

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

MICHELE ALVES SANTANA

Sistematização da Estratégia de Calibração Indireta para
Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CopGr 5890

O original se encontra disponível na secretaria de Pós-Graduação do IQUSP

São Paulo

Data do depósito na SPG:

27/02/2020

MICHELE ALVES SANTANA

Sistematização da Estratégia de Calibração Indireta para Eletroforese
Capilar com Detecção Condutométrica

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestra em
Química*

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo

2020

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

S231s Santana, Michele Alves
Sistematização da Estratégia de Calibração Indireta para Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica / Michele Alves Santana. - São Paulo, 2020.
129 p.

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

Orientador: do Lago, Claudimir Lucio

1. eletroforese capilar com detecção condutométrica. 2. calibração indireta. 3. modelos matemáticos. 4. mobilidade eletroforética. 5. PeakMaster. I. T. II. do Lago, Claudimir Lucio, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Sistematização da estratégia de calibração indireta para eletroforese capilar com detecção condutométrica"

MICHELE ALVES SANTANA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestra em Ciências - no Programa de Química.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago
IQ - USP

Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira
FFCLRP - USP

Profa. Dra. Lucia Helena Gomes Coelho
UFABC

SÃO PAULO
17 de junho de 2020

*Dedico este trabalho ao meu irmão Matheus
como uma forma de incentivo para nunca
desistir de seus objetivos e de agradecimento.*

A meus pais e minha avó Ana por todos os ensinamentos e incentivos para que eu chegasse até aqui e pelos momentos de compreensão, amor e cuidado.

Agradecimentos

A Deus e o Universo pela sabedoria, coragem, persistência e paciência dadas a mim na execução do presente trabalho.

Ao professor Claudimir Lucio do Lago pela oportunidade de trabalho e orientação ao longo dos anos.

Aos professores Lucio Angnes e Ivano Gutz pelas aulas, conversas, troca de experiências e caronas até o metrô.

Aos pareceristas pelas ótimas considerações e correções em meus relatórios parciais de progresso.

Aos professores Jivaldo Matos, Mauro Bertotti e Ivano Gutz pelas contribuições e avaliações em meu exame de qualificação.

Aos colegas de laboratório:

- ✓ Pamela Rossini e Thalita Guedes (Bloco 2): pelos momentos de descontração, cafés, apoio motivacional e, principalmente, pelo grande suporte nas traduções de resumos e apresentação de congresso. Muito obrigada!
- ✓ Nathalia Azeredo: pelas conversas no laboratório, pelas apostilas de estudo e auxílio com as “burocracias” envolvendo o auxílio financeiro.

Aos técnicos do laboratório, Fernandinho (Ferds), Simone e Daniel pelas conversas e auxílio ao longo dos anos.

Ao pessoal da seção de pós-graduação, Milton e Vanderlei, pela assistência acadêmica prestada.

Aos meus colegas do Hexag pelo apoio: Wayner, Rafaella, Shibata, Amós, Cleber, Thiago Mendes.

Ao pessoal do 017N que se dispôs a ler esta dissertação (Rodin, Dayane, Nicolas, Alessandra, Matheus e Marcos) pelas correções e sugestões para o texto, bem como a compreensão de cada um em relação a minha ausência em sala e nas tarefas da graduação.

A minha amiga Rosana Silva pela ajuda com a ida ao congresso em Madrid e pelas conversas ao telefone.

As minhas amigas da Farmácia: Juliana Pantaleão e Larissa Carolina, por todo o incentivo, compreensão, amizade, conselhos e apoio nos momentos difíceis. Vocês são demais!

A minha família:

- ✓ A minha mãe pelo incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.
- ✓ Ao meu pai por me buscar no IQ no meio da madrugada inúmeras vezes.
- ✓ Meu irmão e minha avó por compreender o meu cansaço semanal e minha ausência em casa.

E ao CNPq pelo financiamento concedido no período de maio de 2018 a fevereiro de 2020.

*"Never be limited by other people's limited
imagination." - Dra. Mae Jemison.*

Resumo

Santana, M.A. **Sistematização da Estratégia de Calibração Indireta para Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica**. 2020. 137p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A detecção condutométrica sem contato (C^4D) tem se tornado uma das técnicas padrão para detecção em eletroforese capilar. Além da robustez e simplicidade, uma importante característica é a possibilidade de detecção de qualquer espécie química, desde que o eletrólito de corrida (BGE) seja corretamente escolhido. Além disso, observa-se que a sensibilidade (S) está relacionada com mobilidade (μ) em um conjunto de analitos análogos, para um mesmo BGE. Esta observação empírica foi modelada matematicamente e, para um sistema com analito e componentes do BGE monovalentes, tem-se que a sensibilidade é proporcional à diferença de mobilidades entre o analito e seu co-íon no BGE. Como consequência deste comportamento observa-se a possibilidade de quantificação de um analito utilizando uma espécie padrão de mesma mobilidade e, na ausência dessa espécie, seria possível quantificar interpolando a inclinação da curva de calibração a partir de duas ou mais espécies com mobilidades próximas. A proposta deste trabalho é avaliar o modelo ampliando as análises para espécies multivalentes e parcialmente ionizadas, uma vez que originalmente o modelo original contempla apenas espécies monovalentes. Sendo assim, foram escolhidos um BGE apropriado e cinco conjuntos de analitos com propriedades análogas e mobilidades diferentes: quatro ácidos monocarboxílicos, cinco ácidos dicarboxílicos, cinco diaminas, quatro metais alcalinos e quatro metais alcalinos terrosos. O comportamento da sensibilidade em função da mobilidade foi avaliado a partir de dois modelos matemáticos: $S = k \cdot \mu + m$ e $S = k \cdot \mu + p/\mu + m$, por meio de simulações no programa PeakMaster 5.3. Sendo que os experimentos eletroforéticos foram realizados utilizando um equipamento com dois C^4Ds . Dependendo do comportamento observado, foram estudadas as faixas de um a cinco diferentes BGEs, contendo espécies monocarregadas e totalmente dissociadas. Os ácidos monocarboxílicos e os cátions alcalinos foram avaliados como analitos monocarregados, ácidos dicarboxílicos como espécies duplamente carregadas e diaminas, duplamente carregadas e parcialmente dissociadas. O modelo linear pode ser adotado para ácidos mono e dicarboxílicos e diaminas, enquanto para cátions alcalinos e alcalinos terrosos o modelo hiperbólico se fez necessário. Em todos os casos, os coeficientes de correlação (R^2) foram sempre próximos de 1,0, sugerindo que a estratégia de calibração indireta pode sim ser utilizada de modo mais amplo do que havia sido demonstrado inicialmente. Embora matematicamente pudessem ser utilizadas apenas duas espécies calibrantes para interpolação da mobilidade desejada, na prática um número maior de calibrantes deve ser adotado devido a dois possíveis problemas: (1) não se sabe, a priori, quão limitada é a região de mobilidades para que o modelo linear seja aceitável e (2) um ou mais candidatos a calibrante podem apresentar algum comportamento anômalo, necessitando ser descartado. Com isso, apesar de nosso método ser mais trabalhoso que um processo de calibração simples, a estratégia mostrou ser de grande valia para estudo de espécies com padrões indisponíveis.

Palavras chave: eletroforese capilar com detecção condutométrica; calibração indireta; modelos matemáticos; mobilidade eletroforética; PeakMaster.

