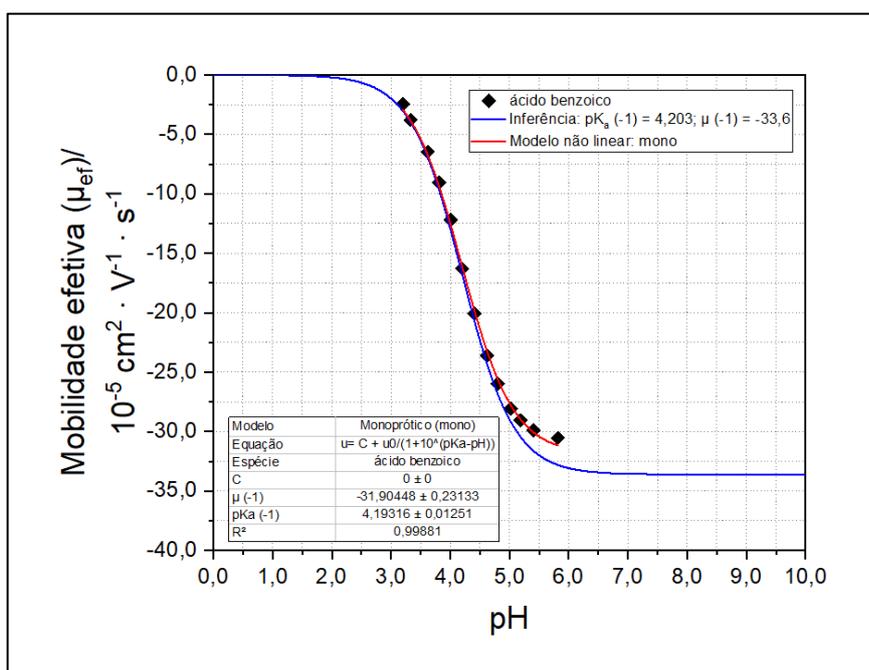


Figura 4.1.8 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido benzoico com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no

algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprotico, o valor do pK_a do ácido benzoico obtido foi de $4,19 \pm 0,01$, com a mobilidade de $(-31,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99881$.

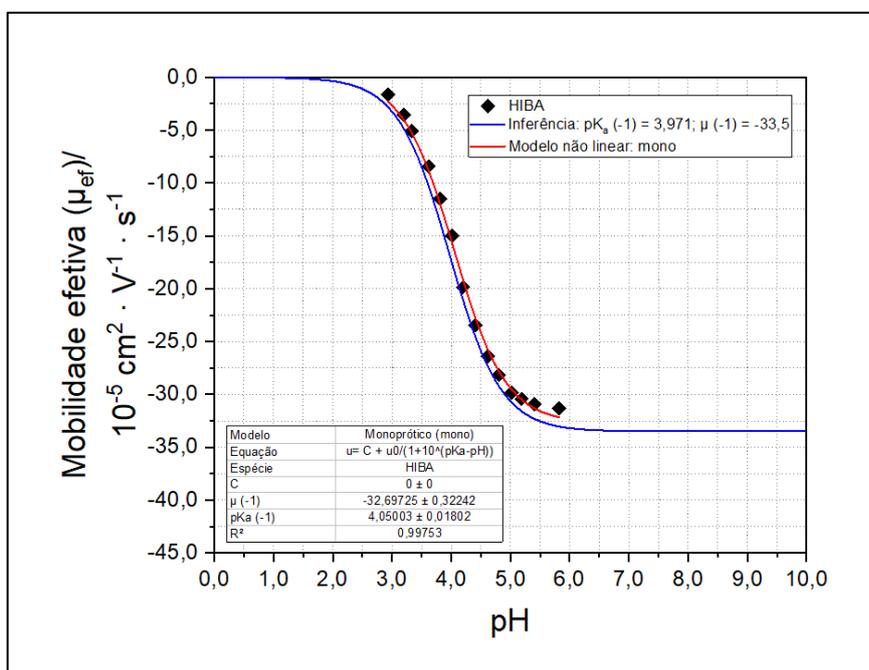


Figura 4.1.9 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o HIBA com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprotico, o valor do pK_a do ácido benzoico obtido foi de $4,05 \pm 0,02$, com a mobilidade de $(-32,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99753$.

Nota-se que o fator de correção corrigiu a mobilidade efetiva que o ânion do ácido acético, ácido benzoico e HIBA possam assumir, porque antes da aplicação do fator de correção a mobilidade efetiva foi limitada em até 72% da mobilidade efetiva que essas espécies poderiam assumir quando em diluição infinita. Consequentemente o valor do pK_a foi melhor correlacionado com o valor encontrado da literatura quando houve a aplicação do fator de correção, mas isso será melhor discutido no subtópico de efetividade do método no item 4.1.4.

4.1.3 Determinação de pK_a para espécies monoproticas e poliproticas

4.1.3.1 Determinação usando um modelo monoprotico

De maneira geral resta apresentar os resultados, com o fator de correção já aplicado, para as seguintes espécies monoproticas: ácido cloroacético, ácido gálico e aspirina; e poliproticas: ácido fumárico e aspartato. Conforme as figuras a seguir de 4.1.10 a 4.1.14:

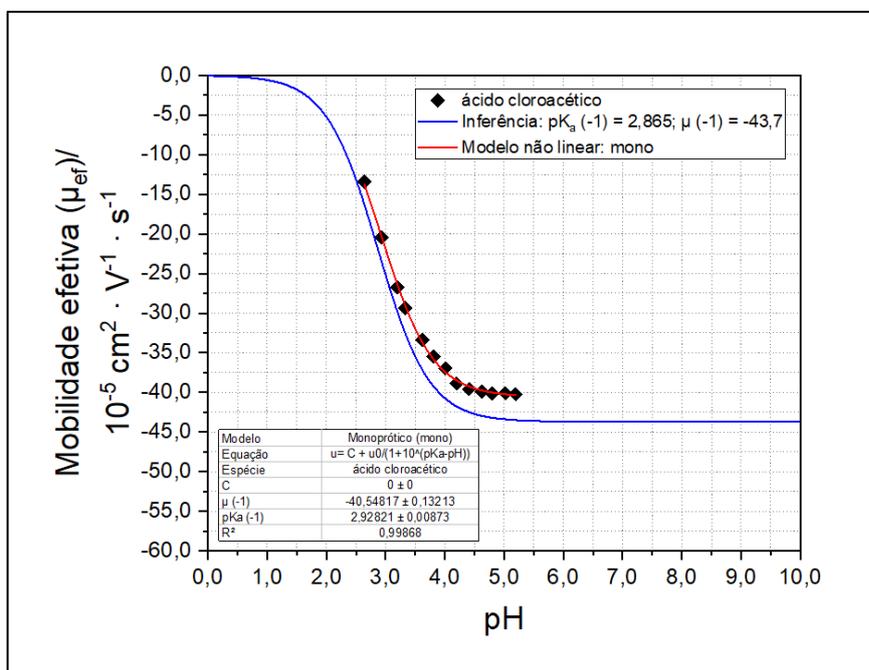


Figura 4.1.10 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido cloroacético com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprotico, o valor do pK_a do ácido cloroacético obtido foi de $2,928 \pm 0,009$, com a mobilidade de $(-40,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99868$.

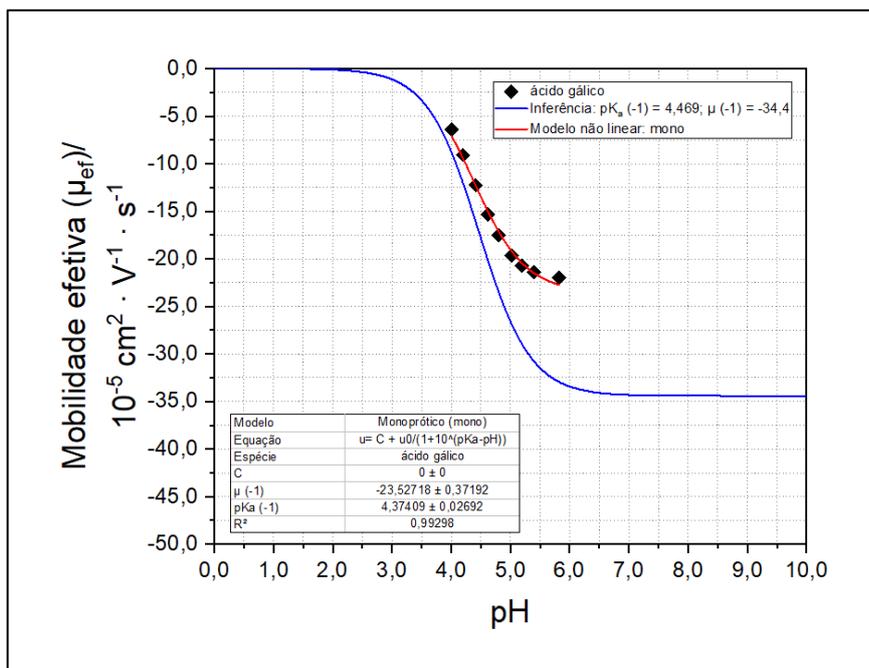


Figura 4.1.11 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido gálico com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do ácido gálico obtido foi de $4,37 \pm 0,03$, com a mobilidade de $(-23,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99298$.

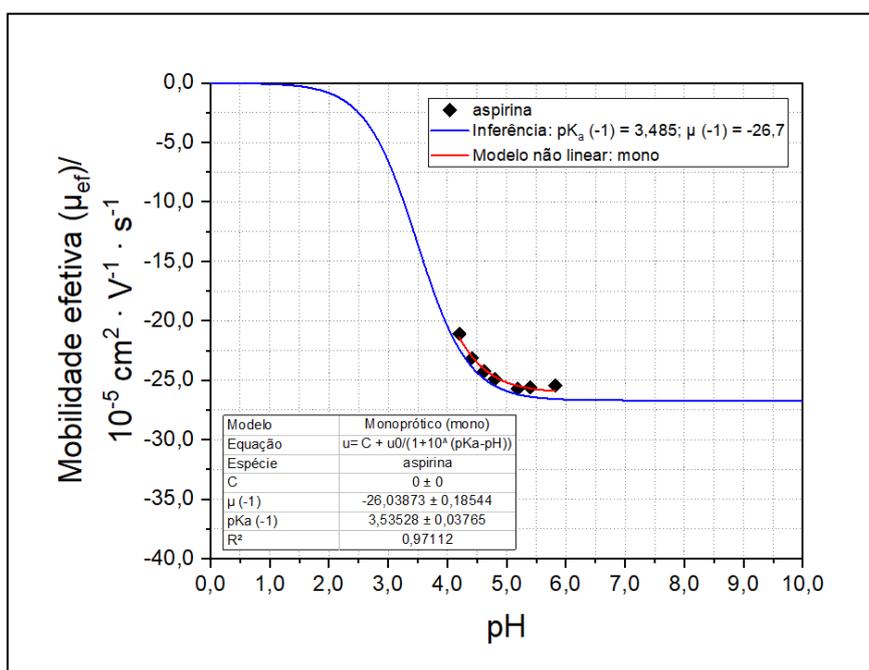


Figura 4.1.12 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para a aspirina com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo no algoritmo

onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a da aspirina obtido foi de $3,54 \pm 0,04$, com a mobilidade de $(-26,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,97112$.

Dentre essas três espécies houve apenas uma divergência no valor máximo de mobilidade efetiva do galato (figura 4.1.11), embora o valor determinado para o seu pK_a diverge em 0,1 do valor expresso na literatura.

Ainda utilizando o modelo matemático monoprótico, a determinação do pK_a (-1) e o pK_a (-2) para o ácido fumárico foi determinado. Usou-se o intervalo de pH entre 2,64 e 3,33 para quantificar o pK_a (-1), enquanto o pK_a (-2) foi quantificado no intervalo de pH entre 4,20 e 5,82 conforme apresentado na figura 4.1.13.

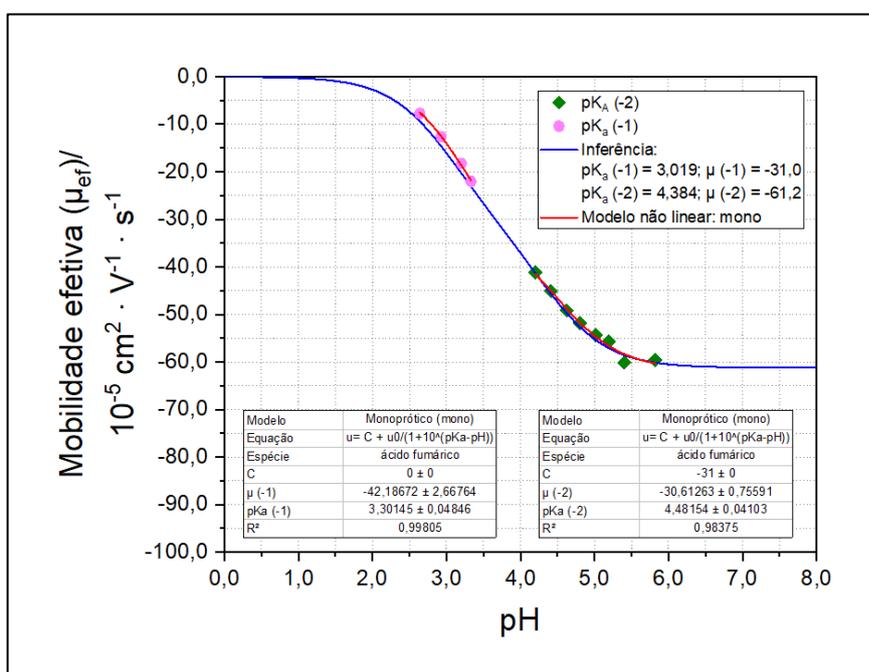


Figura 4.1.13 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido fumárico com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, e igual a $-31 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ quando o pK_a (-1) encontra-se 100% ionizado, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a (-1) para o ácido fumárico obtido foi de $3,30 \pm 0,05$, com a mobilidade de $(-42 \pm 3) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99805$. O valor do pK_a (-2) para o ácido fumárico obtido foi de $4,48 \pm 0,04$, com a mobilidade de $(-62 \pm 3) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,98375$.

Já para o aspartato o pK_a (-1) a caracterização também foi utilizando um modelo monoprótico, mas no intervalo de pH entre 3,20 e 5,19 conforme apresentado na figura 4.1.14.

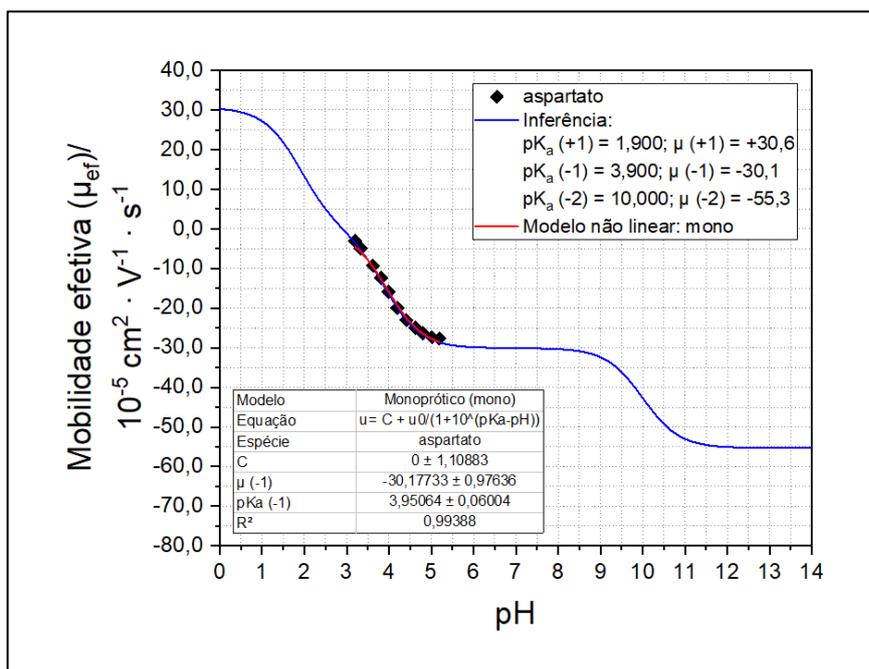


Figura 4.1.14 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o aspartato com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a mobilidade deve ser positiva, negativa ou nula, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a (-1) para o aspartato obtido foi de $3,95 \pm 0,06$, com a mobilidade de $(-30 \pm 1) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99388$.

4.1.3.2 Determinação usando um modelo poliprótico

Fazendo a quantificação dos valores de pK_a com uma modelagem diprótica (ver a equação 1.26 no subtópico 1.4.3) obtém-se para ácido fumárico a seguinte curva dada na figura 4.1.15:

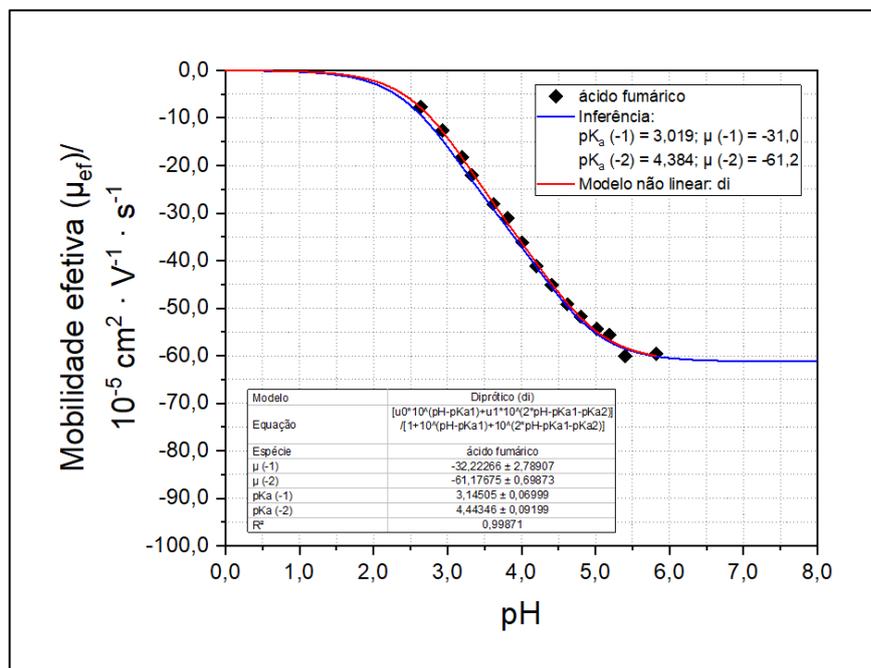


Figura 4.1.15 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido fumárico com o fator de correção aplicado. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido diprótico, o valor do $\text{pK}_a(-1)$ para o ácido fumárico obtido foi de $3,15 \pm 0,07$, com a mobilidade de $(-32 \pm 3) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. O valor do $\text{pK}_a(-2)$ para o ácido fumárico obtido foi de $4,44 \pm 0,09$, mobilidade de $(-61,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99871$.