Abstract

Santana, M.A. **Systematized strategy of indirect calibration for capillary electrophoresis with conductometric detection.** 2020. 137p. Ms. Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection (C⁴D) has become a standard technique to capillary electrophoresis. Besides its robustness and simplicity, the main characteristic is the possibility of detection of any chemical species, if the background electrolyte (BGE) is correctly chosen. Additionally, different authors have observed a correlation between sensibility (S) and effective mobility (μ). A mathematical model of a system composed by one analyte and BGE with monovalent components attested the proportionality among sensibility and the difference between the mobilities of the analyte and BGE co-ion. Consequently, there is a possibility of an analyte quantification using a standard specie with the same mobility as the target, or, in the absence of this standard, the model showed a possibility of quantification by interpolating the slope from calibration curves constructed using two or more species with similar mobility from the analyte. In this context, the present work proposes to evaluate the behavior by analyzing multivalent ions and partially ionized species, because the original mathematical model contemplates only monovalent analytes. To accomplish this task, we choose an appropriate BGE and five groups of analytes with similar characteristics and divergent mobilities: four carboxylic acids, five diamines, four alkaline earth metals, and four alkaline metals. The sensibility behavior versus mobility was evaluated by using two mathematical models: $S = k \cdot \mu + m$ e $S = k \cdot \mu + p/\mu + m$, through simulations in PeakMaster 5.3 program. The electrophoretic experiments were performed in an equipment containing two C⁴D. Depending on the observations, we evaluated from one to five different BGEs, containing monocharged and totally dissociated species. The dicarboxylic acids were evaluated as doubly charged analytes, both monocarboxylic acids, and the metal cations as monocharged analytes and the diamines as doubly charged and partially dissociated analytes. The linear model was successfully applied to mono and dicarboxylic acids and diamines, whereas to metal cations the hyperbolic model must be applied. In all cases, the correlation coefficients (R^2) were close than 1.0, suggesting that the model has wider range of applications then previously demonstrated. Although, mathematically only two calibrators should be used to interpolate the target mobility, experimentally a large number of standards must be used to minimize possible problems: (1) there is a difficulty to identify the limited region of mobility that makes the linear model accepted and (2) one or more calibrator candidates could present some anomalous behavior. Therefore, even though this method is more laborious than the ordinary calibration process, the strategy showed great usefulness in the study of species with unavailable standards.

Keywords: capillary electrophoresis with conductometric detection; indirect calibration; electrophoretic mobility; mathematical models; PeakMaster.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema de um instrumento de eletroforese capilar.....	23
Figura 2. Estrutura química para o álcool polivinílico (PVA).	27
Figura 3. a) Equipamento de CE utilizado nos experimentos. b) Visualização da parte interna do equipamento de eletroforese capilar: posição da coluna capilar, dos detectores, ventoinha de circulação de ar e dos vials. Os detectores estão posicionados a 10 cm do ponto de injeção e 10 cm do ponto de descarte da coluna.....	32
Figura 4. Foto do detector condutométrico sem contato.	33
Figura 5. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 4,7, com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do ânion de A: 40, B: 35, C: 30, D: 27,5, E: 25, F: 22,5, G: 20, H: 17,5, I: 15, J: 12,5, K: 10, L: 7,5, M: 5, N: 2,5, O: 1 Ti. Potencial: -30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.	44
Figura 6. Curvas de área de pico de ânions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mas o contra-íon apresenta-se totalmente dissociado.	45
Figura 7. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 2,7 (a) e pH 3,7 (b), com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do cátion de A a O, respectivamente: (a) 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 2 Ti; (b) 68, 60, 51, 46, 42, 37, 33, 29, 24, 20, 15, 11, 6, 2 e 1 Ti. Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.....	47
Figura 8. Curvas de área de pico de cátions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do cátion no BGE é modificada, mas o contra-íon apresenta-se totalmente dissociado.	48
Figura 9. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 4,7, com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do ânion de A: 40, B: 35, C: 30, D: 27,5, E: 25, F: 22,5, G: 20, H: 17,5, I: 15, J: 12,5, K: 10, L: 7,5, M: 5, N: 2,5, O: 1 Ti. Potencial: -30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.	50
Figura 10. Curvas de área de pico de ânions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mas o co-íon apresenta-se totalmente dissociado.	51

Figura 11. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 2,7 (a), pH 3,7 (b) e pH 4,7 (c), com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do cátion de A a O, respectivamente: (a) 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 2 Ti; (b) 68, 60, 51, 46, 42, 37, 33, 29, 24, 20, 15, 11, 6, 2 e 1 Ti; (c) 40, 35, 30, 27,5, 25, 22,5, 20, 17,5, 15, 12,5, 10, 7,5, 5, 2,5 e 1 Ti. Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.....52

Figura 12. Curvas de área de pico de cátions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do cátion no BGE é modificada, mas o co-íon apresenta-se totalmente dissociado.53

Figura 13. Curvas de área de pico de ânions divalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado. ...55

Figura 14. Curvas de área de pico de cátions divalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado. ...57

Figura 15. Curvas de área de pico de ânions divalentes com dois grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado.59

Figura 16. Curvas de área de pico de cátions divalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado.60

Figura 17. Curvas de área de pico de ânions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado.62

Figura 18. Curvas de área de pico de cátions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado.64

Figura 19. Curvas de área de pico de ânions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a

porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado. 66

Figura 20. Curvas de área de pico de cátions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado. 67

Figura 21. Eletroferograma obtido por meio da simulação pelo PeakMaster da série de ácidos monocarboxílicos utilizando como BGE NaHCO_3 10 mmol/L (pH 8,3). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 52 cm e 42 cm, respectivamente. 71

Figura 22. Eletroferograma obtido no segundo detector para a mistura de padrões de ácidos monocarboxílicos (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em NaHCO_3 10 mmol/L (pH 8,3) a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 52,5 cm e 42,5 cm, respectivamente. 72

Figura 23. Curvas analíticas de calibração para os ácidos monocarboxílicos em NaHCO_3 10 mmol/L, pH 8,3. 73

Figura 24. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito (coeficiente angular da curva de calibração) em função das suas respectivas mobilidades efetivas. Ácidos monocarboxílicos em NaHCO_3 10 mmol/L, pH 8,3. 74

Figura 25. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito (coeficiente angular da curva de calibração) em função das suas respectivas mobilidades efetivas na ausência de butirato. Ácidos monocarboxílicos em NaHCO_3 10 mmol/L, pH 8,3. 75

Figura 26. a) Eletroferograma obtido por meio da simulação pelo PeakMaster da série de ácidos monocarboxílicos utilizando como BGE MES/Histidina 30 mmol/L de pH 6,1. Potencial: -30 kV. Tamanho total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente. b) Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de ácidos monocarboxílicos (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em MES/Histidina 30 mmol/L, de pH 6,1 a -30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente. 78

Figura 27. Área de pico em função da mobilidade de monocarboxilatos em Mes/His 30mmol/L, pH 6,0. Resultado obtido por simulação. 79

Figura 28. Curvas analíticas de calibração para os ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.	80
Figura 29. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função das suas respectivas mobilidades efetivas. Ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.	80
Figura 30. Eletroferograma obtido por meio da simulação pelo PeakMaster da série de ácidos dicarboxílicos utilizando como BGE NaHCO ₃ 10 mmol/L (pH 8,3). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 56,1 cm, respectivamente.	83
Figura 31. Área de pico em função da mobilidade de carboxilatos em NaHCO ₃ 10 mmol/L, pH 8,3. Resultado obtido por simulação.....	84
Figura 32. Eletroferograma obtido no primeiro detector de ácidos dicarboxílicos (500 µmol/L). O experimento foi realizado em NaHCO ₃ 10 mmol/L, de pH 8,3 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 51,7 cm e 10 cm, respectivamente.	85
Figura 33. Curvas analíticas de calibração diretas para os ácidos dicarboxílicos em NaHCO ₃ 10 mmol/L, pH 8,3.....	86
Figura 34. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Ácidos dicarboxílicos em NaHCO ₃ 10 mmol/L, pH 8,3.	86
Figura 35. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 µmol/L). O experimento foi realizado em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 65,1 cm e 55,1 cm, respectivamente.	89
Figura 36. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 µmol/L). O experimento foi realizado em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.	90
Figura 37. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5.....	91
Figura 38. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.	91

Figura 39. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas com exclusão de agmatina. Diaminas em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.	92
Figura 40. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (400 µmol/L). O experimento foi realizado em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.	94
Figura 41. Curvas analíticas de calibração diretas para as diaminas em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5.....	94
Figura 42. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em ácido fórmico 50 mmol/L, pH 2,5.	95
Figura 43. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 µmol/L). O experimento foi realizado em lactato/histidina 20 mmol/L de pH 5,6 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 56,9 cm e 46,9 cm, respectivamente.	97
Figura 44. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em lactato/histidina 20 mmol/L, de pH 5,6.....	97
Figura 45. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em lactato/histidina 20 mmol/L, pH 5,6.	98
Figura 46. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (400 µmol/L). O experimento foi realizado em MES/Histidina 30 mmol/L de pH 6,1 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.	100
Figura 47. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em MES/Histidina 30 mmol/L, de pH 6,1.....	100
Figura 48. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas com exclusão do ponto de cadaverina. Diaminas em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.	101

Figura 49. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 µmol/L). O experimento foi realizado em MOPS/Li ⁺ 30 mmol/L de pH 7,6 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 55,5 cm e 45,5 cm, respectivamente.	102
Figura 50. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em MOPS/Li ⁺ 30 mmol/L, de pH 7,6.....	103
Figura 51. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em MOPS/Li ⁺ 30 mmol/L, pH 7,6.	103
Figura 52. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos utilizando como BGE ácido acético 0,5 mol/L (pH 2,5). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 59,2 cm e 49,2 cm, respectivamente.	105
Figura 53. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5. Resultado obtido por simulação.....	106
Figura 54. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de cátions alcalinos (400 µM). O experimento foi realizado em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 59,2 cm e 49,2 cm, respectivamente.	107
Figura 55. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5.....	107
Figura 56. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.	108
Figura 57. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos utilizando como BGE MES/Histidina 30 mmol/L (pH 6,1). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 57,4 cm e 47,4 cm, respectivamente.	109
Figura 58. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos em MES/Histidina 30 mmol/L (pH 6,1). Resultado obtido por simulação.	109
Figura 59. Eletroferograma obtido no primeiro detector de cátions alcalinos (500 µmol/L). O experimento foi realizado em MES/Histidina 30 mmol/L de pH 6,1 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 µm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 57,4 cm e 10 cm, respectivamente. ...	110

Figura 60. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos em MES/Histidina 30 mmol/L, de pH 6,1.....	111
Figura 61. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.	111
Figura 62. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos utilizando como BGE ácido fórmico 50 mmol/L (pH 2,5). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 51,7 cm e 41,7 cm, respectivamente.	112
Figura 63. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos em ácido fórmico 50 mmol/L (pH 2,5). Resultado obtido por simulação.....	113
Figura 64. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de cátions alcalinos (400 μ mol/L). O experimento foi realizado em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μ m d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 51,7 cm e 41,7 cm, respectivamente.	114
Figura 65. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5.....	114
Figura 66. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos em ácido fórmico 50 mmol/L, pH 2,5.	115
Figura 67. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos terrosos utilizando como BGE ácido acético 0,5 mol/L (pH 2,5). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 61 cm e 10 cm, respectivamente.	116
Figura 68. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos terrosos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5. Resultado obtido por simulação.	116
Figura 69. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos terrosos em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5.	117
Figura 70. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos terrosos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.	118

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com um grupo protonável e co-íon parcialmente ionizado.....	43
Tabela 2. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 6	45
Tabela 3. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 8	48
Tabela 4. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com um grupo protonável e contra-íon parcialmente ionizado	49
Tabela 5. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 10	51
Tabela 6. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 12	53
Tabela 7. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com dois grupos protonáveis e co-íon parcialmente ionizado	54
Tabela 8. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 13	55
Tabela 9. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 14	57
Tabela 10. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com dois grupos protonáveis e contra-íon parcialmente ionizado.....	58
Tabela 11. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 15	59
Tabela 12. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 16	60
Tabela 13. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com três grupos protonáveis e co-íon parcialmente ionizado	61
Tabela 14. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 17	63
Tabela 15. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 18	64
Tabela 16. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com três grupos protonáveis e contra-íon parcialmente ionizado.....	65
Tabela 17. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 19	66
Tabela 18. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 20	68
Tabela 19. Estruturas e valores de pK_a dos ácidos carboxílicos utilizados no experimento	70
Tabela 20. Resultados obtidos para as análises estatísticas de ácidos monocarboxílicos em NaHCO_3	76
Tabela 21. Resultados obtidos para as análises estatísticas de ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina	81
Tabela 22. Estruturas e valores de pK_a dos ácidos dicarboxílicos utilizados no experimento	82

Tabela 23. Resultados obtidos para as análises estatísticas de ácidos dicarboxílicos em NaHCO ₃	87
Tabela 24. Estruturas e valores de p <i>K_a</i> das diaminas utilizados no experimento	88
Tabela 25. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em ácido acético.....	93
Tabela 26. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em ácido fórmico	96
Tabela 27. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em lactato/histidina.....	99
Tabela 28. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em MOPS/Li ⁺	104

Lista de Siglas e Abreviaturas

BGE – eletrólito de corrida (do inglês *background electrolyte*)

CE – eletroforese capilar (do inglês *capillary electrophoresis*)

C⁴D – detecção condutométrica sem contato (do inglês, *Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*)

EOF – fluxo eletrosmótico (do inglês *electroosmotic flow*)

His – Histidina

μ – mobilidade efetiva

MES – ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico

MOPS – ácido 3-[N-morfolino]propanossulfônico

PABA – ácido *p*-aminobenzóico

PVA – álcool polivinílico (do inglês *polyvinyl alcohol*)