Comparando os valores obtidos de pK_a quando utilizado o modelo matemático diprótico (figura 4.1.15) com a determinação do modelo matemático monoprótico (figura 4.1.13) para o ácido fumárico, a principal diferença ocorre porque há uma contribuição da mobilidade $\mu(-1)$ frente a mobilidade efetiva de $\mu(-2)$. Esta sobreposição das mobilidades de $\mu(-1)$ e $\mu(-2)$ não são levadas em consideração no modelo monoprótico, e por isso a modelagem matemática diprótica torna-se mais exata.

Experimentalmente a sobreposição de $\mu(-2)$ com $\mu(-1)$ torna a mobilidade efetiva do fumarato maior do que deveria quando considerado um modelo matemático monoprótico, e isso reduz a exatidão do modelo não linear monoprótico na quantificação do pK_a para o ácido fumárico. Essa mobilidade efetiva maior do que deveria é representada pela sobreposição da área hachurada ilustrada na figura 4.1.16, porque nessa região ocorre a sobreposição de $\mu(-2)$ com $\mu(-1)$. Os picos foram obtidos derivando-se a função adotada na modelagem matemática, ou seja, o pico em preto é a derivada primeira para o modelo matemática diprótico. Enquanto o pico em vermelho e em azul a derivada primeira para um modelo monoprótico, mas note que o modelo não linear monoprótico não leva em consideração entre a sobreposição de mobilidades.

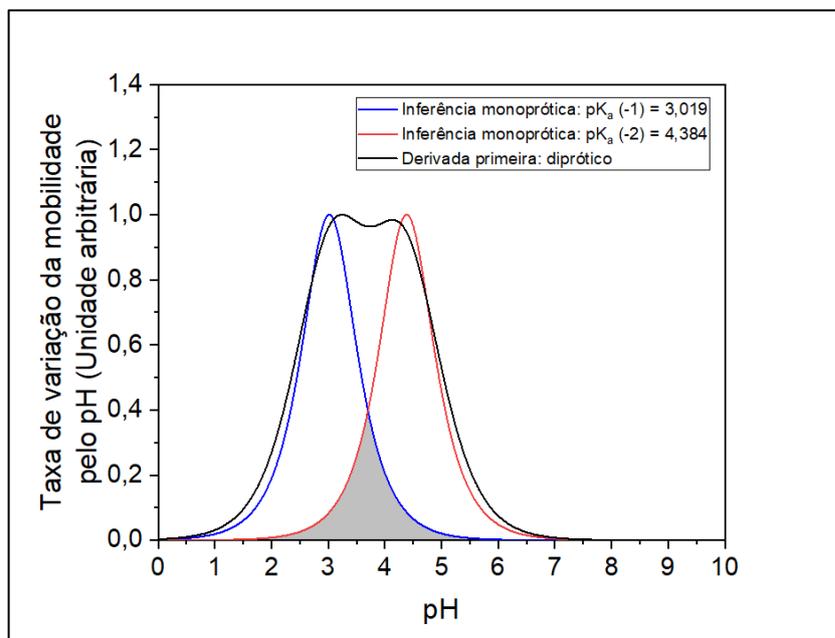


Figura 4.1.16 – A área hachurada representa a sobreposição de áreas dada pela contribuição individual das mobilidade $\mu(-1$, dada pela acurva em azul) e pela $\mu(-2$, dada pela curva em vermelho) frente a mobilidade efetiva resultante da espécie. A linha contínua em preto representa a derivada primeira do modelo diprótico que é mais exato ao que pode ser obtido em um laboratório para a espécie analisada. O gráfico foi normalizado, e consiste em uma projeção puramente teórica.

O aspartato a modelagem foi realizada com uma configuração triprótica (ver a equação 1.28 no subtópico 1.4.3). O resultado da determinação experimental (curva em vermelho) e da teórica (curva em azul) pode ser vista na figura a seguir (figura 4.1.17):

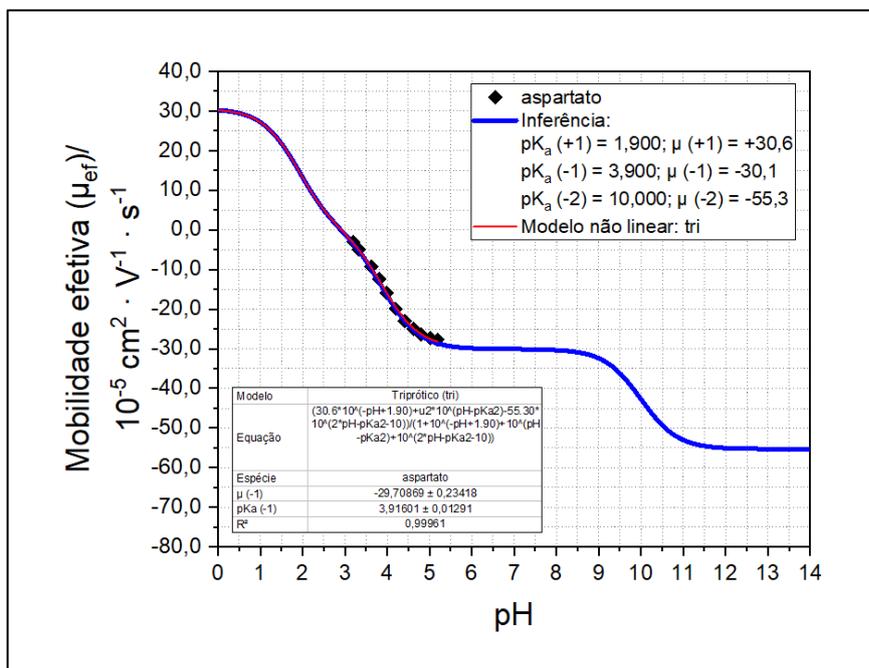


Figura 4.1.17 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o aspartato com o fator de correção aplicado. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido poliprótico, o valor do $pK_a (-1)$ para o aspartato obtido foi de $3,92 \pm 0,01$, com a mobilidade de $(-29,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99961$.

Comparando as estimações de um modelo monoprótico (figura 4.1.14) com o modelo poliprótico (figura 4.1.17) para o aspartato, observa-se que a sobreposição entre as mobilidade $\mu(+1)$ e $\mu(-1)$ ocorre com menor sobreposição do que aquela para as mobilidade $\mu(-1)$ e $\mu(-2)$ do ácido fumárico. Portanto, a divergência entre o valor de pK_a determinado utilizando um modelo poliprótico e um modelo monoprótico para o aspartato é menor do que aquela para o ácido fumárico quando comparado com os valores expressos na literatura (a área hachurada da figura 4.1.16 é inferior à da figura 4.1.18).

Assim, constata-se que um modelo monoprótico estima muito bem os valores de pK_a tanto para uma espécie monoprótica como polipróticas, desde que tenha uma diferença de pelo menos 1,28 no valor de pK_a entre estes para que não ocorra uma sobreposição de 5,0% em fração molar ionizada de um com o outro, isso quando é adotado um modelo não linear monoprótico exclusivamente. O interesse nessa divergência de 1,28 em unidade de pK_a é para que não ocorra sobreposição de mobilidade da própria espécie poliprótica, e assim o modelo matemático monoprótico pode ser usado com uma exatidão satisfatória.

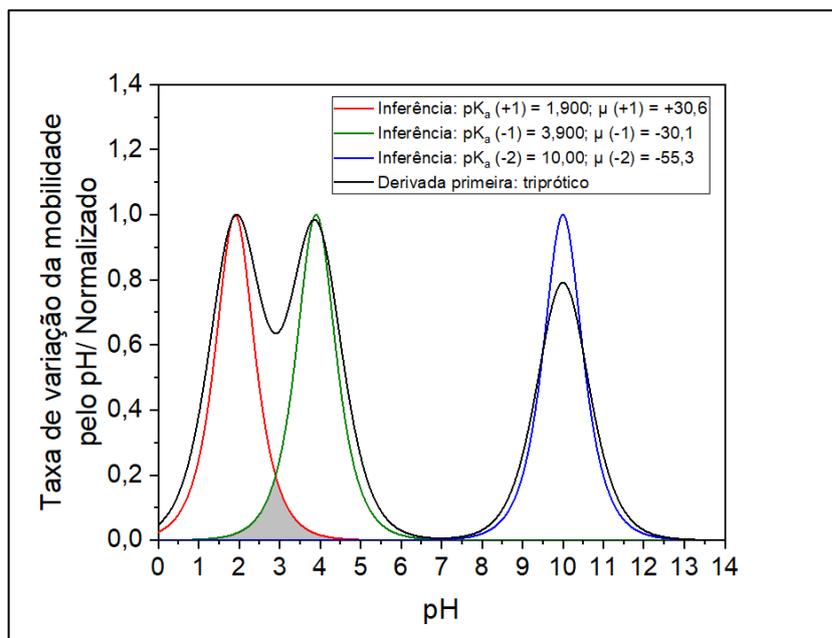


Figura 4.1.18 – A área hachurada representa a sobreposição de áreas dada a contribuição individual das mobilidade $\mu(+1)$ e $\mu(-1)$, em um modelo não linear monoprótico representado pelas linhas vermelha, verde e azul frente a mobilidade efetiva resultante da espécie. A linha contínua em preto representa a derivada primeira do modelo poliprótico que é mais exato ao que pode ser obtido em um laboratório de uma espécie analisada. O gráfico foi normalizado, e consiste em uma projeção puramente teórica.

4.1.4 O uso de um padrão interno

4.1.4.1 O uso de um padrão interno na eletroforese capilar

Diferentemente de uma espécie de referência que atua na determinação do pK_a indiretamente (porque corrige a mobilidade efetiva diretamente), o padrão interno deve possuir um valor de pK_a próximo ao do analito para que quantifique o seu respectivo valor de pK_a diretamente.

O conceito até aqui apresentado é útil somente para um ácido ou base fraca monoprotica¹³. Apesar disso, o mesmo raciocínio poderia ser aplicado de modo completo para um ácido ou base forte^{60, 61}, ou um composto poliprótico de forma mais ampla¹⁸. Portanto, dentre as espécies até aqui então trabalhadas o ácido fumárico será desconsiderado na análise porque os seus valores de pK_a são muito próximos um dos outros, e o foco é a simplificação do conceito.

Pela limitação do tempo para a realização deste trabalho, não foi possível adicionar o padrão interno concomitantemente com o analito nas análises. No entanto, os dados dos eletroferogramas do apêndice A foram trabalhados com o padrão interno e o analito mesmo que ocorrendo de modo individualizados. Baseado nos eletroferogramas do apêndice A foi

observado em 158 casos que a mobilidade da espécie de referência variou em $(1,4 \pm 0,6)\%$ em corridas completamente independentes umas das outras, mas sendo realizadas sob as mesmas condições. Isso quer dizer, que a determinação da mobilidade efetiva é muito bem comportada no método e o padrão interno poderia quantificar o valor de pK_a para um analito ainda que estes fossem realizados em corridas separadas, dado o bom comportamento da quantificação da mobilidade efetiva utilizando a eletroforese capilar.

4.1.4.2 O método do padrão interno

No subtópico 1.4.1 foi apresentado a equação 1.15, porém esta equação pode ser reescrita como:

$$pK_a^{apar} = pH + \log \left(\frac{\mu_{A^-} - \mu_{ef}}{\mu_{ef}} \right) = pH + \log Q, \quad Q = \frac{\mu_{A^-} - \mu_{ef}}{\mu_{ef}} \quad (4.8)$$

Na equação 4.8 o pK_a^{apar} significa o pK_a aparente, μ_{A^-} a mobilidade efetiva máxima assumida pela espécie completamente ionizada, μ_{ef} a mobilidade efetiva da espécie parcialmente ionizada. A equação 4.8 é aplicável tanto para o analito quanto para o padrão interno, e fazendo a subtração que ocorre no analito com o padrão interno teremos:

$$pK_a^{apar}(\text{analito}) - pK_a^{apar}(\text{referência}) = \log Q_{\text{Analito}} - \log Q_{\text{referência}} \quad (4.9)$$

Rearranjando a equação 4.9, obtém-se:

$$pK_a^{apar}(\text{analito}) = pK_a^{apar}(\text{referência}) + \log Q_{\text{Analito}} - \log Q_{\text{referência}} \quad (4.10)$$

A equação 4.10 é independente da influência do pH do meio (não seria necessário saber o seu valor numérico por exemplo), embora a força iônica tenha influência por conta do pK_a ser o aparente e não o termodinâmico. Uma outra vantagem da técnica é a possibilidade da quantificação do valor de pK_a para um analito utilizando somente dois eletrólitos de corrida, não sendo necessária a construção de uma curva em si.

Portanto foi feito a avaliação nas seguintes condições para a obtenção dos seguintes valores de pK_a (ver tabela 4.1) utilizando o método do padrão interno, com uma força iônica de $15,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e utilizando eletrólito de corrida de β -alanina: Cl^- descrito na tabela 3.1 (subtópico 3.2.2) para estas espécies: ácido acético, aspartato, aspirina, ácido benzoico, ácido cloroacético, ácido gálico e HIBA. Ou seja, as mesmas trabalhadas utilizando a espécie de referência, exceto pela ausência do ácido fumárico.

Obteve-se os valores de pK_a contidos na tabela 4.1 com auxílio da equação 4.10. Destaca-se que ainda que o método seja do padrão interno, a aplicação do fator de correção (δ) pode ou não ser aplicado, portanto na tabela 4.1 houve essa diferenciação.

Tabela 4.1 – Condições da escolha do pH para a obtenção da mobilidade efetiva máxima (μ_{A^-}) assumida pela espécie, e o pH para obter a mobilidade efetiva (μ_{ef}) da espécie parcialmente ionizada. O número de determinações do pK_a foi a quantidade de vezes possível de estimar o valor do pK_a do analito por um determinado padrão interno. Nas colunas de determinação do valor do pK_a é apresentado com e sem a aplicação do fator de correção (δ).

| Analito | Padrão interno | pH para a obtenção de μ_{A^-} | pH para a obtenção de μ_{ef} | Número de determinações do pK_a | pK_a do ácido correspondente sem a aplicação de δ | pK_a do ácido correspondente com a aplicação de δ |
|--------------|----------------|-----------------------------------|---|-----------------------------------|--|--|
| acetato | benzoato | 5,40 e 5,82 | 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 10 | 4,63 \pm 0,11 | 4,74 \pm 0,07 |
| | galato | | 4,01; 4,20; 4,41 e 4,62 | 8 | | |
| | HIBA | | 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 10 | | |
| aspartato | benzoato | 5,19 | 4,01; 4,20 e 4,41 | 3 | 3,85 \pm 0,07 | 3,90 \pm 0,07 |
| | cloroacetato | 5,02 e 5,19 | 4,01 | 2 | | |
| | galato | 5,19 | 4,01; 4,20 e 4,41 | 3 | | |
| aspirina | benzoato | 5,19; 5,40 e 5,82 | 3,20; 3,33; 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 21 | 3,42 \pm 0,28 | 3,50 \pm 0,08 |
| | cloroacetato | 5,02 e 5,19 | 3,20; 3,33; 3,62; 3,81 e 4,01 | 10 | | |
| | HIBA | 5,02; 5,19; 5,40 e 5,82 | 3,20; 3,33; 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 28 | | |
| benzoato | acetato | 5,40 e 5,82 | 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 10 | 4,21 \pm 0,14 | 4,18 \pm 0,07 |
| | galato | 5,19; 5,40 e 5,82 | 4,01; 4,20 e 4,41 | 9 | | |
| | HIBA | | 3,20; 3,33; 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 21 | | |
| cloroacetato | benzoato | 5,19 | 3,20; 3,33; 3,62; 3,81 e 4,01 | 5 | 2,64 \pm 0,10 | 2,87 \pm 0,08 |
| | galato | | 4,01 | 1 | | |
| | HIBA | 5,02 e 5,19 | 2,93; 3,20; 3,33; 3,62; 3,81 e 4,01 | 12 | | |
| galato | acetato | 5,40 e 5,82 | 4,01; 4,20; 4,41 e 4,62 | 8 | 4,50 \pm 0,08 | 4,40 \pm 0,04 |
| | benzoato | 5,19; 5,40 e 5,82 | 4,01; 4,20 e 4,41 | 9 | | |
| | cloroacetato | 5,19 | 4,01 | 1 | | |
| HIBA | acetato | 5,40 e 5,82 | 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 10 | 4,01 \pm 0,16 | 4,07 \pm 0,03 |
| | benzoato | 5,19; 5,40 e 5,82 | 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 15 | | |
| | galato | | 3,62; 3,81; 4,01; 4,20 e 4,41 | 15 | | |

4.1.5 Efetividade da Técnica

Baseado nos dados da tabela 4.1 e nos dados obtidos dos valores de pK_a utilizando o modelo matemático não linear apresentado no tópico de 4.1.2 a 4.1.4 é possível estimar qual foi a efetividade do método utilizando um C^4D em conjunto com o equipamento comercial.