S – sensibilidade

Ti – Tiselius ($10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

u.a. – unidades de área

Sumário

1. Introdução e Objetivos.....	23
1.1 Eletroforese capilar	23
1.2 Detecção condutométrica sem contato (C ⁴ D)	27
1.3 Evidências experimentais mostrando a relação entre a sensibilidade da detecção e a mobilidade eletroforética.....	28
1.4 Modelos teóricos para o sinal do detector.....	29
1.5 Calibração indireta usando um detector condutométrico.....	30
1.6 Objetivos desta dissertação	31
2. Materiais e equipamentos	32
2.1 O Instrumento de eletroforese capilar com detecção condutométrica	32
2.2 O detector condutométrico sem contato acoplado capacitivamente	33
2.3 Reagentes	34
2.4 Preparo e padronização das soluções	34
2.4.1 Ácidos monocarboxílicos	35
2.4.2 Ácidos dicarboxílicos	36
2.4.3 Diaminas.....	36
2.4.4 Cátions alcalinos.....	37
2.4.5 Cátions alcalinos terrosos	37
2.4.6 Eletrólitos de corrida	38
2.5 Condições para os experimentos de eletroforese capilar	39
3. Resultados e Discussão.....	40
3.1 Uma análise do modelo analítico para a detecção condutométrica.....	40
3.2 Resultados obtidos por meio das simulações realizadas pelo PeakMaster	42
3.2.1 Analitos com um grupo protonável	43
3.2.2 Analitos com dois grupos protonáveis	54
3.2.3 Analitos com três grupos protonáveis	60

3.2.4 Conclusão sobre os resultados obtidos por meio das simulações	68
3.2.5. Limitações do uso do PeakMaster na previsão do comportamento do sistema.....	69
3.3 Resultados obtidos por análises reais	70
3.3.1 A importância da escolha da composição do BGE	70
3.3.2 Ácidos monocarboxílicos em NaHCO ₃	70
3.3.3 Ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina	77
3.3.4 Ácidos dicarboxílicos em NaHCO ₃	82
3.3.5 Diaminas em ácido acético	88
3.3.6 Diaminas em ácido fórmico	93
3.3.7 Diaminas em Lactato/His	96
3.3.8 Diaminas em MES/Histidina.....	99
3.3.9 Diaminas em MOPS/Li ⁺	102
3.3.10 Cátions alcalinos em ácido acético.....	105
3.3.11 Cátions alcalinos em MES/Histidina.....	108
3.3.12 Cátions alcalinos em ácido fórmico	112
3.3.13 Cátions alcalinos terrosos em ácido acético	115
4. Conclusões e Perspectivas	119
Referências Bibliográficas	121
Súmula Curricular.....	125

1. Introdução e Objetivos

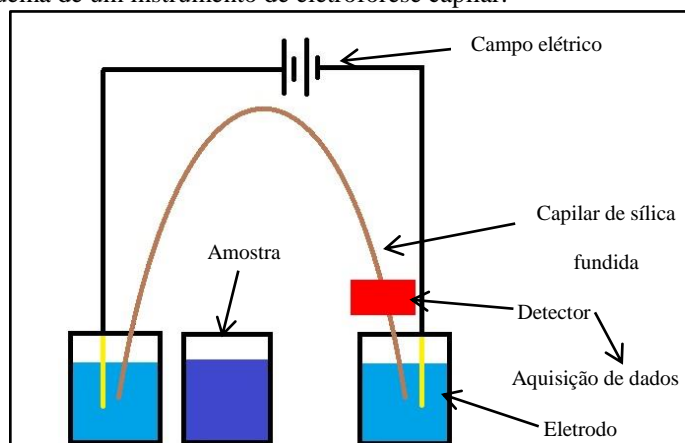
1.1 Eletroforese capilar

A eletroforese é uma técnica analítica que se baseia na separação de espécies carregadas eletricamente presentes em um eletrólito por meio da velocidade com que elas adquirem quando um campo elétrico é aplicado ao sistema, sendo aprimorada por Arne Tiselius na década de 1930, focando-se na determinação da composição proteica em soro sanguíneo (TISELIUS, 1930).

Na década de 1960, Hjérten propôs a realização da técnica em tubos capilares de quartzo com diâmetro interno de 300 μm , surgindo-se assim a técnica de Eletroforese Capilar (HJERTÉN, 1967). Mais tarde, Jorgenson e Lukacs resolveram reduzir o tamanho dos diâmetros internos dos capilares, chegando a 75 μm , sendo similar com a eletroforese capilar utilizada nos dias atuais. Com isso, podem-se aplicar diferenças de potenciais mais altas no sistema, aumentando o poder de separação entre os analitos (JORGENSON; LUKACS, 1981).

Em linhas gerais, a instrumentação consiste em um ponto de injeção da amostra, a coluna capilar, uma fonte de alta tensão, o sistema de detecção e o sistema de aquisição de dados. Um esquema representando a disposição desses componentes está na Figura 1.

Figura 1. Esquema de um instrumento de eletroforese capilar.



A migração das espécies carregadas, na eletroforese capilar, ocorre devido à mobilidade eletroforética, simbolizada por μ_e , que pode ser determinada segundo a Equação 1.

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

De acordo com a Equação 1, a mobilidade é diretamente proporcional à carga elétrica da espécie (q) e inversamente proporcional à viscosidade do meio (η) e ao raio iônico hidratado (r). A velocidade adquirida pela espécie dentro do capilar é dependente do potencial aplicado e da mobilidade eletroforética. Essa velocidade pode ser determinada através da Equação 2, onde E é o campo elétrico aplicado e μ_e , a mobilidade eletroforética da espécie.

$$v_e = \mu_e \cdot E \quad (2)$$

De acordo com a Equação 2, pode-se modificar a velocidade da espécie através da modificação do campo elétrico aplicado ou pela mobilidade da espécie. Os fatores que podem alterar a mobilidade eletroforética são mudanças no eletrólito de corrida (BGE), variações no pH e na viscosidade do meio, presença de agentes complexantes e grau de dissociação da espécie (VIDAL, 2011). Com relação ao grau de dissociação da espécie, variando-se o pH do meio pode-se modificar o parâmetro e atingir diretamente a velocidade de migração. Portanto, dentro do sistema de eletroforese, considera-se a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{eff}), visto que leva em conta o grau de dissociação da espécie (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). A mobilidade efetiva é descrita de acordo com a Equação 3

$$\mu_{efetiva} = \sum_i \alpha_i \cdot \mu_{ei} \quad (3)$$

sendo α_i a fração molar da espécie i e μ_{ei} , a mobilidade eletroforética da espécie i . O ajuste no valor do pH do meio é um fator importante quando se deseja obter maior resolução numa corrida eletroforética por meio do aumento da diferença das mobilidades efetivas das espécies analisadas (VIDAL, 2011).

Existem diversos tipos de capilares utilizados em CE, sendo o capilar de sílica fundida o mais usual (KHALEDI, 1993; KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). A sílica permite o emprego de alta tensão devido à característica dielétrica do material, permitindo melhor dissipação do calor gerado durante sua utilização. Em contrapartida, a sílica não apresenta boa resistência mecânica, necessitando de um recobrimento externo feito de poliimida, evitando rompimentos durante a utilização nas análises (VIDAL, 2011).

A superfície interna do capilar de sílica é formada por grupos silanóis (SiOH), os quais sofrem ionização dependendo do valor de pH do meio no qual se encontram, apresentando comportamento de ácido fraco. A ionização dos grupos silanóis faz com que a superfície do capilar fique carregada eletricamente e, desta maneira, gere uma camada de cátions (no caso, os contra-íons do BGE) por atração eletrostática ao lado da camada negativa com o intuito de compensar o excesso de cargas negativas. Com isso, surge o que chamamos de dupla camada elétrica na superfície interna do capilar (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). Ao se aplicar o potencial elétrico ao sistema, ocorre a migração dos íons presentes na camada que está em contato com a solução em direção ao eletrodo de carga oposta, inclusive as moléculas de água que são atraídas por forças eletrostáticas. Com isso, há a movimentação da solução contida no capilar como um todo, gerando o fenômeno chamado de fluxo eletrosmótico (EOF) (TAVARES, 1997).