Uma observação geral pode ser obtida com a determinação da correlação entre os valores de pK_a obtido neste trabalho com aqueles que podem ser consultados na literatura, o parâmetro da correlação é conhecido como o coeficiente de Pearson (poderia ser obtido também pela raiz quadrada do R^2) e mede o grau de associação entre as variáveis comparadas como pode ser visualizado no gráfico contido na figura 4.1.19. O valor do coeficiente angular está associado com a eficácia do método, uma vez que este sendo igual a 1 implica que o método caracterizou em 100% de eficácia os valores de pK_a frente aqueles relatados na literatura.

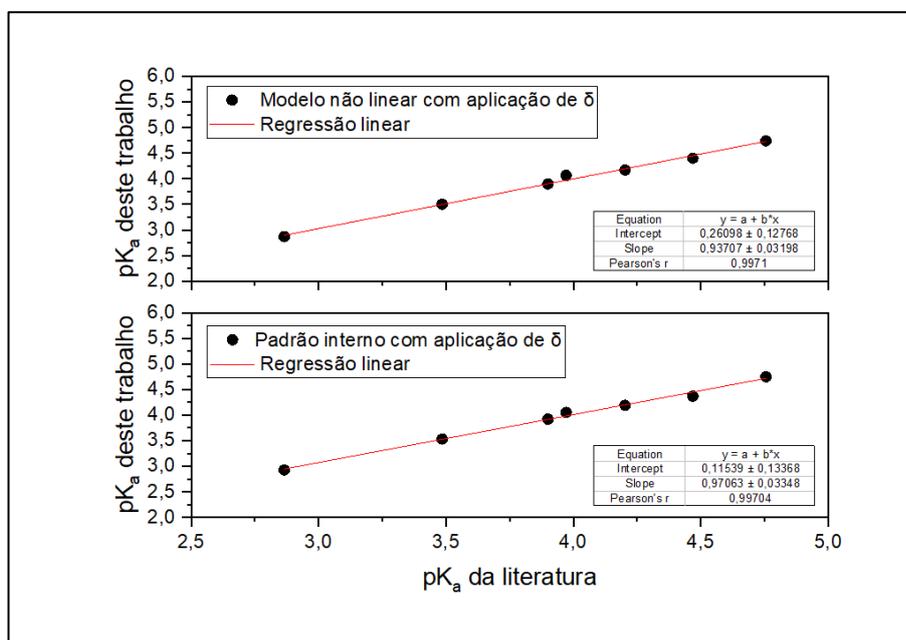


Figura 4.1.19 – Grau de correlação entre os valores de pK_a obtidos neste trabalho com aqueles estabelecidos da literatura. O modelo não linear com aplicação do fator de correção (δ) correlacionou as variáveis em 99,71% dos casos, enquanto o método utilizando o padrão interno com a aplicação do fator de correção (δ) em 99,70%. A eficiência do método utilizando o padrão interno com a aplicação do fator de correção foi de $(97 \pm 3)\%$, enquanto no método do modelo não linear com a aplicação do fator de correção em $(94 \pm 3)\%$.

Porém, apesar da correlação se elevada entre as variáveis tanto no modelo não linear como aquele utilizando o padrão interno, o método utilizando o padrão interno possui uma maior eficiência da técnica porque o seu coeficiente angular obtido na regressão linear foi de

(97 ± 3) % de eficácia, contra (94 ± 3)% do método não linear. Isso é explicado porque o método não linear o valor quantificado de pK_a é realizado uma única vez, mas no método utilizando o padrão interno por diversas vezes. Por exemplo, baseado na tabela 4.1 o pK_a da aspirina utilizando o método do padrão interno foi determinado 59 vezes.

No subtópico 4.1.1 foi explicado que a aplicação do fator de correção deveria corrigir a força iônica do meio, agora finalmente isso será provado.

Comparando-se a média dos desvios (dado pela equação 4.11) entre os valores quantificados por esse trabalho com aqueles expressos na literatura, percebe-se que quando é utilizado o método do padrão interno sem a aplicação do fator de correção o desvio foi de ($-0,06 \pm 0,09$) unidade de pK_a , isso quer dizer que na média o pK_a experimental esteve 0,06 unidade inferior do pK_a da literatura. Em outras palavras, o pK_a experimental trata-se do pK_a aparente e o desvio de 0,06 unidade inferior ao que deveria é explicado pela força iônica do meio conforme a equação de Debye-Hückel (calculado, o desvio é de exatamente 0,06 para uma força iônica de $15,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

$$\text{Desvio de } pK_a = pK_a^{\text{experimental}} - pK_a^{\text{literatura}} \quad (4.11)$$

No entanto, quando ocorre a aplicação do fator de correção a média do desvio passa a ser de ($-0,001 \pm 0,051$) unidade de pK_a , isto é, houve a correção da força iônica do meio de modo a quantificar o valor do pK_a das espécies analisada como o pK_a termodinâmico diretamente, como já esperado. Isso também foi observado quando se aplicou o fator de correção para o método do modelo não linear, que apresentou uma média de ($0,01 \pm 0,06$) unidade de pK_a como pode ser visualizado na figura 4.1.20.

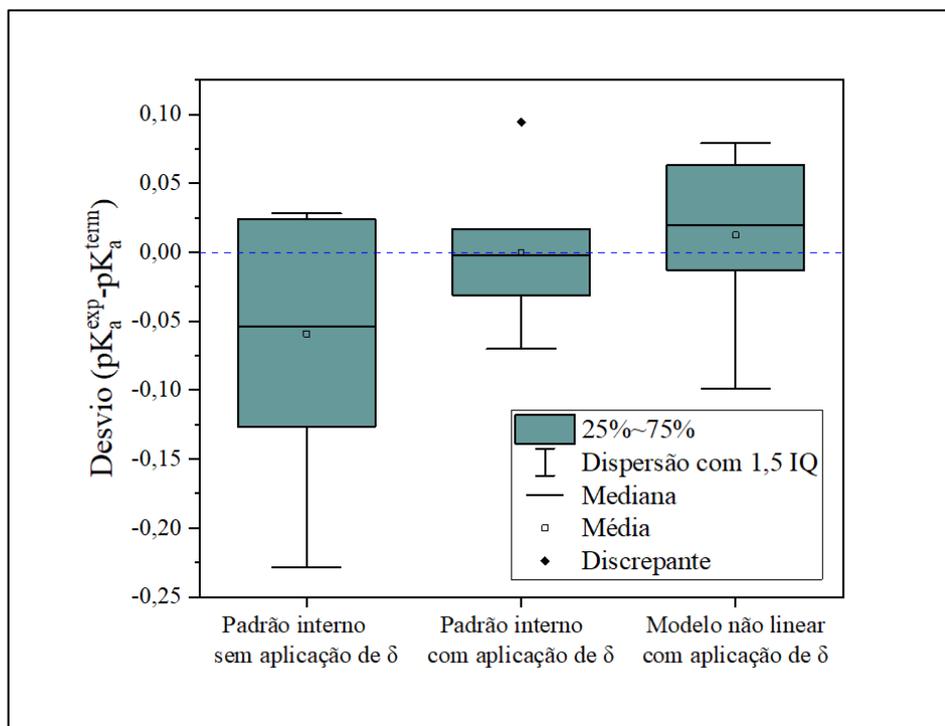


Figura 4.1.20 - Diagrama de caixa (*box plot*) para o método utilizando o padrão interno sem e com a aplicação do fator de correção (δ), e para o método utilizando o modelo não linear com a aplicação do fator de correção. A caixa em verde representa a amplitude da caixa dada pelo intervalo entre o primeiro e o terceiro quartil (IQ). O ponto discrepante é desconsiderado por não estar no limite tolerado pela extensão de até 1,5 da amplitude da caixa em relação ao primeiro e o terceiro quartil.

A figura 4.1.20 pode ser visualizado que a maior parte dos valores obtidos para o método utilizando o padrão interno sem a aplicação do fator de correção (δ) estão concentrados em um desvio negativo, precisando de uma correção para transformar o pK_a aparente em termodinâmico. Além disso, percebe-se que na ausência da aplicação do fator de correção a amplitude da caixa do diagrama de caixa é mais elevada do que quando se aplica o fator de correção, e isso se deve porque o fator de correção além de corrigir a força iônica do meio realiza também a correção de outras variáveis (como viscosidade) de modo a torna a amplitude da caixa menor, e mais concentrada em torno de um desvio de pK_a em torno de zero.

O método utilizando o modelo não linear com aplicação do fator de correção (δ) possui uma amplitude de caixa satisfatória, levando-se em consideração que foi realizada uma única quantificação do valor de pK_a utilizando uma única curva para tal determinação. Diferentemente do método utilizando o padrão interno que pode ser determinado o valor de pK_a inúmeras vezes para uma mesma espécie.

4.2 Dados obtidos com um equipamento de eletroforese capilar manufacturado (BeerBox)

4.2.1 Utilizando o modelo linear

O ácido benzoico (figura 4.2.1), ácido láctico (figura 4.2.2) e o aspartato (4.2.3) foram analisados com o BeerBox e obteve-se os seguintes resultados utilizando um modelo não linear monoprotónico com um fator de correção não aplicado:

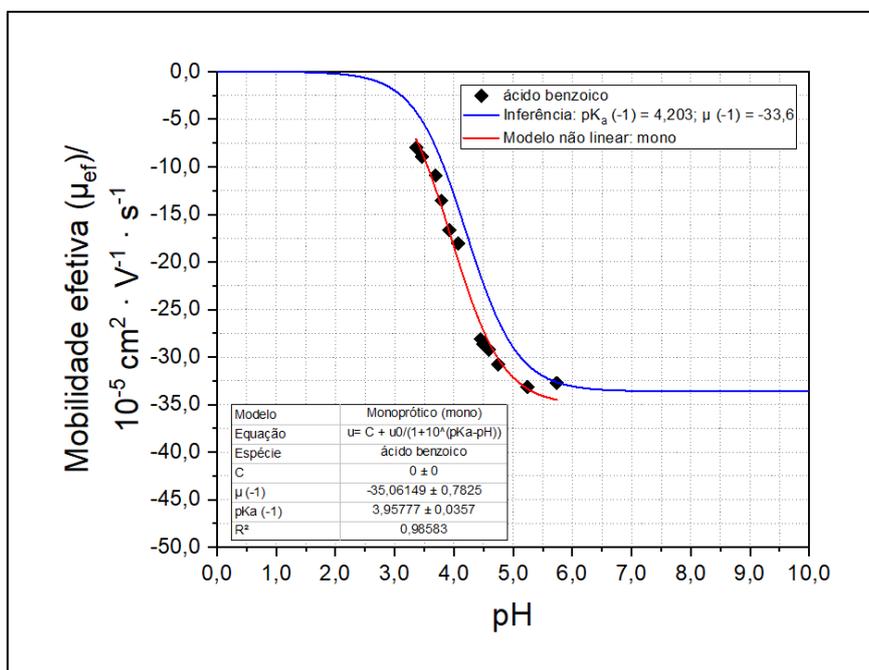


Figura 4.2.1 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido benzoico com o fator de correção não aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprotónico, o valor do pK_a do ácido benzoico obtido foi de $3,96 \pm 0,04$, com a mobilidade de $(-35,1 \pm 0,8) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,98583$.

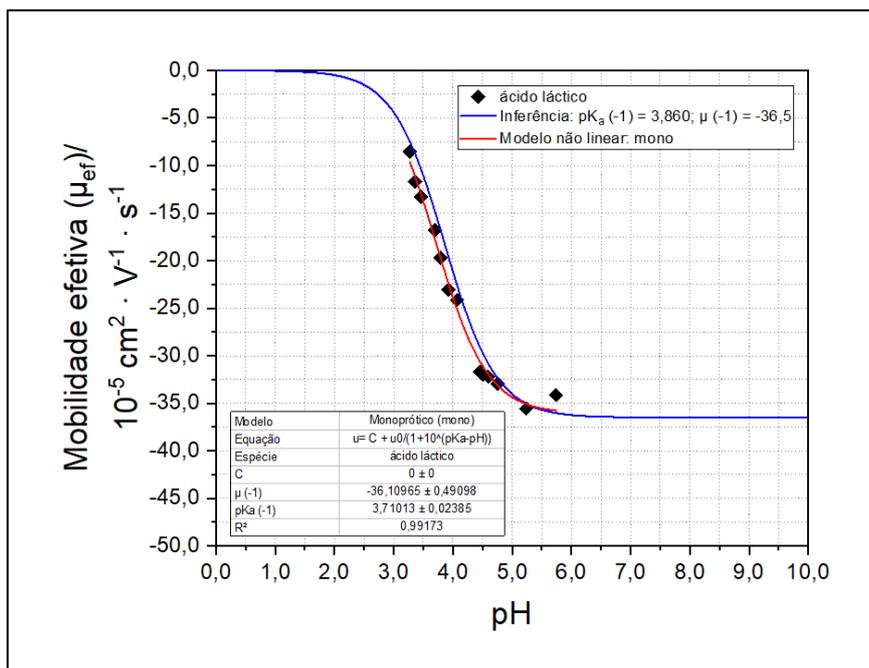


Figura 4.2.2 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido láctico com o fator de correção não aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do ácido láctico obtido foi de $3,71 \pm 0,02$, com a mobilidade de $(-36,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99173$.

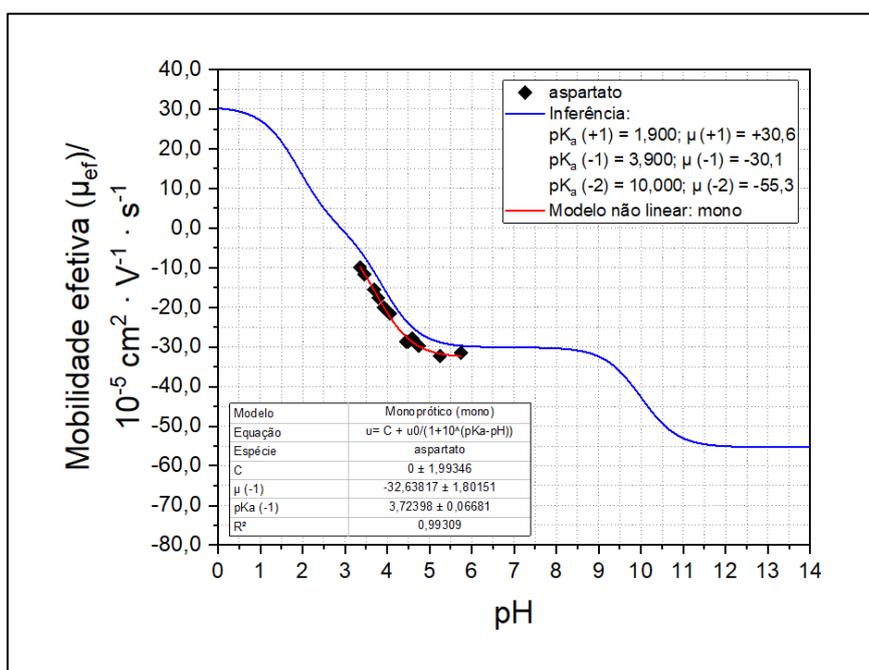


Figura 4.2.3 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o aspartato com o fator de correção não aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a

mobilidade deve ser positiva, negativa ou nula, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do aspartato obtido foi de $3,72 \pm 0,07$, com a mobilidade de $(-33 \pm 2) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99309$.

Estimando-se o fator de correção utilizando o eletrólito de corrida de LiCl, foi constatado um maior desvio padrão amostral deste fator em função do pH quando comparado ao sistema tampão β -alanina: Cl⁻. A única diferença mais relevante consistiu no fato de ocorrer uma discrepância na ordem de até 5% (figura 4.2.4) no fator de correção, uma vez que utilizando o eletrólito β -alanina: Cl⁻ ocorreu na ordem de até 55%.

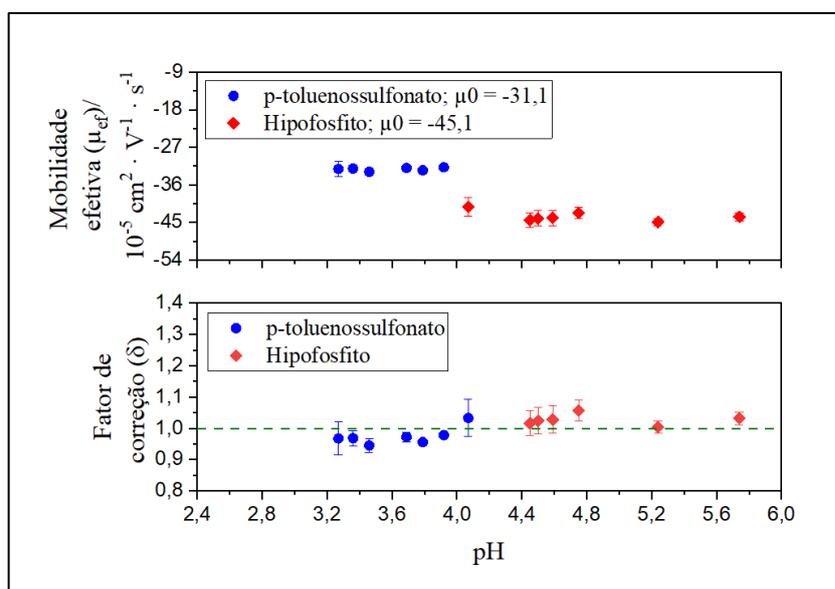


Figura 4.2.4 – Mobilidade efetiva e o fator de correção em função do pH utilizando o LiCl como um eletrólito de corrida para uma força iônica próxima de $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. A linha tracejada em verde no fator de correção em zero remete ao valor encontrado se a mobilidade experimental fosse equivalente ao encontrado da literatura para a espécie de referência em diluição infinita.

Logo, aplicando o fator de correção os seguintes dados foram obtidos para o ácido benzoico (figura 4.2.5), ácido láctico (figura 4.2.6) e aspartato (4.2.7):

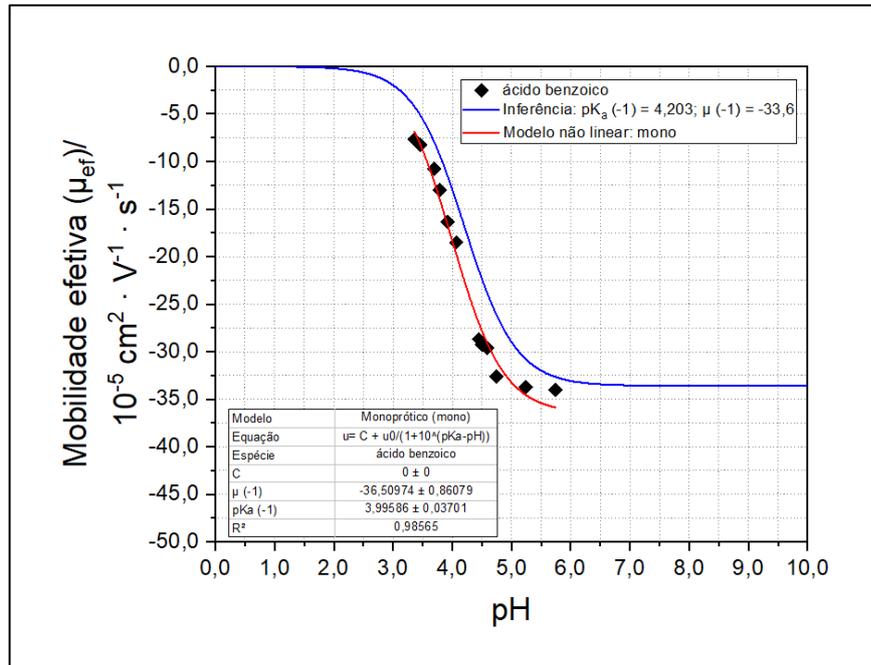


Figura 4.2.5 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido benzoico com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprótico, o valor do pK_a do ácido benzoico obtido foi de $4,00 \pm 0,04$, com a mobilidade de $(-36,5 \pm 0,9) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,98565$.

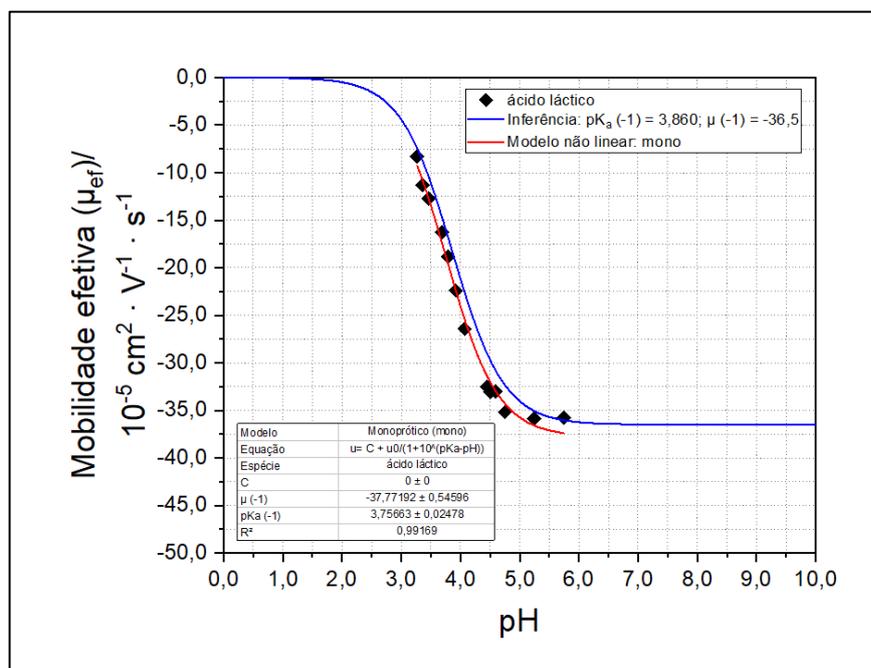


Figura 4.2.6 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o ácido láctico com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a

mobilidade deve ser menor ou igual a zero, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprotico, o valor do pK_a do ácido láctico obtido foi de $3,76 \pm 0,02$, com a mobilidade de $(-37,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,99169$.

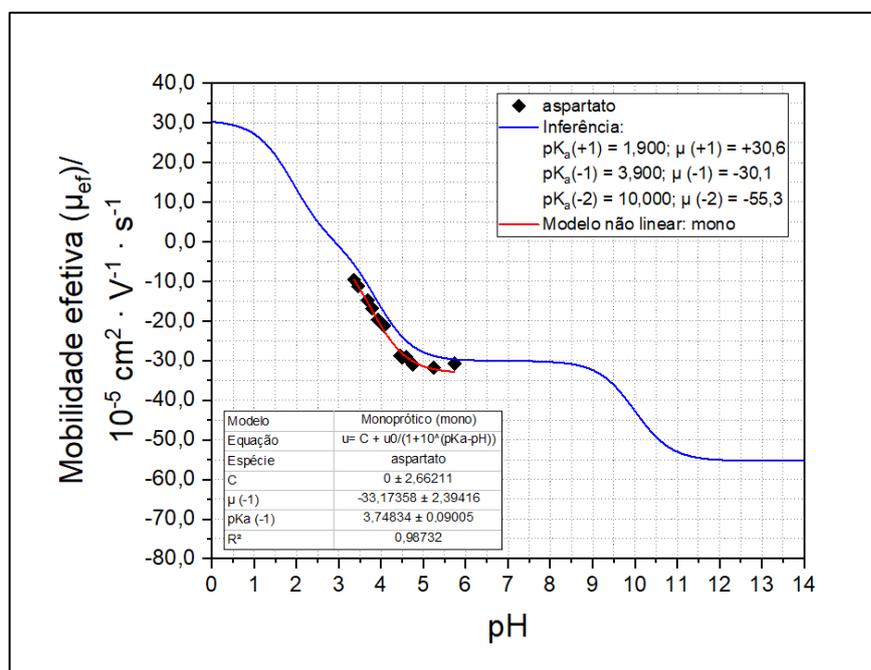


Figura 4.2.7 – Curva de mobilidade efetiva contra o valor de pH para o aspartato com o fator de correção aplicado. A constante C remete a um valor de iniciação no algoritmo onde a mobilidade deve ser positiva, negativa ou nula, enquanto μ a mobilidade efetiva da espécie analisada. Conforme a determinação de um modelo não linear para um ácido monoprotico, o valor do pK_a do aspartato obtido foi de $3,75 \pm 0,09$, com a mobilidade de $(-33 \pm 2) \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com $R^2 = 0,98732$.

Em todos os casos utilizando o BeerBox houve uma determinação do pK_a em $0,15 \pm 0,05$ inferior daquele valor relatado pela literatura, conforme ilustrado na figura 4.2.8. Utilizando a equação de Debye-Hückel, a correção implica em uma correção de 0,06 unidade de pK_a no máximo. Ou seja, há algum problema relacionado ao método utilizando o BeerBox que não justifique tal divergência.

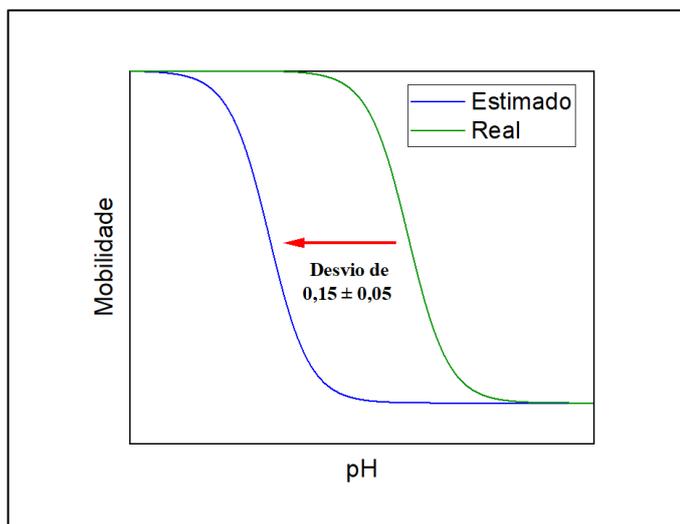
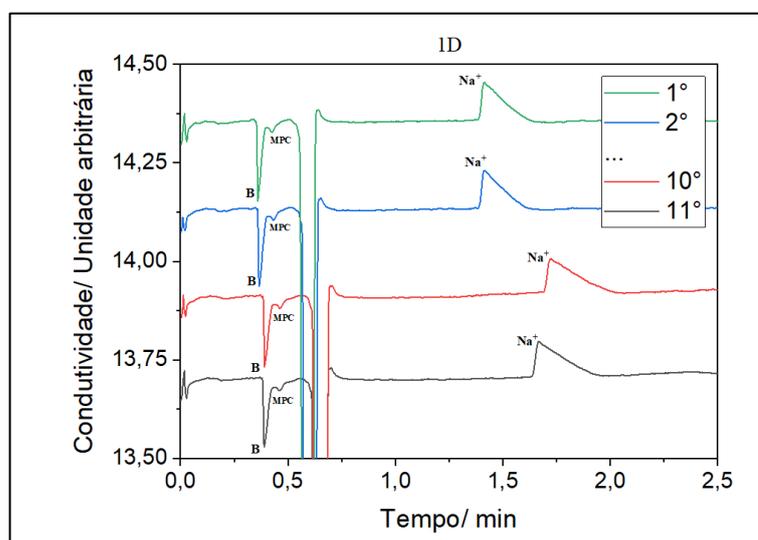


Figura 4.2.8 – Translação do pK_a devido a um problema na exatidão utilizando o BeerBox.

4.2.2 A evidenciação de um problema

Invertendo-se o fluxo eletrosmótico com adição de CTAB a $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a uma solução contendo LiCl com uma força iônica de aproximadamente de $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pôde-se realizar 11 réplicas de uma amostra de 25,0 % (v/v) de prop-1-ol com $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 . A princípio deveria ser observado o monopropil carbonato (ver o início do subtópico 3.2.1.1), uma vez que se trabalhou em um pH de $4,15 \pm 0,01$. Um empecilho que ocorreu é que utilizando um capilar de $50 \mu\text{m}$ não se obteve detecções tanto de bicarbonato como de monopropil carbonato, então somente nestes casos a seguir empregou-se um capilar de $75 \mu\text{m}$ para que estas espécies fossem quantificadas.



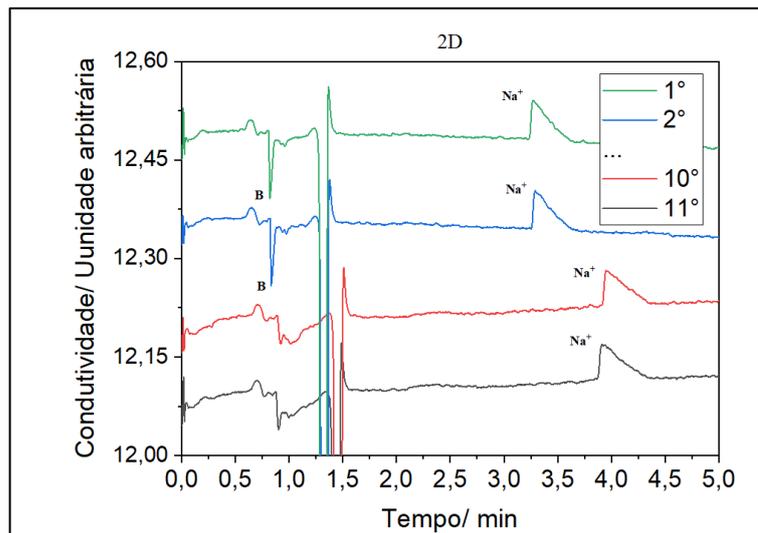


Figura 4.2.9 – Eletroferogramas da evolução de sucessivas injeções de uma amostra contendo NaHCO_3 a $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e prop-1-ol a 25,0 % (v/v), em pH igual a $4,15 \pm 0,01$. A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico correspondente a ordem da repetição. A legenda dada por B significa o bicarbonato, MPC o monopropil carbonato e Na^+ o cátion sódio. O capilar utilizado foi de $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno por 35,0 cm de extensão longitudinal. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF).

Conforme a figura 4.2.9, observou-se a hidrólise total do MPC na passagem do primeiro ao segundo detector. Em contrapartida o pico do bicarbonato sofreu uma redução passado as sucessivas repetições e isso pode ser evidenciado com o segundo detector. Por exemplo, desde a primeira injeção até a décima primeira houve uma redução de 52% em área do pico do bicarbonato constatado no segundo detector, sendo área por sua vez relacionada com a concentração. A justificativa desta redução é porque a amostra detectada no segundo detector passou 40 segundos a mais quando comparado a primeira análise, implicado que a pressão hidrodinâmica empregada durante as corridas não foi precisa.

Uma outra abordagem de tratar o problema é considerar que na configuração do equipamento (BeerBox) há um ressalto do capilar relacionada a ponteira que imerge no frasco da amostra conforme ilustrado na figura 4.2.10.

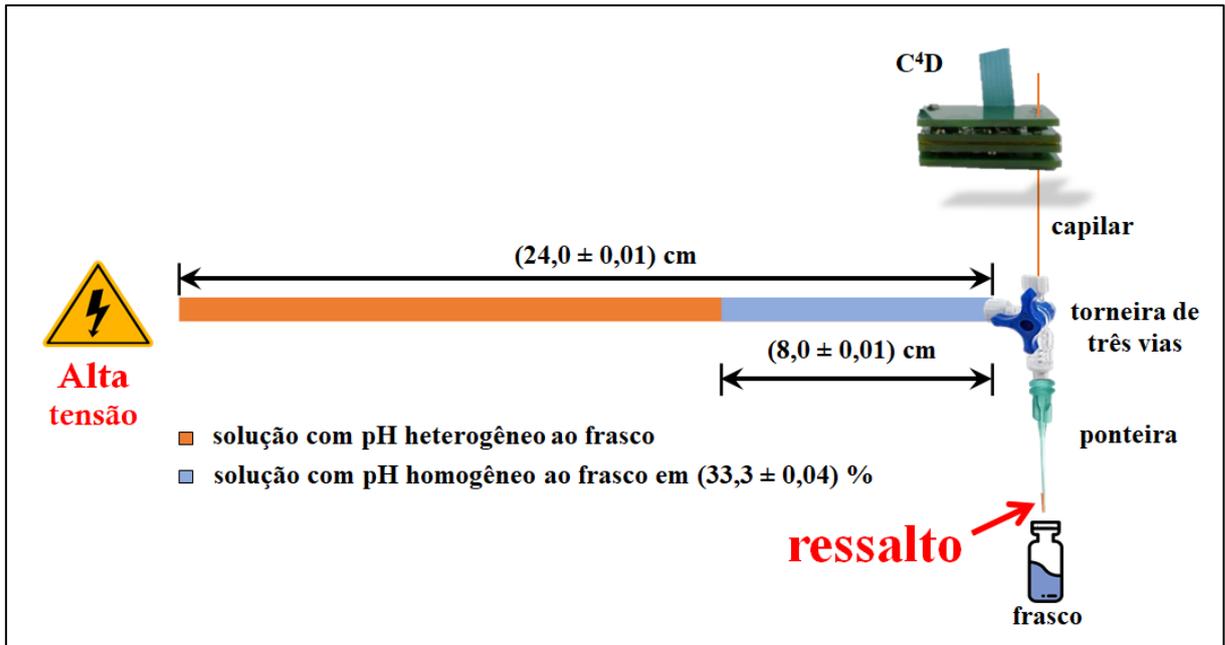


Figura 4.2.10 – Configuração do BeerBox quanto ao sistema de injeção. No frasco onde ocorre a coleta da amostra há uma pequena extensão do capilar ressaltada da ponteira responsável pela imersão no frasco.

A princípio, a variação da extensão do capilar em relação a ponteira seria um problema se houvesse uma amplificação do campo elétrico ali causado pelo fenômeno de borda. Em outras palavras, poderia haver uma perturbação no campo elétrico pela maior ou menor ressalto do capilar em relação a ponteira. Assim, foram realizados testes quanto a este comportamento e foi denominado o ressalto do capilar sob a ponteira como longo, médio e curto como ilustrado na figura 4.2.11.

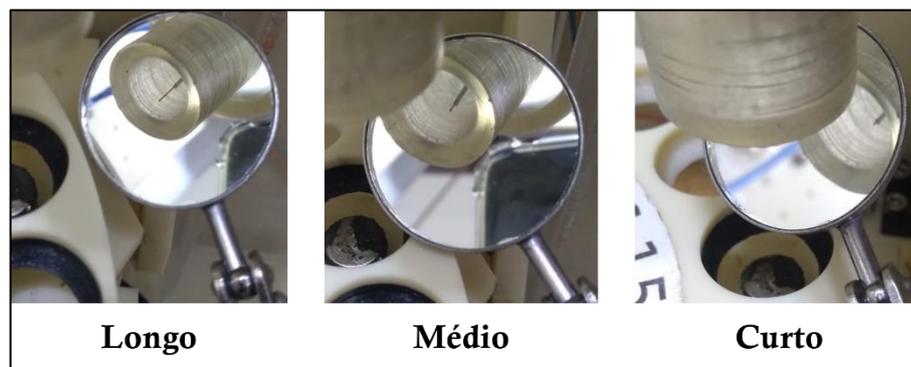


Figura 4.2.11 – Variações no ressalto do capilar relacionado a ponteira responsável pela imersão no frasco.