O EOF é dependente do valor de pH do BGE. Como foi citado anteriormente, os grupos silanóis têm comportamento de ácido fraco e sofrem maior ionização quanto maior for o valor de pH. Portanto, quanto maior for a desprotonação dos grupos silanóis, maior será o

efeito do EOF sob a superfície interna do capilar e, conseqüentemente, maior a mobilidade adquirida pelo mesmo. Em contrapartida, em eletrólitos de pH menores que 3, essa desprotonação não é considerável e concede valores de mobilidade muito baixos para o EOF (TAVARES, 1996). Assim como no cálculo da velocidade da espécie a ser analisada, o EOF também é dependente do potencial aplicado, como pode ser visto na Equação 4.

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \quad (4)$$

Como o EOF está presente no sistema, a mobilidade com que as espécies migram dentro da coluna capilar também é dependente da mobilidade do EOF, retardando ou acelerando as espécies a ser separadas. Sendo assim, a velocidade medida para a espécie é chamada de velocidade aparente (V_{ap}) e trata-se da soma das velocidades efetivas e do EOF, como é mostrado na Equação 5.

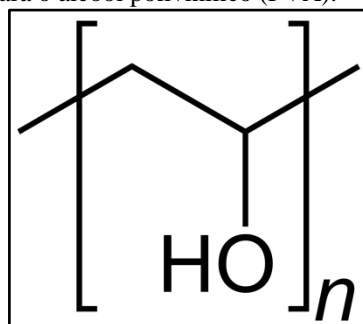
$$v_{ap} = v_{ef} + v_{eof} \quad (5)$$

A existência desse fenômeno nos permite analisar tanto cátions como ânions em uma mesma corrida eletroforética, visto que todas as espécies presentes são estimuladas a migrarem em direção ao detector (COLOMBARA et al., 1997; JAGER; TAVARES, 2001).

Devido à presença e a decorrente desprotonação dos grupos silanóis, pode ocorrer a adsorção de espécies positivas com duas ou mais cargas na superfície interna do capilar de sílica fundida. Como consequência desse fato, os picos obtidos durante a análise mostram-se deformados, causando problemas na integração, resolução entre picos, cálculo do valor de mobilidade e quantificação das espécies de interesse (DANIEL et al., 2015). Como alternativa

a esse problema, utiliza-se o capilar revestido internamente por álcool polivinílico (PVA). A estrutura deste polímero encontra-se na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química para o álcool polivinílico (PVA).



Esse revestimento evita a adsorção das espécies, pois não apresenta possibilidade de desprotonação do grupo hidroxila na superfície do capilar, que tem, como consequência, a redução da mobilidade do EOF, fazendo com que as espécies migrem com suas respectivas mobilidades (DANIEL et al., 2015; TAVARES, 1997). Uma das desvantagens de sua utilização é a faixa de pH que esse tipo de capilar suporta: os eletrólitos devem ter valores de pH entre 2 e 8. A utilização de BGE com valores de pH fora dessa faixa podem causar degradação e remoção parciais ou totais da camada de PVA.

1.2 Detecção condutométrica sem contato (C⁴D)

A detecção condutométrica é um método de detecção universal que mede a condutância elétrica das soluções iônicas, sendo dependente do número de íons presentes, bem como das cargas elétricas e das mobilidades dos íons em solução (OHLWEILER, 1981). A condutância de uma solução pode ser calculada com base na Equação 6.

$$G = \frac{A}{l} \sum \lambda_i c_i \quad (6)$$

Pela Equação 6, tem-se que a condutância é dependente da área do eletrodo de trabalho (A), da distância entre os eletrodos utilizados (l), das concentrações de todas as espécies carregadas eletricamente (c_i) e de suas respectivas condutâncias iônicas molares (λ_i). Como essa medida é fornecida pela soma das condutâncias individuais de cada espécie presente em solução, este tipo de detecção carece de especificidade. Portanto, acoplado-a com eletroforese capilar podemos separar os analitos e medir sua condutância de cada espécie individualmente. No caso, mede-se a diferença de condutância entre a região em que o analito migra em relação ao eletrólito.

Pode-se realizar esse tipo de detecção de dois modos diferentes: modo com contato direto com a solução e modo sem contato. No modo com contato (convencional), os eletrodos estão em contato direto com a solução, enquanto que no modo sem contato, os eletrodos estão posicionados do lado externo do capilar. Como vantagens desse tipo de detecção, pode-se citar a prevenção da ocorrência de eletrólise das espécies presentes no meio, assim como possível degradação do eletrodo gerando contaminações na solução e formação de bolhas dentro do capilar (VANDAVEER et al., 2004). Maiores informações sobre o princípio de funcionamento da detecção sem contato encontram-se nas referências (COLTRO, 2008; FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009, 2016).

1.3 Evidências experimentais mostrando a relação entre a sensibilidade da detecção e a mobilidade eletroforética

Lucy e Wu (1998) notaram uma relação interessante entre o sinal de condutividade e mobilidade eletroforética. Os autores relatam o efeito que a composição do BGE resulta na resposta obtida pelo detector. Para mostrar essa relação, os autores tomaram surfactantes aniônicos como analitos, fixaram o contra-íon do eletrólito em glicina e variaram o co-íon, obtendo diferentes composições de BGE e em diferentes valores de pH. Esse experimento teve finalidade de verificar se havia alguma modificação em relação ao sinal obtido do analito

para essas diferentes composições. Como resultado, verificou-se que a resposta de um detector condutométrico em eletroforese capilar é dependente da diferença entre as mobilidades do analito e do co-íon do BGE. Portanto, quanto maior for essa diferença, maior será a intensidade do pico do analito (LUCY; WU, 1998). Esta mesma observação experimental também foi encontrada na literatura em uma publicação que envolve o desenvolvimento de um método de separação e análise de ácidos graxos de cadeia linear (OLIVEIRA et al., 2003). Nos experimentos, o BGE utilizado foi tampão fosfato pH 7,0 em meio de acetonitrila, água e metanol em presença de duas ciclodextrinas. A observação experimental obtida foi a de quanto menor a cadeia carbônica, menor a diferença de mobilidade entre o analito e co-íon do BGE e, portanto, menor a resposta obtida pelo o detector.

1.4 Modelos teóricos para o sinal do detector

A proposta não foi somente observada experimentalmente, mas também modelada matematicamente (U. KATZMAYR et al., 1999), sendo deduzida a relação entre a resposta do detector condutométrico e as mobilidades das espécies presentes no sistema (Equação 7), limitando-a para analitos e constituintes do eletrólito de corrida com cargas monovalentes e totalmente ionizados.

$$\Delta\kappa = \frac{C_a \left\{ \mu_o \cdot F \left[1 - \frac{\mu_s \cdot (\mu_a + \mu_o)}{\mu_a \cdot (\mu_s + \mu_o)} \right] - (\mu_s \cdot F) \cdot \left[1 - \frac{\mu_s \cdot (\mu_a + \mu_o)}{\mu_a \cdot (\mu_s + \mu_o)} \right] + \mu_a \right\}}{10^{-3} \cdot K} \quad (7)$$

onde μ_a , μ_s e μ_o correspondem, respectivamente, as mobilidades absolutas do analito, co-íon e contra-íon, c_a à concentração do analito, K é a constante de cela do detector, F é a constante de Faraday e Δk , a diferença de condutividade entre a amostra e o BGE.