Conforme a configuração adotada e ilustrada na figura 4.2.11, à medida que se distinguia o ressalto do capilar da ponteira obteve-se resultados variados, conforme os dados coletados e apresentados na figura 4.2.13.

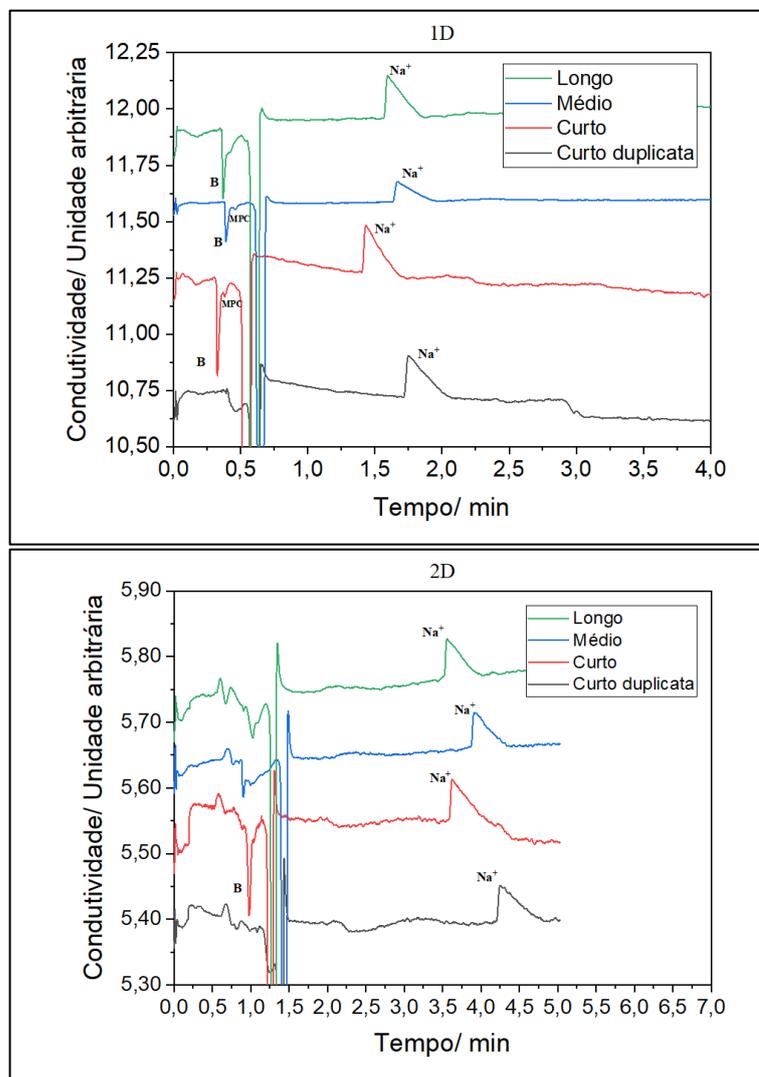


Figura 4.2.13 – Eletroferogramas de uma amostra contendo NaHCO_3 a $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e prop-1-ol a 25,0 % (v/v), em pH igual a $4,15 \pm 0,01$. Obtido conforme o ressalto entre o capilar e a ponteira, sendo a ordem das injeções de longo, médio, curto e curto duplicata respectivamente. A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. A letra B significa o bicarbonato, MPC o monopropil carbonato e Na^+ o cátion sódio. O capilar utilizado foi de $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno por $35,0 \text{ cm}$ de extensão longitudinal. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF).

A respeito da figura 4.2.13, pouca coisa pode ser estimada porque não houve ordem observável, simplesmente houve uma aleatoriedade dos resultados coletados. Apesar disso,

constatou-se que a variação do ressalto do capilar com a ponteira poderia ser o motivo da causa do problema no BeerBox por efeito de borda do campo elétrico.

O mais intrigante é que em raras corridas em pH igual a 4,62 houve a detecção do bicarbonato utilizando o BeerBox, mesmo utilizando um eletrólito de corrida tamponado. Por exemplo, utilizando uma solução de LiCl com uma força iônica próxima a $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e sem a inversão do fluxo eletrosmótico detectou-se o pico do bicarbonato e do monoprópril carbonato com um capilar de $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno tanto no primeiro como no segundo detector conforme apresentado na figura 4.2.14, porém em situações convencionais nem ao menos foi detectado pico para estas duas espécies nestas condições e especialmente utilizando um capilar de $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno.

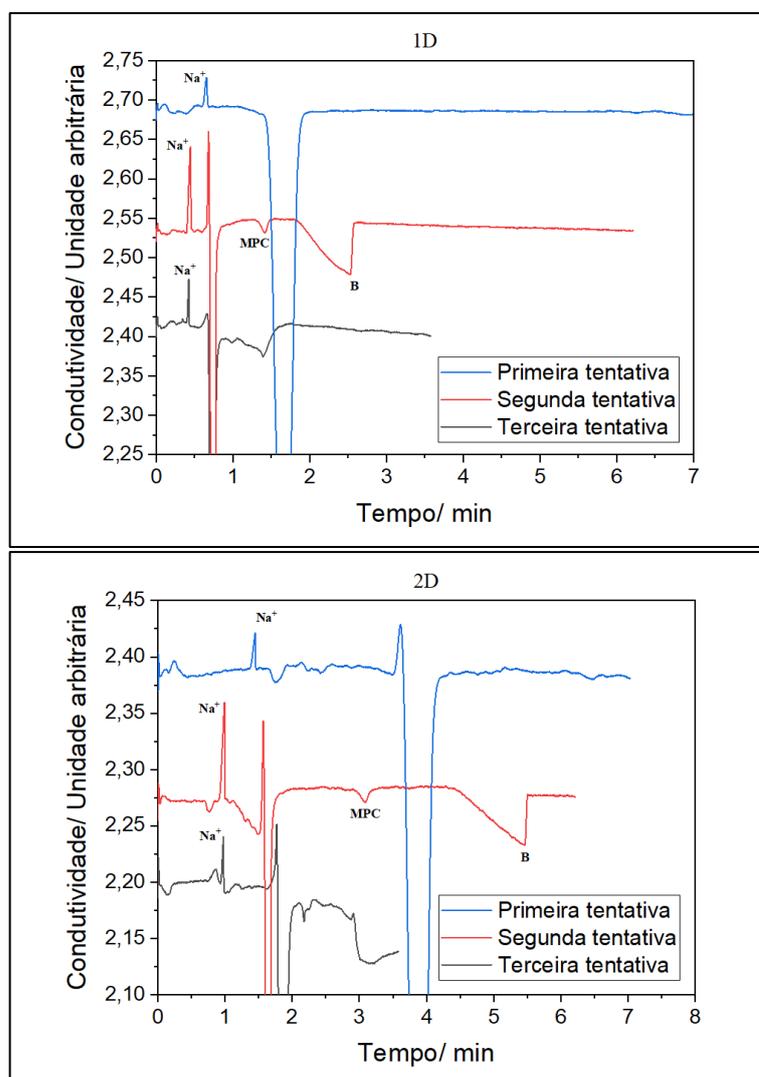


Figura 4.2.14 – Eletroferogramas de uma amostra contendo NaHCO_3 a $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e prop-1-ol a 25,0 % (v/v). Utilizando como eletrólito de corrida somente LiCl com uma força iônica próxima de $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH igual a $4,62 \pm 0,01$, e sem a inversão do EOF. A ilustração com

a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. O capilar utilizado foi de 50 μm de diâmetro interno por 35,0 cm de extensão longitudinal. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF).

Acordado com a figura 4.2.14 relativo aos dados gerados pelo primeiro detector, a área do pico do sódio na primeira tentativa comparada a segunda tentativa (onde ocorreu a detecção do bicarbonato efetivamente), demonstra que na segunda tentativa houve um aumento de 259% em área. Consequentemente, significando que a precisão de quantidade de amostra do BeerBox realmente esteve comprometida, e injetando um volume de amostra inferior daquele que deveria. Um possível efeito de borda relacionado a campo elétrico causado pelo ressalto entre o capilar e a ponteira responsável pela imersão no frasco de injeção da amostra não é relevante, isto é, relevante quando comparada a precisão da injeção que demonstrou ser um problema mais grave.

Note que, embora a precisão do volume de amostra foi comprometido a precisão da determinação do pK_a em si não, porque na quantificação do valor numérico de pK_a a variável é o tempo de migração e não a concentração do analito.

5 CONCLUSÕES

O BeerBox demonstrou ser um equipamento preciso em gerar de dados que possam ser utilizados para a quantificação no valor de pK_a , mas apesar da sua excelente precisão – os dados de mobilidade efetiva nesta configuração em função do pH se correlacionaram em $(99,4 \pm 0,2)\%$ para determinação de pK_a – este equipamento apresentou um problema no sistema de injeção de modo a tornar a quantificação do valor de pK_a em $0,15 \pm 0,05$ inferior daquele encontrado na literatura para as espécies caracterizadas. Em outras palavras, fisicamente é como se o valor do pH do eletrólito de corrida estivesse sendo diluído durante o processo de análise de tal maneira que houvesse um incremento no valor do pH em 0,15 daquele determinado inicialmente para a solução utilizando o pHmetro. Por exemplo, para um eletrólito de corrida de pH igual a 4,00 ao decorrer do experimento ele corresponderia em 4,15, mas isso apenas no sentido de interpretação física e não necessariamente este fenômeno ocorreu.

Na utilização de um equipamento de eletroforese capilar comercial (Agilent Technologies modelo 7100) com um C^4D manufaturado pelo grupo de pesquisa onde este trabalho foi realizado, constatou-se que a determinação de pK_a utilizando este método se correlacionou em 99,70% com os valores que podem ser consultados na literatura (figura 4.1.19), com eficiência de $(97 \pm 3)\%$ nas determinações. Apesar disso, algumas considerações

devem ser tomadas e uma delas é relacionada ao fator de correção que demonstrou ser uma variável importante na quantificação de pK_a utilizando a eletroforese capilar.

Por exemplo, a elevação da concentração de β -alanina implica na elevação do fator de correção, e, portanto, reduz a mobilidade efetiva das espécies em análise (inclusive daquelas totalmente ionizadas que deveriam permanecer inalteradas, neste trabalho nomeada por espécie de referência, conforme as figuras 4.1.5). Isso porque, a β -alanina eleva a viscosidade da água significativamente, consequentemente limitando a mobilidade efetiva das espécies, tanto do analito como das espécies de referência, em até 72% do valor máximo que elas poderiam assumir em diluição infinita. Assim, essas divergências de mobilidade impactam na exatidão da técnica frente a quantificação de pK_a .

O uso de uma espécie de referência corrige a espessura efetiva da atmosfera iônica, viscosidade do meio, mas também o raio hidrodinâmico que por sua vez depende da viscosidade e da espessura efetiva da atmosfera iônica. Quando se realiza a aplicação do fator de correção é esperado que se determine o pK_a termodinâmico diretamente, e não o pK_a aparente porque foi utilizado como referencial uma espécie de referência com os seus dados expressos já em diluição infinita (figura 4.1.20).

Destaca-se que o fator de correção (δ), em uma situação completamente teórica, corrige aspectos de temperatura, porque tanto a espessura efetiva da atmosfera iônica, a viscosidade e o raio hidrodinâmico dependem da temperatura. Basta quantificar o intervalo de temperatura onde a correção pode ser aplicada satisfatoriamente. Ou seja, em termos teóricos o experimento poderia ser realizado em uma temperatura diferente de 25 °C, mas como a espécie de referência possui valor tabelado a 25 °C (por padrão) a determinação de pK_a do analito seria como se o experimento ocorresse a 25 °C, dada pela própria aplicação da correção do fator de correção referenciado a 25 °C. Logo, somente é necessário sabermos os valores assumidos da mobilidade efetiva (em diluição infinita) da espécie de referência em função da temperatura, enquanto para o analito seria necessário a realização experimental em uma temperatura qualquer e constante para termos a sua determinação de pK_a em temperaturas variadas pela aplicação do fator de correção.

Isso abre margens para novas perspectivas, porque a partir do fator de correção pode ser realizados outros trabalhos que facilitem a determinação do pK_a utilizando eletroforese capilar com os mais variados tipos de eletrólitos de corrida e em distintas temperaturas de trabalho.

Utilizar ou não um eletrólito de corrida tamponado pode torna-se uma opção, porque todos os fatores do meio serão corrigidos pela espécie de referência adotada, porém em sistemas não tamponados o desvio padrão assumido pelo fator de correção pode ser mais acentuado de

uma corrida para outra. Mas isso não é uma certeza, porque o eletrólito de corrida não tamponado foi utilizado somente no BeerBox que apresentou um problema no sistema de injeção.

No entanto, o desvio padrão sendo o menor possível para o fator de correção significa que este parâmetro poderia ser determinado a partir de uma curva de calibração externa, no qual faria correções do analito a ser caracterizado, e conseqüentemente não seria necessário a adição da espécie de referência em cada corrida obrigatoriamente.

Provou-se (subtópico 4.1.3) que um modelo não linear monoprotico pode ser utilizado para a determinação de pK_a de espécies poliproticas, desde que a espécie poliprotica tenha os valores de seus pK_a com uma margem de diferença de no mínimo 1,28 unidade de pK_a um dos outro. O modelo matemático não linear poliprotico é mais exato por considerar sobreposições entre as mobilidades que cada pK_a possa assumir.

O método utilizando o padrão interno é o mais eficiente dos métodos para a determinação do pK_a (ver o subtópico 4.1.4) utilizando um CE, e isso se deve porque o número de determinações de pK_a para uma única espécie é elevado (por exemplo, para a aspirina foi realizado 59 quantificações). Por fim, a combinação do método utilizando o padrão interno com a espécie de referência tornou a técnica utilizando a CE-C⁴D poderosa para a caracterização de pK_a , e com uma exatidão centesimal.

6 REFERÊNCIAS

- [1] Zhang, S., et al. **Determination of chloroacetic acids in water by capillary zone electrophoresis with field-amplified sample injection.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2016; DOI: 10.1080/10826076.2015.1126726.
- [2] Fu, X., et al. **Determination of dissociation constants of aristolochic acid I and II by capillary electrophoresis with carboxymethyl chitosan-coated capillary.** Talanta. 2011; 85 (1): 813-815. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.03.088.
- [3] Solow, M. **Weak Acid pK_a Determination Using Capillary Zone Electrophoresis.** Journal of Chemical Education. 2006; 83 (8): 1194. DOI: 10.1021/ed083p1194.
- [4] Reijenga, J., et al. **Development of Methods for the Determination of pK_a Values.** Anal Chem Insights. 2013; 8 53-71. DOI: 10.4137/aci.S12304.
- [5] Ozkorucuklu, S.P., et al. **Determination of Dissociation Constants of Some Hydroxylated Benzoic and Cinnamic Acids in Water from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by CE-DAD.** Journal of Chemical & Engineering Data. 2009; 54 (3): 807-811. DOI: 10.1021/je800595x.

- [6] Celik, H., et al. **Determination of pK_a Values of Some Benzoxazoline Derivatives and the Structure–Activity Relationship.** *Journal of Chemical & Engineering Data.* 2013; 58 DOI: 10.1021/je3012919.
- [7] Caliaro, G.A. and C.A. Herbots. **Determination of pK_a values of basic new drug substances by CE.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2001; 26 (3): 427-434. DOI: 10.1016/s0731-7085(01)00423-x.
- [8] Harris, D.C. and C.A. Lucy. **Análise Química Quantitativa.** Rio de Janeiro. LTC, 2017.
- [9] Herrero-Martínez, J.M., et al. **Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis.* 2005; 26 (10): 1886-1895. DOI: 10.1002/elps.200410258.
- [10] Včeláková, K., et al. **Determination of cationic mobilities and pK_a values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis.** 2004; 25 (2): 309-317. DOI: 10.1002/elps.200305751.
- [11] Fuguet, E., et al. **Critical evaluation of buffering solutions for pK_a determination by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis.* 2008; 29 (13): 2841-2851. DOI: 10.1002/elps.200700869.
- [12] Poole, S.K., et al. **Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A.* 2004; 1037 (1-2): 445-454. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.02.087.
- [13] Fuguet, E., et al. **Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis: I. Monoprotic weak acids and bases.** *J Chromatogr A.* 2009; 1216 (17): 3646-3651. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.090.
- [14] Malý, M., et al. **Determination of thermodynamic acidity constants and limiting ionic mobilities of weak electrolytes by capillary electrophoresis using a new free software AnglerFish.** *Electrophoresis.* 2020; 41 (7-8): 493-501. DOI: 10.1002/elps.201900283.
- [15] Mercier, J.-P., et al. **Determination of weak (2.0–2.5) dissociation constants of non-UV absorbing solutes by capillary electrophoresis.** *Chromatographia.* 1998; 48 (7): 529-534. DOI: 10.1007/BF02466645.
- [16] Jankowsky, R., et al. **Determination of dissociation constants of ^{99m}Techetium radiopharmaceuticals by capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography A.* 1999; 833 (1): 83-96. DOI: 10.1016/s0021-9673(98)01017-6
- [17] Hagberg, J., A. Düker, and S. Karlsson. **Determination of dissociation constants of low molecular weight organic acids by capillary zone electrophoresis and indirect UV detection.** *Chromatographia.* 2002; 56 (9): 641. DOI: 10.1007/BF02497683.
- [18] Cabot, J.M., et al. **Determination of acidity constants by the capillary electrophoresis internal standard method. IV. Polyprotic compounds.** *J Chromatogr A.* 2013; 1279 108-116. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.018.