Posteriormente, a Equação 7 foi simplificada, chegando à forma mostrada na Equação 8 (BRITO-NETO et al., 2005).

$$\Delta\kappa = c_a \frac{(\mu_a - \mu_s) \cdot (\mu_a + \mu_o)}{\mu_a} \cdot \frac{F}{10^{-3}K} \quad (8)$$

Verifica-se, por meio da Equação 8, que o sinal de condutividade é dependente das mobilidades do analito, co-íon e contra-íon do BGE e da concentração do analito, sendo a intensidade do sinal obtido relacionada com a diferença de mobilidade entre o analito e co-íon do BGE. Essa equação é bastante útil nas rotinas de análise, pois permite o ajuste da composição do eletrólito de corrida a fim de maximizar a intensidade do sinal e melhorar os parâmetros de quantificação, além de prever a orientação da intensidade do sinal (picos negativos ou positivos).

1.5 Calibração indireta usando um detector condutométrico

O fato da sensibilidade da detecção condutométrica, em eletroforese capilar, estar diretamente relacionada à mobilidade do analito abre a possibilidade para que não o analito, mas uma outra espécie de mesma mobilidade seja utilizada para calibração do sistema para fins quantitativos. Esta estratégia indireta de calibração foi, de fato, utilizada para fins de quantificação em dois trabalhos publicados (ROSSI et al., 2012; VIDAL et al., 2011). Nos dois casos citados, buscava-se mensurar a concentração de monoalquil carbonatos após sua formação em meio aquoso e em bebidas carbonatadas. Essas espécies são produtos da reação entre um álcool e o bicarbonato, e por serem instáveis, inviabiliza a construção de uma curva de calibração direta para quantificá-las. Com o método foi possível obter informações quantitativas dessas espécies, encontrando-se valores muito próximos do esperado.

Estes dois trabalhos demonstram que seria possível, em princípio, a utilização de padrões para calibração que sejam diferentes do analito. Esta perspectiva seria interessante,

não apenas para casos como o de analitos instáveis, como os monoalquilcarbonatos relatados, mas também casos como ausência de padrões disponíveis comercialmente, drogas ilícitas, explosivos, agentes químicos e novos produtos sintéticos. Porém, o que não foi demonstrado até o momento é quão genérica é de fato a estratégia, já que a Equação 8 é válida rigorosamente para um analito monocarregado e totalmente dissociado em BGE contendo íons na mesma condição.

1.6 Objetivos desta dissertação

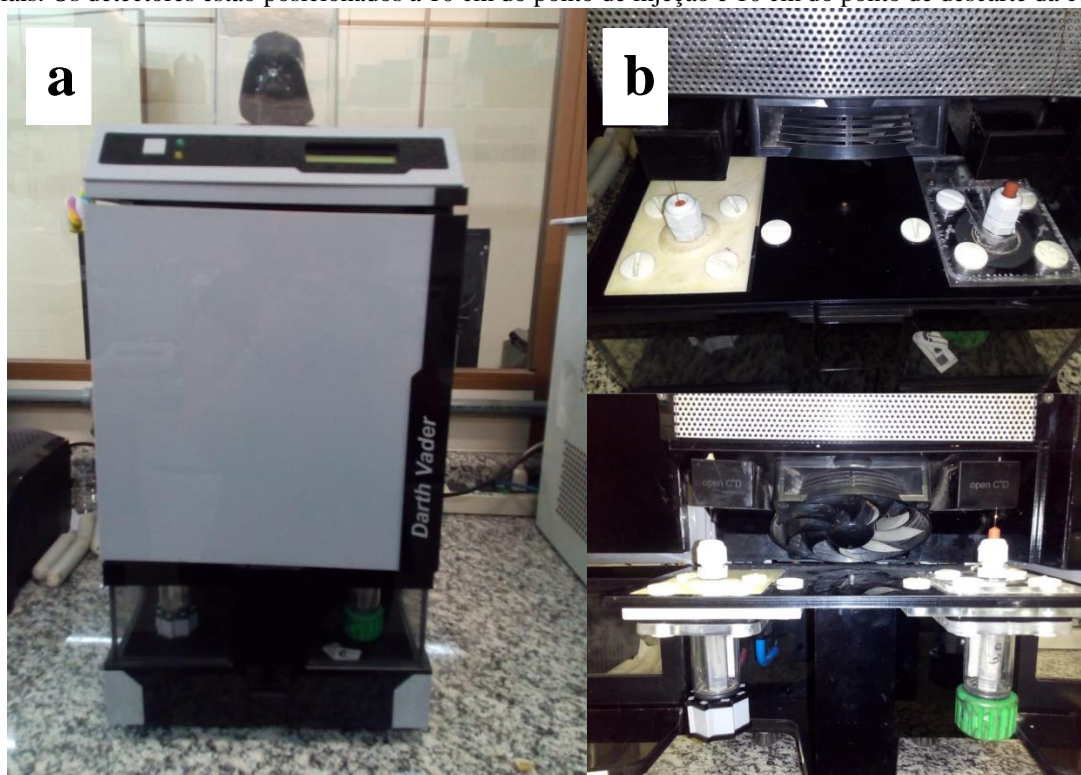
Em vista da teoria apresentada, o objetivo dessa dissertação é sistematizar a estratégia de calibração indireta por meio de dados experimentais visando a investigação do comportamento de espécies mono, duplamente carregadas, catiônicas e aniônicas e em diferentes graus de ionização em CE-C⁴D, tanto para analitos como os componentes do BGE. O intuito dessa investigação é entender a relação entre a resposta do detector condutométrico e as mobilidades efetivas das espécies presentes no sistema, visto que até o momento só foram feitos estudos referentes a espécies monovalentes, utilizando esta relação para fins de quantificação na ausência de padrões de análise.

2. Materiais e equipamentos

2.1 O Instrumento de eletroforese capilar com detecção condutométrica

O equipamento utilizado em todos os experimentos realizados foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório. Trata-se de um equipamento com dois detectores condutométricos sem contato, sistema de injeção com sensor de pressão e sistema de termostatização, apresentando 48,5 cm de altura, 25,5 cm de largura e 39,0 cm de profundidade. Mais informações sobre a construção do equipamento encontram-se em (SAITO et al., 2010). Na Figura 3 encontra-se o equipamento.

Figura 3. a) Equipamento de CE utilizado nos experimentos. b) Visualização da parte interna do equipamento de eletroforese capilar: posição da coluna capilar, dos detectores, ventoinha de circulação de ar e dos vials. Os detectores estão posicionados a 10 cm do ponto de injeção e 10 cm do ponto de descarte da coluna.



O processo de injeção é realizado por meio de uma bomba que exerce pressão positiva da ordem de 25 kPa no reservatório direito do equipamento. A aplicação de alta pressão permite que o tempo de injeção das amostras seja curto (2 a 10 segundos).

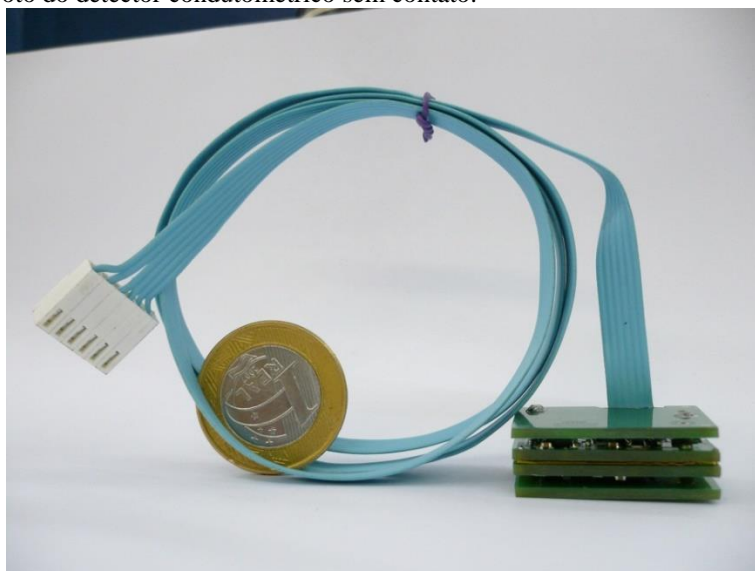
Para a aquisição dos dados e ajuste dos parâmetros de análise, utilizou-se um programa criado pela plataforma *LabVIEW 8.0* (National Instruments, Redmond, EUA). Com ele é possível ajustar valores de tempo de injeção, temperatura e potencial aplicado, além de possibilitar o acompanhamento da pressão aplicada durante a injeção, monitoramento da corrente e temperatura do sistema ao longo das corridas eletroforéticas.

Todos os arquivos gerados pelo *LabVIEW* são acessíveis ao *Origin* (Microcal Software, Northampton, MA, EUA), software dedicado à construção de gráficos e outros recursos utilizados nesta dissertação.

2.2 O detector condutométrico sem contato acoplado capacitivamente

Para a detecção dos analitos no presente trabalho, utilizou-se o C⁴D construído também pelo grupo de pesquisa do laboratório. Na atual versão do detector, ele se apresenta de maneira compacta com quatro placas de circuito impresso sobrepostas, como pode ser visto na Figura 4.

Figura 4. Foto do detector condutométrico sem contato.



Fonte: Retirado de (VIDAL, 2011).

Maiores informações sobre a construção do detector e suas partes estão descritas em (FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009, 2016).

2.3 Reagentes

Butirato de sódio, propionato de sódio, ácido acético, 1,3-diaminopropano, dicloridrato de putrescina, cadaverina, sulfato de agmatina e 1,7-diaminoheptano, histidina, carbonato de céσιο e ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico (MOPS) foram obtidos de Sigma Aldrich (St Louis, EUA). Acetato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido clorídrico, ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), carbonato de lítio, carbonato de sódio, cloreto de bário, cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio, ácido fórmico, ácido adípico, ácido fumárico, biftalato de potássio e cloreto de lítio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Hidróxido de sódio, sulfato de magnésio, ácido láctico, ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e ácido málico foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil). Ácido succínico foi obtido da Carlo Elba (Val de Reuil, França). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada 18 M Ω ·cm (Millipore Milli-Q, Molsheim, França).

2.4 Preparo e padronização das soluções

Embora os reagentes utilizados sejam de grau analítico, as soluções estoques de ácidos carboxílicos e diaminas foram padronizadas por titulação potenciométrica, utilizando-se potenciômetro modelo 827 pH lab (Metrohm, Suíça) com eletrodo combinado de vidro modelo 6.02233.100 (Metrohm, Suíça). Os balões volumétricos, buretas e pipetas utilizados foram aferidos. Para o preparo das soluções a serem analisadas, alíquotas foram tomadas utilizando-se micropipetas modelo Research plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com intervalos de volume de 2 a 20 μ L, 10 a 100 μ L, 20 a 200 μ L, 100 a 1000 μ L e 5 mL, de forma a ajustar a concentração final. Todos os sólidos utilizados foram deixados no dessecador por 2 ou 3 dias antes da preparação das soluções e feitas em um único dia.

Para o preparo das soluções, o procedimento foi similar a todas as soluções: pesou-se a massa do sólido em uma navícula, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico com

auxílio de água deionizada, deixando em banho de ultrassom por 180 segundos para a total dissolução do sólido em água (salvo alguns casos em que foram necessários 540 segundos). Em seguida, agitou-se a solução obtida e completou-se o volume do balão. A solução preparada foi tomada como estoque e acondicionada a 4°C. Para o preparo da mistura dos analitos a serem submetidos à análise, alíquotas de volumes suficientes de cada analito para a concentração final de 1 mmol/L ou 5 mmol/L foram coletadas e adicionadas a um balão volumétrico de 5 mL ou 10 mL, completando o volume com água deionizada e agitando-o por 1 minuto em vortex modelo 1 (IKA, Brasil). Em seguida, alíquotas dessa solução recém-preparada foram adicionadas em vials de 1 mL para serem utilizadas em uma nova diluição para as concentrações finais de 100, 200, 300, 400 e 500 µmol/L, completando o volume com água deionizada e seguido de agitação por 1 minuto em vortex.

2.4.1 Ácidos monocarboxílicos

As massas pesadas para acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio e ácido *p*-aminobenzóico (PABA) foram, respectivamente, 0,4300g, 0,4865g, 0,5510g e 0,07057 g. No caso de PABA, foram necessários 540 segundos para a total dissolução do sólido em água. Para o preparo das soluções utilizou-se balão volumétrico de 50 mL.

As soluções de acetato de sódio, propionato de sódio e butirato de sódio foram tituladas com solução de HCl 0,1796 mol/L, o qual foi padronizado com Na₂CO₃. Os valores obtidos foram, respectivamente, 0,1031 mol/L, 0,0993 mol/L e 0,0975 mol/L. Para a solução de PABA, empregou-se NaOH 0,0225 mol/L – padronizado com biftalato de potássio – e encontrando-se o valor de 0,009175 mol/L.

Para o preparo da mistura dos ânions monovalentes, utilizou-se balão de 10 mL e concentração final de cada analito para 1,0 mmol/L. As alíquotas coletadas de cada solução foram 96,99 µL, 100,70 µL, 102,50 µL e 1.090 µL de acetato de sódio, propionato de sódio, butirato de sódio e PABA, respectivamente.

2.4.2 Ácidos dicarboxílicos

As massas pesadas para biftalato de potássio, fumarato de sódio, ácido adípico, ácido succínico e ácido málico foram, respectivamente, 0,50147 g, 0,38949 g, 0,34711 g, 0,30457g e 0,32805 g. Para o preparo das soluções utilizou-se balão volumétrico de 25 mL.

As concentrações finais obtidas para biftalato de potássio e fumarato de sódio foram, respectivamente, 0,09895 mmol/L e 0,09817 mol/L. As soluções de ácido adípico, ácido succínico e ácido málico foram tituladas com solução de NaOH 0,1999 mol/L para a determinação de suas concentrações reais, chegando aos valores de 0,09222 mol/L, 0,1017 mol/L e 0,09670 mol/L, respectivamente.

Para o preparo de solução da mistura dos ânions divalentes, utilizou-se vial de 1 mL e concentração final de cada analito para 5,0 mmol/L. As alíquotas coletadas de cada solução foram 51,7 μ L, 54,2 μ L, 50,5 μ L, 50,9 μ L e 49,2 μ L de ácido málico, ácido adípico, biftalato de potássio, fumarato de sódio e ácido succínico, respectivamente.