- [19] Nowak, P., M. Woźniakiewicz, and P. Kościelniak. **Application of capillary electrophoresis in determination of acid dissociation constant values.** J Chromatogr A. 2014; 1377 DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.032.
- [20] Nogales, V.d., et al. **Background electrolytes in 50% methanol/water for the determination of acidity constants of basic drugs by capillary zone electrophoresis.** J Chromatogr A. 2006; 1123 (1): 113-120. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.05.008.
- [21] Cantu, M.D., S. Hillebranda, and E. Carrilho. **Determination of the dissociation constants (pK_a) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion.** J Chromatogr A. 2005; 1068 (1): 99-105. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.009.
- [22] Garrido, G., C. Ràfols, and E. Bosch. **Acidity constants in methanol/water mixtures of polycarboxylic acids used in drug salt preparations. Potentiometric determination of aqueous pK_a values of quetiapine formulated as hemifumarate.** Eur J Pharm Sci. 2006; 28 (1-2): 118-127. DOI: 10.1016/j.ejps.2006.01.005.
- [23] Buckenmaier, S.M.C., D.V. McCalley, and M.R. Euerby. **Determination of ionisation constants of organic bases in aqueous methanol solutions using capillary electrophoresis.** J Chromatogr A. 2004; 1026 (1-2): 251-259. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.11.007.
- [24] Shalaeva, M., et al. **Measurement of dissociation constants (pK_a values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers.** J Pharm Sci. 2008; 97 (7): 2581-2606. DOI: 10.1002/jps.21287.
- [25] Cabot, J.M., et al. **Novel Instrument for Automated pK_a Determination by Internal Standard Capillary Electrophoresis.** Analytical Chemistry. 2015; 87 (12): 6165-6172. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00845.
- [26] Gravador, R.S., et al. **Temperature variation effects on the determination of acidity constants through the internal standard-capillary electrophoresis method.** Electrophoresis. 2013; 34 (8): 1203-1211. DOI: 10.1002/elps.201200584.
- [27] Reijenga, J.C., L.G. Gagliardi, and E. Kenndler. **Temperature dependence of acidity constants, a tool to affect separation selectivity in capillary electrophoresis.** J Chromatogr A. 2007; 1155 (2): 142-145. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.09.084.
- [28] Plasson, R. and H. Cottet. **Determination and modeling of peptide pK_a by capillary zone electrophoresis.** Anal Chem. 2006; 78 (15): 5394-5402. DOI: 10.1021/ac060406f.
- [29] Jaros, M., et al. **PeakMaster.** Disponível em: <<https://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>>.
- [30] Debye, P. and E. Hückel. **Zur Theorie der Elektrolyte. I. Gefrierpunktserniedrigung und verwandte Erscheinungen.** Physikalische Zeitschrift. 1923; 24 (9): 185-206.

- [31] Debye, P. and H. Falkenhagen. **Dispersion der Leitfähigkeit starker Elektrolyte.** 1928; 34 (9): 562-565. DOI: 10.1002/bbpc.19280340923.
- [32] Sack, H. Zeitschrift für Physik. 1928; 29 627-628.
- [33] Zahn, H. **Über das Leitvermögen von starken Elektrolyten für Hochfrequenzströme.** Zeitschrift für Physik. 1928; 51 (5): 350-354. DOI: 10.1007/BF01338317.
- [34] Rieckhoff, H. and H. Zahn. **Untersuchungen über die Hochfrequenzleitfähigkeit wässriger Elektrolytlösungen.** Zeitschrift für Physik. 1929; 53 (9): 619-627. DOI: 10.1007/BF01330819.
- [35] Falkenhagen, H. **The Principal Ideas in the Interionic Attraction Theory of Strong Electrolytes.** Reviews of Modern Physics. 1931; 3 (3): 412-426. DOI: 10.1103/RevModPhys.3.412.
- [36] Silva, J.A.F.d. and C.L.d. Lago. **An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis.** 1998; DOI: 10.1021/ac980185g.
- [37] Zemann, A.J., et al. **Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis.** 1998; DOI: 10.1021/ac9707592.
- [38] Brito-Neto, J.G.A., et al. **Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals.** Electroanalysis. 2005; 17 1198-1206. DOI: 10.1002/elan.200503237.
- [39] Brito-Neto, J.G.A., et al. **Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 2. Peak Shape, Stray Capacitance, Noise, and Actual Electronics.** 2005; 17 (13): 1207-1214. DOI: 10.1002/elan.200503238.
- [40] Francisco, K.J.M. and C.L.d. Lago. **A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector.** Electrophoresis. 2009; 30 (19): 3458-3464. DOI: 10.1002/elps.200900080.
- [41] Halliday, D., R. Resnick, and J. Walker. **Fundamentos de Física. Volume 3: Eletromagnetismo.** Rio de Janeiro. LTC, 2016.
- [42] Hauser, P.C. and P. Kubáň. **Capacitively coupled contactless conductivity detection for analytical techniques – Developments from 2018 to 2020.** Journal of Chromatography A. 2020; 1632 461616. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461616.
- [43] Richter, E.M., et al. **Determination of anions, cations, and sugars in coconut water by capillary electrophoresis.** Journal of The Brazilian Chemical Society - JBCS. 2005; 16 DOI: 10.1590/S0103-50532005000700008.
- [44] Rocha, F.R., et al. **Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil: Part 1. Major inorganic ions in rainwater as evaluated**

- by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection.** Atmospheric Environment. 2003; 37 105-115. DOI: 10.1016/S1352-2310(02)00722-7.
- [45] Munoz, R.A.A., et al. **Determination of inorganic ions in ethanol fuel by capillary electrophoresis.** Journal of The Brazilian Chemical Society - JBCS. 2004; 15 DOI: 10.1590/S0103-50532004000400013.
- [46] Carvalho, A.Z., J.A.F.d. Silva, and C.L.d. Lago. **Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection.** Electrophoresis. 2003; 24 (12-13): 2138-2143. DOI: 10.1002/elps.200305408.
- [47] Silva, J.A.F.d., et al. **Improved separation of I A and II A metal cations in matrices with high sodium concentration by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection.** Journal of the Brazilian Chemical Society. 2003; 14 DOI: 10.1590/S0103-50532003000200013.
- [48] Katzmayr, M.U., C.W. Klampfl, and W. Buchberger. **Optimization of conductivity detection of low-molecular-mass anions in capillary zone electrophoresis.** J Chromatogr A. 1999; 850 (1-2): 355-362. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)00168-5.
- [49] Jesus, D.P.d., et al. **Extending the lifetime of the running electrolyte in capillary electrophoresis by using additional compartments for external electrolysis.** Anal Chem. 2005; 77 (2): 607-614. DOI: 10.1021/ac0486645.
- [50] Gong, X., et al. **Evaluation of Multiplexed CE with UV Detection for Rapid pK_a Estimation of Active Pharmaceutical Ingredients.** Chromatographia. 2008; 68 219-225. DOI: 10.1365/s10337-008-0691-6.
- [51] Marsh, A. and K. Altria. **Use of Multiplexed CE for Pharmaceutical Analysis.** Chromatographia. 2006; 64 (5): 327-333. DOI: 10.1365/s10337-006-0023-7.
- [52] Ishihama, Y., et al. **A Rapid Method for pK_a Determination of Drugs Using Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis with Photodiode Array Detection in Drug Discovery.** J Pharm Sci. 2002; 91 (4): 933-942. DOI: 10.1002/jps.10087.
- [53] CAPES. **Periódicos.** Disponível em: <www.periodicos.capes.gov.br/>.
- [54] Gutz, I.G.R. **CurTiPot.** Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot.html>>.
- [55] Masuelli, M.A. and M.G. Sansone. **Hydrodynamic Properties of Gelatin - Studies from Intrinsic Viscosity Measurements.** Editor C. J. R. Verbeek, IntechOpen. 2012; (Chapter 5): 85-116. DOI: 10.5772/34401.
- [56] Jones, G. and M. Dole. **The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride.** Journal of the American Chemical Society. 1929; 51 (10): 2950-2964. DOI: 10.1021/ja01385a012.
- [57] Jenkins, H.D.B. and Y. Marcus. **Viscosity B-Coefficients of Ions in Solution.** Chemical Reviews. 1995; 95 (8): 2695-2724. DOI: 10.1021/cr00040a004.

- [58] Out, D.J.P. and J.M. Los. **Viscosity of aqueous solutions of univalent electrolytes from 5 to 95°C.** 1980; DOI: 10.1007/BF00650134.
- [59] Glasstone, S. **An introduction to Electrochemistry.** New Delhi. Affiliated East-West Press Private Limited, 1942.
- [60] Cabot, J.M., et al. **Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis. II. Acidic internal standards.** J Chromatogr A. 2010; 1217 (52): 8340-8345. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.10.060.
- [61] Fuguet, E., C. Ràfols, and M. Rosés. **A fast high throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis. 3. Basic internal standards.** J Chromatogr A. 2011; 1218 (25): 3928-3934. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.054.

APÊNDICE A – Eletroferogramas gerados utilizando o equipamento comercial

As amostras foram injetadas com uma aplicação de pressão hidrodinâmica de 30 mBar por 6 segundos. Sendo a corrida realizada em 21 kV e o tempo fixado em 6 minutos independente da amostra analisada, o capilar utilizado foi 50 μm de diâmetro interno e 50,0 cm de extensão longitudinal. O eletrólito de corrida é detalhado na tabela 1.1 e pode ser consultado no subtópico 3.2.2. Os eletroferogramas para a água deionizada é apresentado nas figuras A.1 e na A.2, enquanto para as demais espécies como acetato, benzoato, cloroacetato, fumarato, galato, aspartato, aspirina e HIBA é apresentado nas figuras posteriores (de A.3 a A.10).

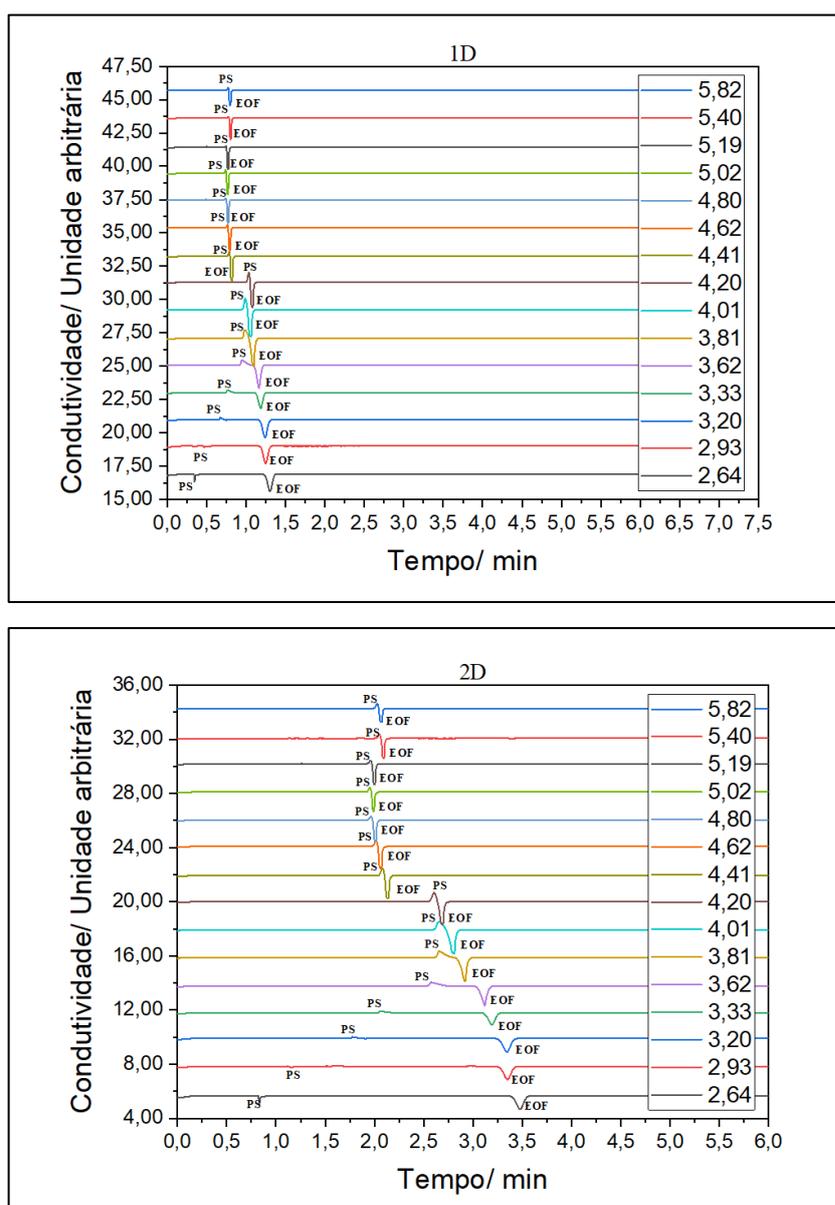


Figura A.1 – Comportamento do fluxo eletrosmótico (EOF) e do pico de sistema (PS) utilizando β -alanina:Cl⁻. Nesta imagem somente a água deionizada foi utilizada. A ilustração com a

legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

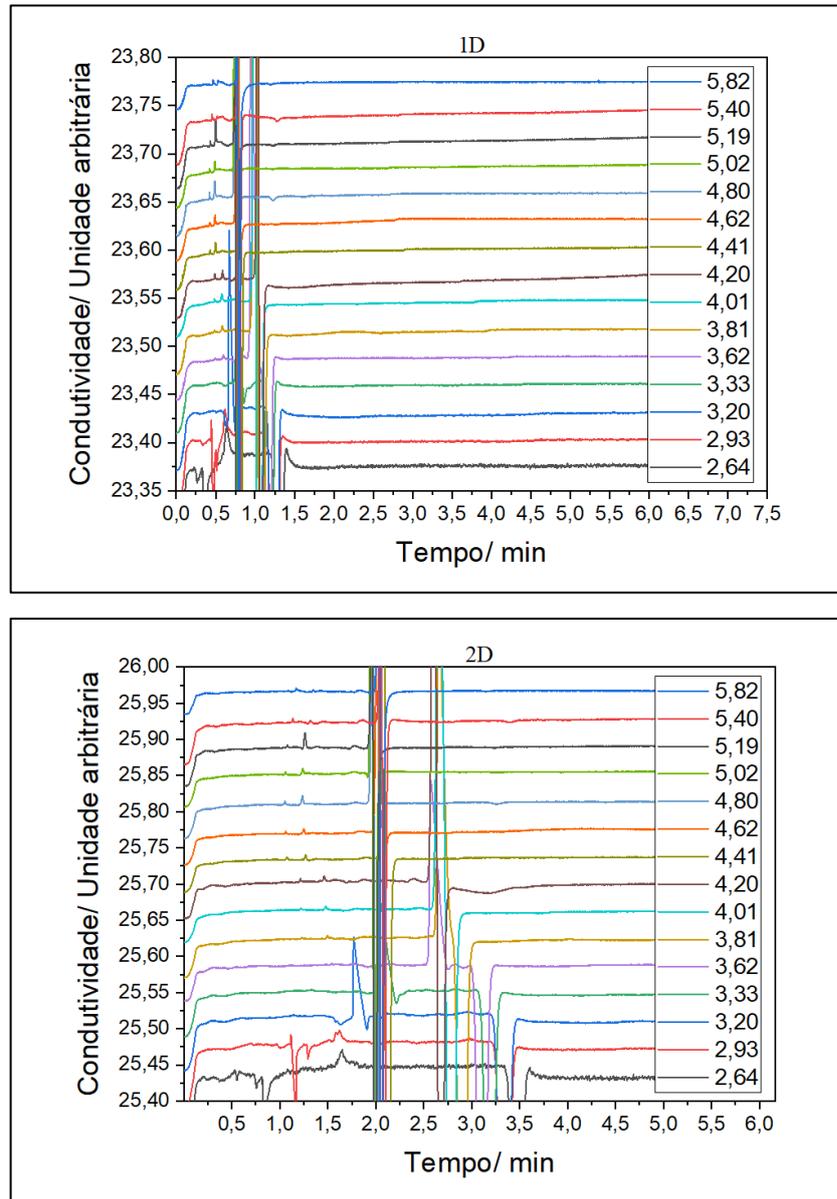


Figura A.2 - Comportamento do fluxo eletrosmótico (EOF) e do pico de sistema utilizando β -alanina: Cl^- com a amplificação necessária para ser observado a presença de possíveis picos indesejados na água deionizada trabalhada. Nesta imagem somente a água deionizada foi utilizada. A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

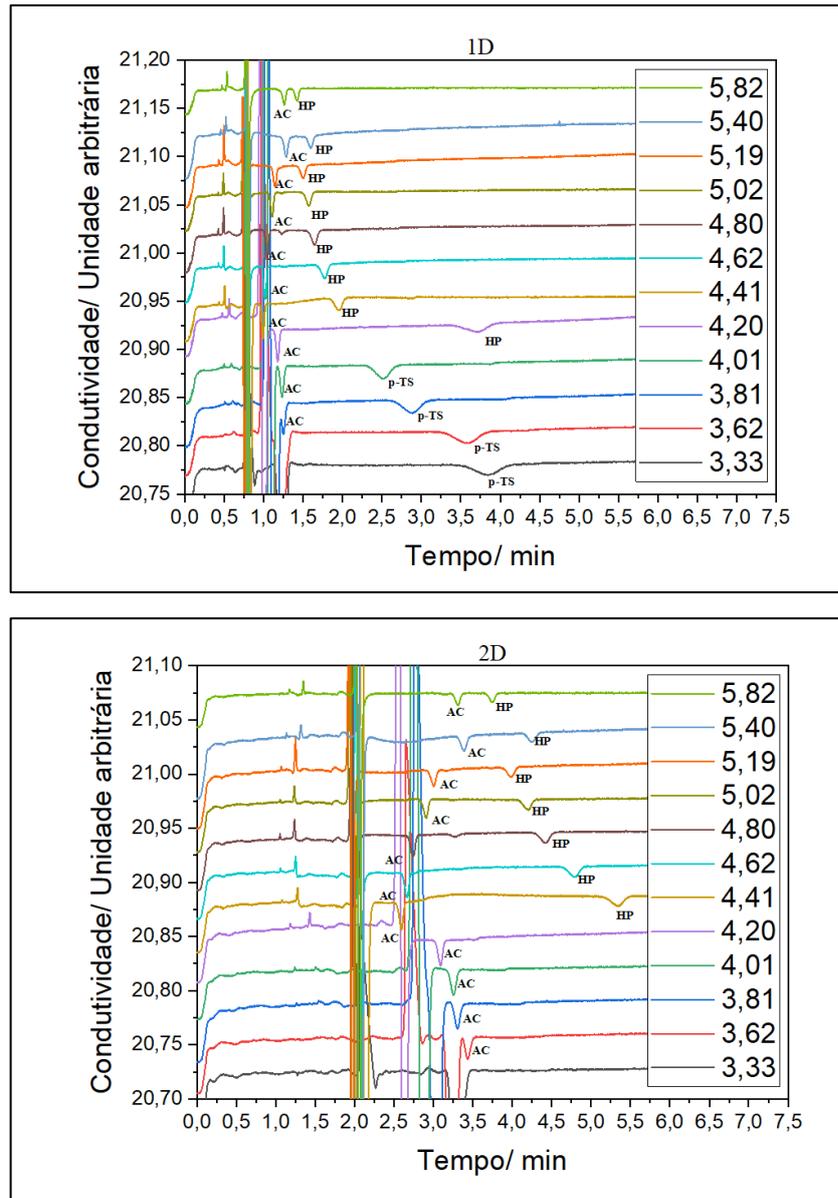


Figura A.3 – Eletroferogramas para o acetato (AC), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

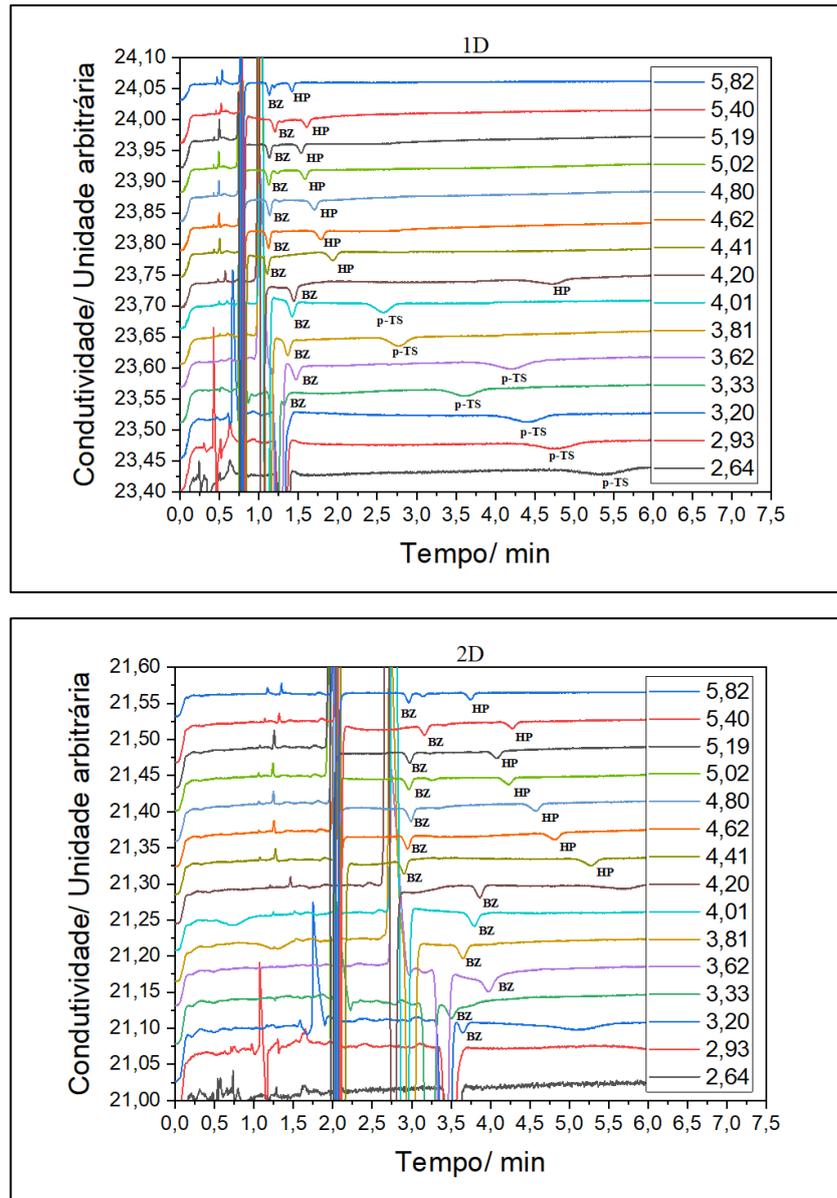


Figura A.4 – Eletroferogramas para o benzoato (BZ), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

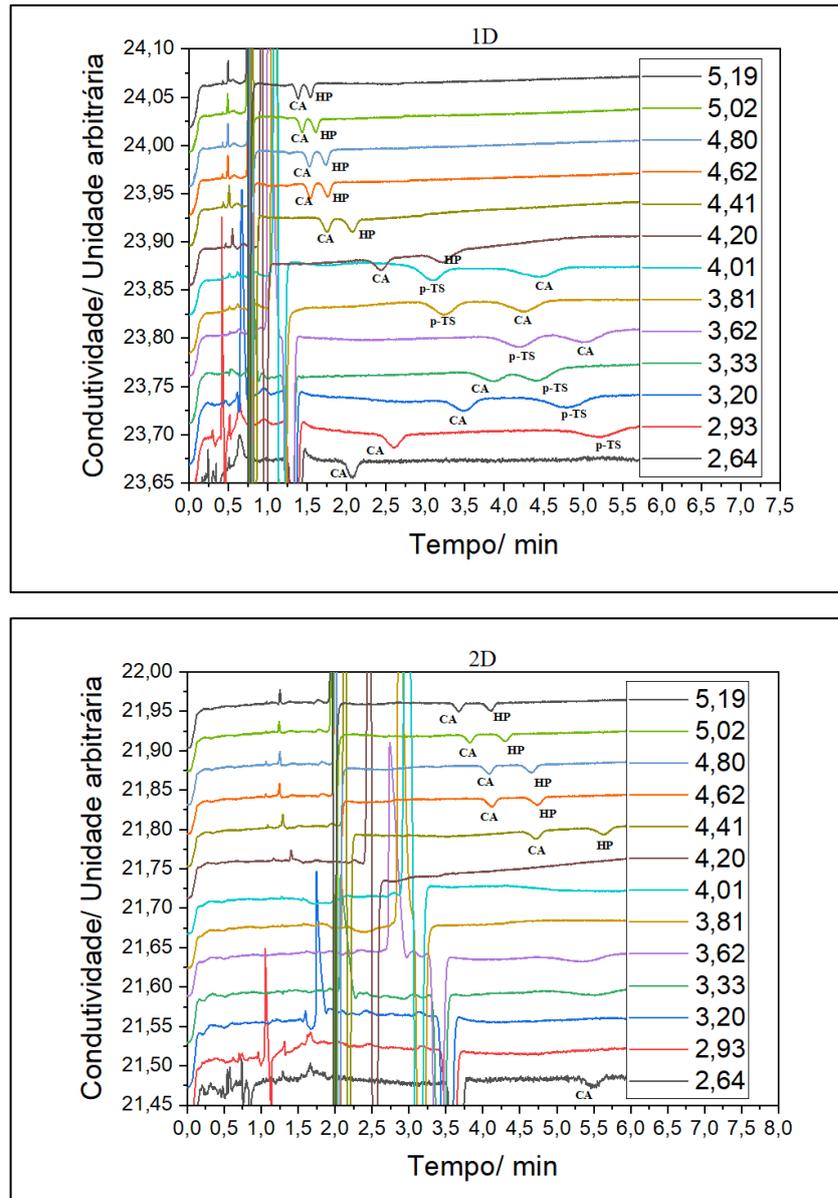


Figura A.5 – Eletroferogramas para o cloroacetato (CA), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

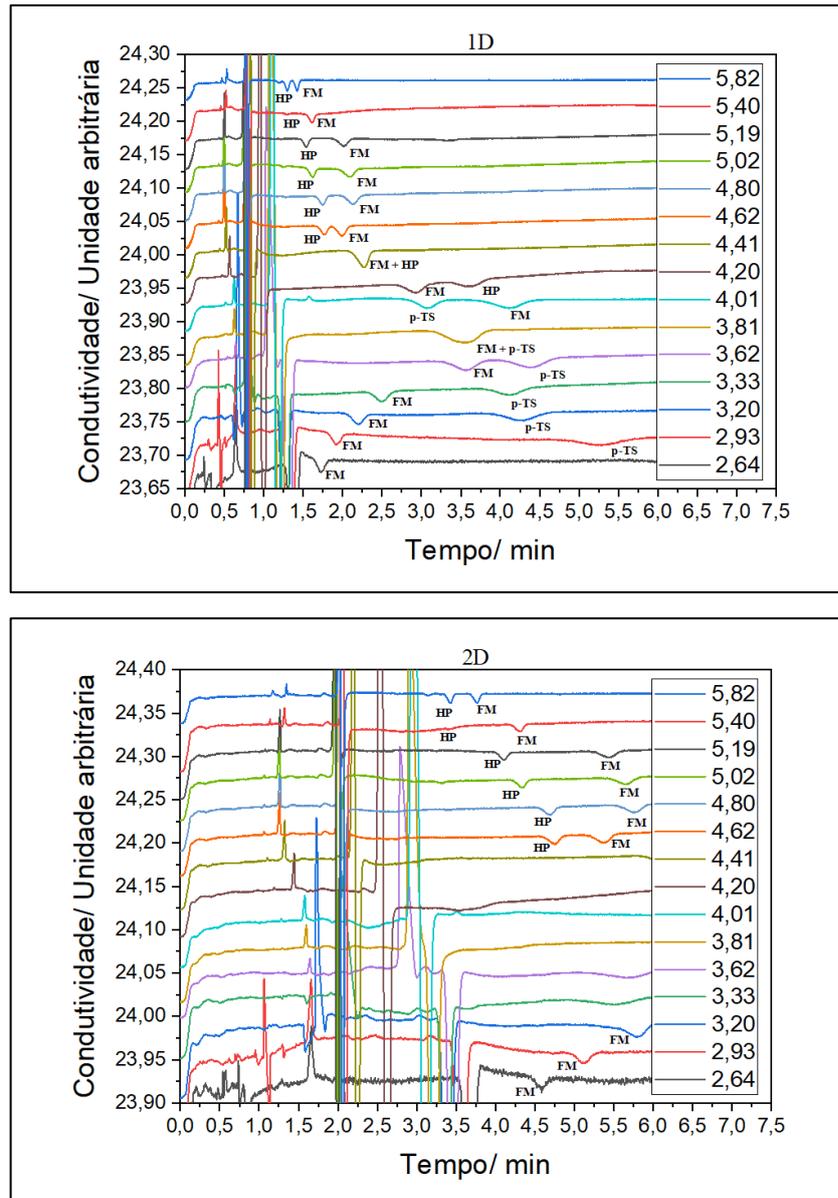


Figura A.6 – Eletroferogramas para o fumarato (FM), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

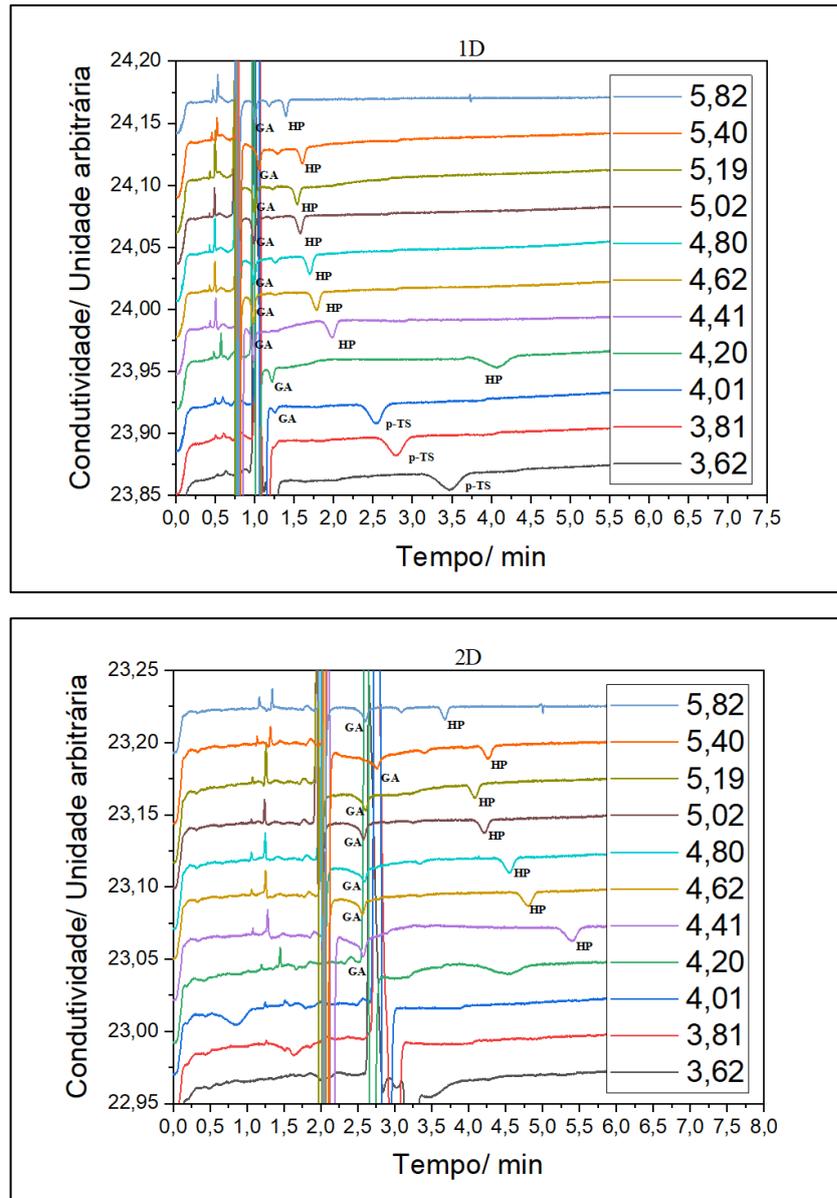


Figura A.7 – Eletroferogramas para o galato (GA), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

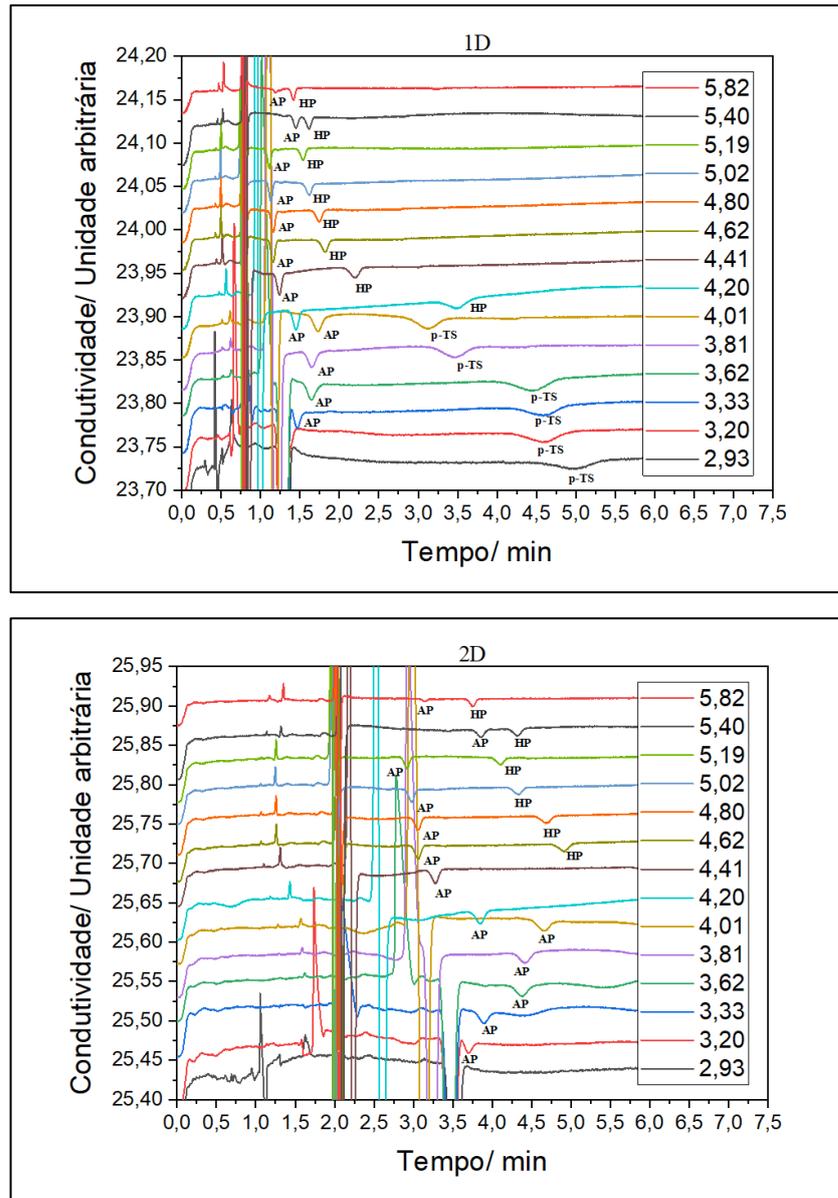


Figura A.8 – Eletroferogramas para o aspartato (AP), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

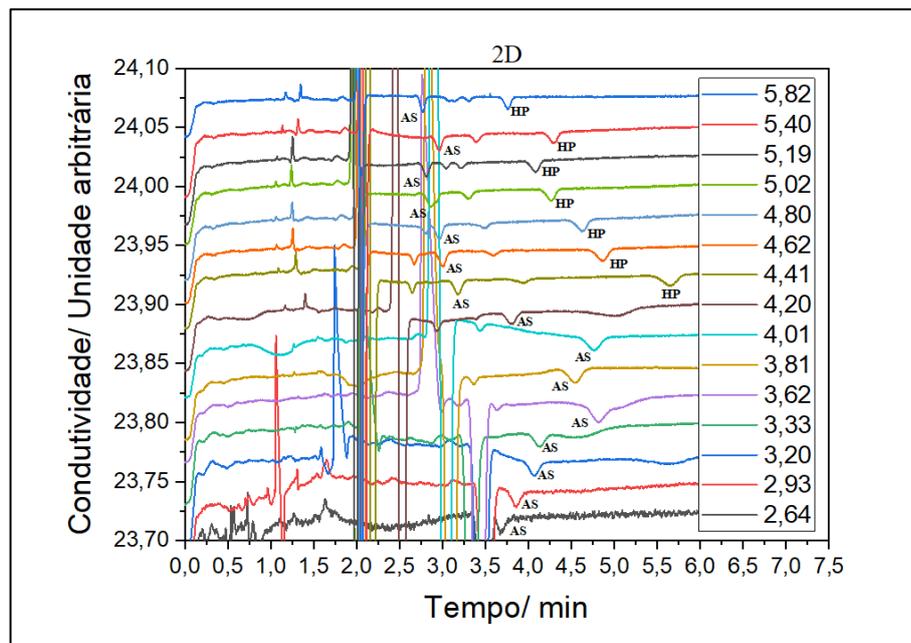
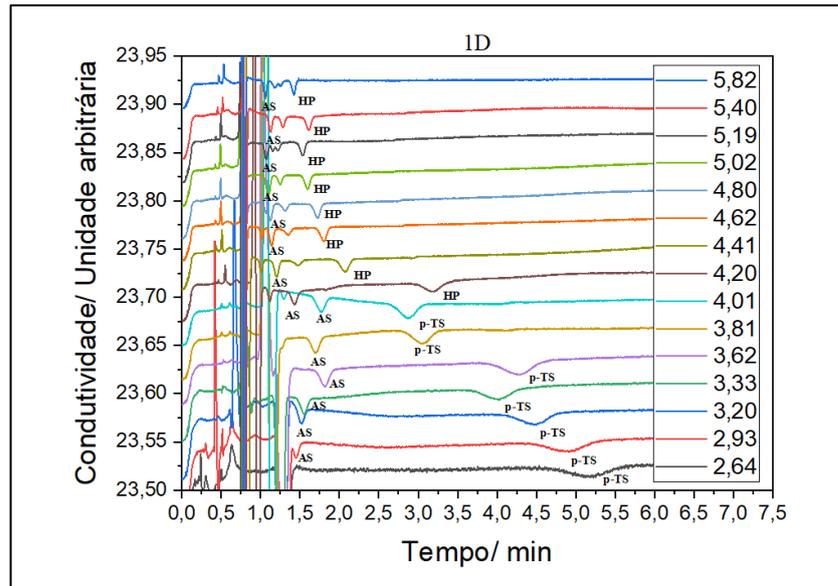


Figura A.9 – Eletroferogramas para a aspirina (AS), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

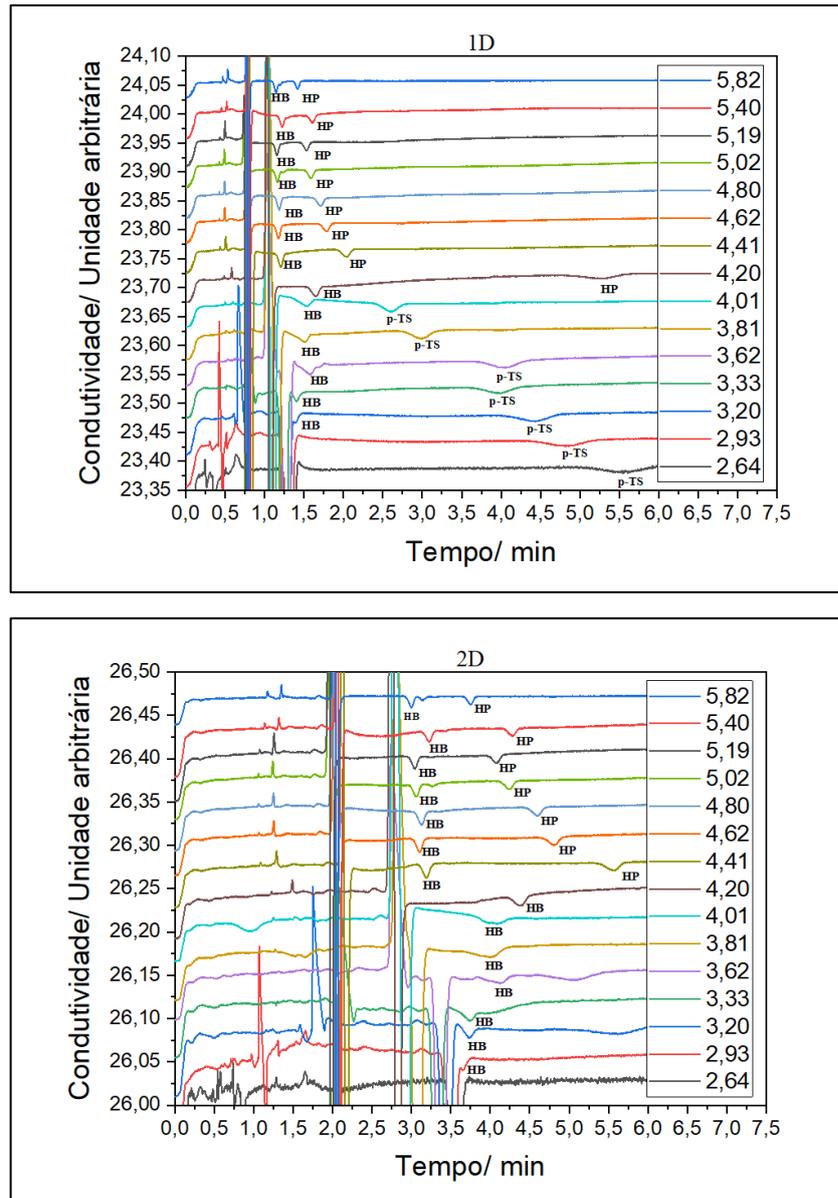


Figura A.10 – Eletroferogramas para o HIBA (HB), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

APÊNDICE B – Eletroferogramas gerados utilizando o BeerBox

A injeção das amostras ocorreu pela aplicação de uma pressão hidrodinâmica por 3 segundos na ordem de 30 a 60 mBar a 25 °C. As corridas foram realizadas com uma diferença de potencial de 21 kV, sendo o capilar utilizado de 50 µm de diâmetro interno e 35,0 cm de extensão longitudinal. Os eletrólitos de corridas foram preparados com LiCl com força iônica variável, mas próxima de 10 mmol·L⁻¹ de força iônica, em diversos valores de pH definido pela adição de HCl com as concentrações previamente calculadas conforme representados nas figuras a seguir (de B.1 a B.3) para o benzoato, lactato e o aspartato.

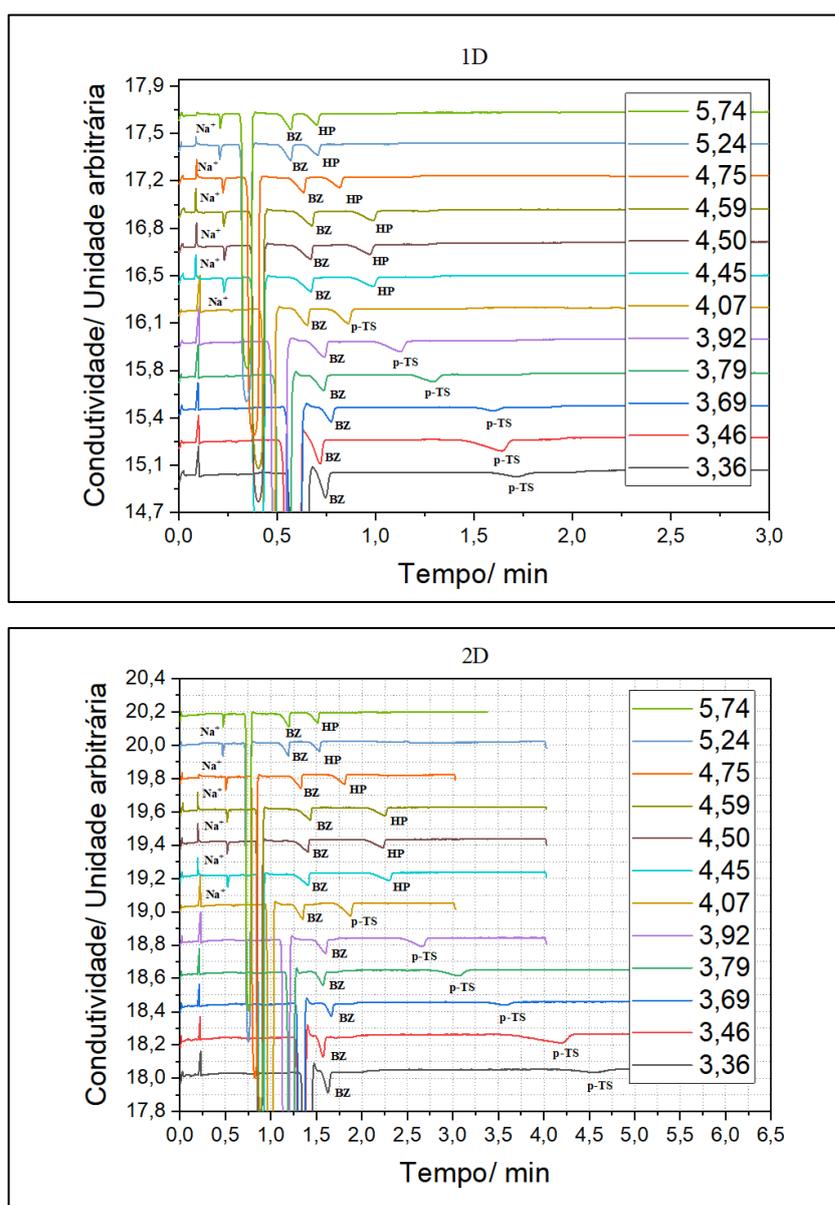


Figura B.1 – Eletroferogramas para o benzoato (BZ), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de

pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

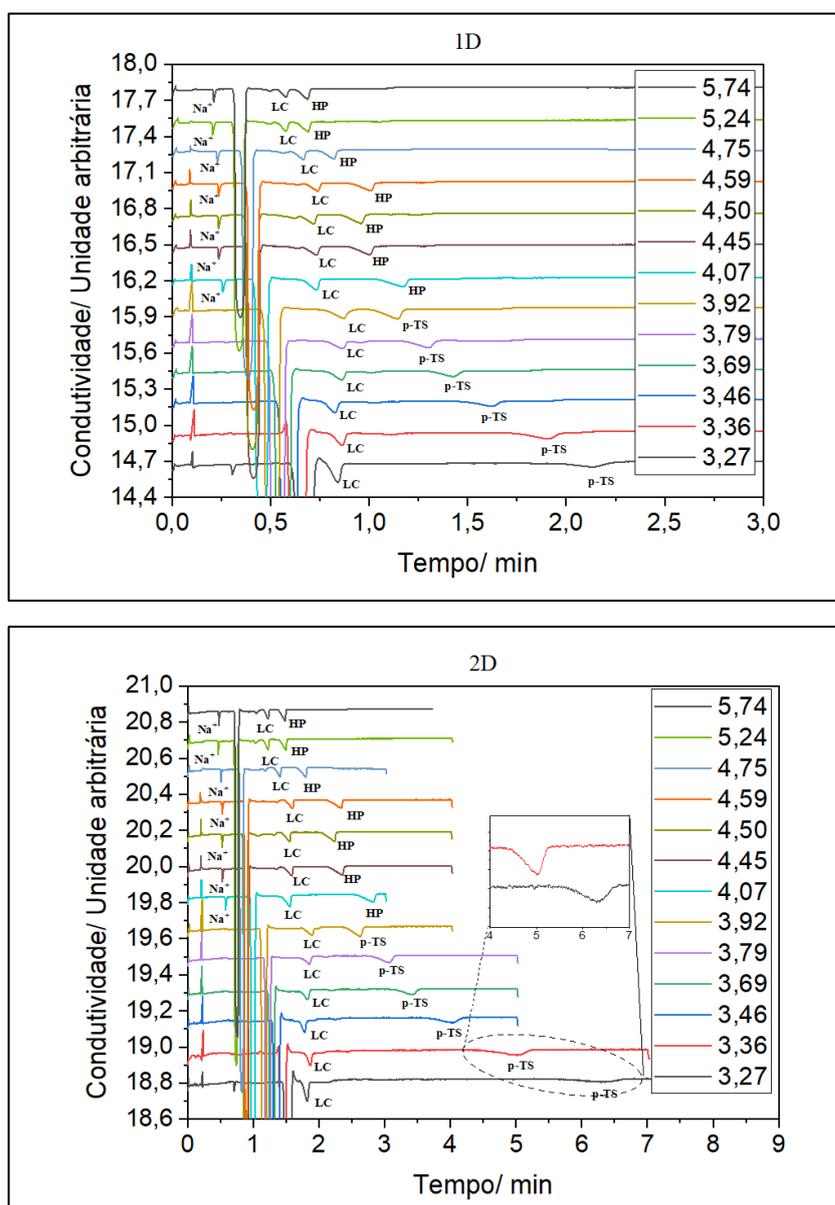


Figura B.2 – Eletroferogramas para o lactato (LC), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.




Figura B.3 – Eletroferogramas para o aspartato (AP), sendo as espécies hipofosfito (HP) e p-toluenossulfonato (p-TS) utilizadas como referência. O quadro à direita contém os valores de pH adotado em cada corrida. A linha contínua cortante vertical no gráfico é característica do fluxo eletrosmótico (EOF). A ilustração com a legenda 1D remete ao primeiro detector, e 2D ao segundo detector. No quadro à direita, é expresso o valor numérico do pH.

SÚMULA CURRICULAR

Nome: Eleilton da Silva
Data de nascimento: 05/09/1994
Naturalidade: Junqueiro – Alagoas
Nacionalidade: Brasileira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Cursando o Mestrado em Química no IQ-USP, duração de 2 anos.
- Cursando o sétimo semestre do bacharelado em Química no IQ-USP, período noturno, duração de 10 semestres.
- Tecnólogo em Materiais (metálicos, cerâmicos e poliméricos) pela FATEC-SP, duração de 3 anos (finalizado em 2017).
- Técnico em Química pela ETEC Osasco II, duração de 2 anos (finalizado em 2014).
- Ensino médio completo (finalizado em 2012).

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Universidade de São Paulo - Instituto de Química (IQ-USP)
Período: 01/02/2020 – 31/01/2022
Cargo: Bolsista de Mestrado
Órgão: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC-SP)
Período: 01/01/2017 - 01/07/2017
Cargo: Iniciação Científica
Função: Estudar a influência da adição de Al_2O_3 na formação de nanopartículas de prata em vidros telureto dopados com Nd_2O_3 para aplicações em dispositivos fotônicos.
- Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC-SP)
Período: 24/03/2016 - 21/12/2016
Cargo: Monitor de Química e Física Geral
Função: Resolver exercícios dos diversos cursos existentes na faculdade (independente do semestre cursado) em que os alunos possuíam dificuldades. Ocasionalmente, reexplicar as matérias envolvendo Física ou Química Geral.
- Universidade de São Paulo - Instituto de Química (IQ-USP)
Período: 05/05/2015 - 05/05/2016
Cargo: Estágio em Tecnologia em Materiais (voluntário)
Função: Elaborar e otimizar um procedimento viável para síntese de etanol a partir das fibras das cascas do coco verde. Utilizando na caracterização dos subprodutos, metodologias analíticas como eletroforese capilar acoplado a um espectrômetro de massas.

- Intertek do Brasil Inspeções Ltda
Período: 01/10/2013 - 01/10/2014
Cargo: Estágio Técnico em Química
Função: Auxiliar na conferência e pesagem analítica das matérias-primas, na conferência das amostras para análise e realizar sua fusão para posterior análise de fluorescência de raios X. Garantir o monitoramento do laboratório.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- Bons em softwares de Desenho técnicos e análises de dados (Excel, Origin, Solid Edge, AutoCAD, entre outros).
- Bons conhecimentos em animação 3D e edição de vídeos (Blender, Adobe Premiere Pro, Adobe After Effects, Vegas Pro, entre outros).
- Bons conhecimentos em Python.

PRÊMIOS E TÍTULOS

- Diploma de honra ao mérito (Prêmio Lavoisier) oferecido pelo Conselho Regional de Química da IV Região, por ser considerado o melhor aluno do curso de Tecnologia em Materiais da FATEC-SP entre 2015 e 2017; e certificado de honra ao mérito oferecido pelo Centro Paula Souza em ofício da FATEC-SP.
- Medalha e diploma de honra ao mérito (Prêmio Lavoisier) oferecido pelo Conselho Regional de Química da IV Região, por ser considerado o melhor aluno do curso Técnico em Química da ETEC Osasco II entre 2013 e 2014.