2.4.3 Diaminas

As massas pesadas para 1,3-diaminopropano, dicloridrato de putrescina, cadaverina, sulfato de agmatina e 1,7-diaminoheptano foram, respectivamente, 0,3445g, 0,4300g, 0,2692g, 0,6185g e 0,34456g. Para o preparo das soluções utilizou-se balão volumétrico de 50 mL.

As concentrações finais obtidas para 1,3-diaminopropano, dicloridrato de putrescina e sulfato de agmatina foram, respectivamente, 0,04702 mol/L, 0,0536 mol/L e 0,05439 mol/L. As soluções de cadaverina e 1,7-diaminoheptano foram tituladas com solução de HCl 0,1860 mol/L para a determinação de suas concentrações reais, chegando aos valores de 0,0505 mol/L e 0,05172 mol/L, respectivamente.

Para o preparo de solução da mistura de cátions divalentes, utilizou-se balão de 10 mL e concentração final de cada analito para 1,0 mmol/L. As alíquotas coletadas de cada solução

foram 212,67 μL , 186,56 μL , 198,02 μL , 183,86 μL e 193,24 μL de 1,3-diaminopropano, dicloridrato de putrescina, cadaverina, sulfato de agmatina e 1,7-diaminoheptano, respectivamente.

2.4.4 Cátions alcalinos

As massas pesadas para carbonato de lítio, carbonato de sódio, biftalato de potássio e carbonato de céσιο foram, respectivamente, 0,01170g, 0,02128g, 0,04599g e 0,04304g. Para o preparo das soluções utilizou-se balão volumétrico de 10 mL.

As concentrações finais obtidas para carbonato de lítio, carbonato de sódio, biftalato de potássio e carbonato de céσιο foram, respectivamente, 0,01583 mol/L, 0,020 mol/L, 0,02247 mol/L e 0,01321 mol/L.

Para o preparo de solução da mistura de cátions alcalinos, utilizou-se balão de 10 mL e concentração final de cada analito para 1,0 mmol/L. As alíquotas coletadas foram 318,46 μL , 250 μL , 445,04 μL e 378,50 μL de carbonato de lítio, carbonato de sódio, biftalato de potássio e carbonato de céσιο, respectivamente.

2.4.5 Cátions alcalinos terrosos

As massas pesadas para sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio e cloreto de bário foram, respectivamente, 0,0362g, 0,07278g, 0,12840g e 0,1051g. Para o preparo das soluções utilizou-se balão volumétrico de 10 mL.

As concentrações finais obtidas para sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio e cloreto de bário foram, respectivamente, 0,01447 mol/L, 0,06492 mol/L, 0,05140 mol/L e 0,0490 mol/L.

Para o preparo da solução de cátions alcalinos terrosos, utilizou-se balão de 5 mL e concentração final de cada analito para 1,0 mmol/L. As alíquotas coletadas foram 345 μL , 77 μL , 97,27 μL e 100,2 μL de sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, cloreto de estrôncio e

cloreto de bário, respectivamente. Por conta da presença de sulfato de magnésio, as soluções finais foram preparadas separadamente, evitando assim a precipitação dos outros cátions.

2.4.6 Eletrólitos de corrida

Para o eletrólito de corrida de bicarbonato de sódio, pesou-se em uma navícula 0,0420g do sal para a concentração de 10 mmol/L. Em seguida, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL com a utilização de água deionizada seguido da agitação para total solubilização do sólido em água. Por fim, mediu-se o pH obtendo-se o valor de 8,3.

Para o eletrólito de corrida de MES/Histidina, pesou-se em uma navícula 0,088g de MES e 0,0605g de histidina para a concentração final de 30 mmol/L. Em seguida, transferiram-se as massas para um balão volumétrico de 15 mL e completando o volume com água deionizada. Por fim, agitou-se a solução até total solubilização dos sólidos e mediu-se o pH da solução com auxílio de um pHmetro devidamente calibrado, obtendo-se pH 6,1.

Para o eletrólito de corrida de ácido acético, retirou-se uma alíquota de 287 μ L do ácido e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com água deionizada. Em seguida, procedeu-se à agitação para a homogeneização, obtendo-se uma solução de ácido acético de concentração final 0,5 mol/L e pH 2,5.

Para o eletrólito de corrida de ácido fórmico, retirou-se uma alíquota de 20 μ L do ácido e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com água deionizada. Em seguida, procedeu-se à agitação para a homogeneização, obtendo-se uma solução de ácido fórmico de concentração final 50 mmol/L e pH 2,5.

Para o eletrólito de corrida de Lactato/Histidina 20 mmol/L de pH 5,6, pesou-se 0,0344g de histidina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL com auxílio de água deionizada. Em seguida, transferiu-se a solução para um béquer, adicionaram-se algumas gotas de ácido láctico à solução, agitou-se e mediu-se o pH. A adição de ácido láctico à

solução foi feita até se obter solução de pH 5,6. Por fim, completou-se o volume com água para 10 mL finais de solução.

Para o preparo de eletrólito de corrida de MOPS/Li⁺ 30 mmol/L de pH 7,0, pesou-se 0,0797g de MOPS e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL com auxílio de água deionizada. Em seguida, transferiu-se a solução para um béquer, adicionaram-se algumas gotas de solução de hidróxido de lítio 2 mol/L à solução, agitou-se e mediu o pH. A adição de hidróxido de lítio à solução foi feita até se obter solução de pH 7,6. Por fim, completou-se o volume com água para 10 mL finais de solução.

2.5 Condições para os experimentos de eletroforese capilar

Todas as amostras foram injetadas hidrodinamicamente no equipamento por 5 segundos. Para todas as corridas eletroforética, aplicou-se potencial de 30 kV e manteve-se o equipamento a 25°C durante todo o tempo de análise. Em todos os experimentos realizados neste trabalho, utilizou-se capilar de sílica de 50 µm de diâmetro interno. Devido a eventuais trocas de capilares, o comprimento utilizado podia variar de um experimento para outro. As amostras foram injetadas em quintuplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1 Uma análise do modelo analítico para a detecção condutométrica

A Equação 8 representa a variação de condutividade no ponto de detecção para uma dada concentração do analito. A primeira derivada desta função em relação à concentração será, portanto, a sensibilidade:

$$\frac{d\Delta\kappa}{dc_a} = \frac{(\mu_a - \mu_s) \cdot (\mu_a + \mu_o)}{\mu_a} \cdot \frac{F}{10^{-3}K} \quad (9)$$

Para fins de análise do comportamento da detecção, passa a ser mais conveniente definirmos a sensibilidade padronizada (S) de acordo com

$$S = g \frac{10^{-3}K \cdot d\Delta\kappa}{F \cdot dc_a} = g \frac{(\mu_a - \mu_s) \cdot (\mu_a + \mu_o)}{\mu_a} \quad (10)$$

onde g é uma constante de proporcionalidade que dependerá da calibração do detector.

Esta equação pode ser expandida para

$$S(\mu_a) = g \cdot \mu_a + g \cdot (\mu_o - \mu_s) - g \cdot \frac{(\mu_s \cdot \mu_o)}{\mu_a} \quad (11)$$

Como, para um determinado BGE, as mobilidades de seus íons componentes são constantes, podemos definir duas constantes m e p , sendo:

$$m = g \cdot (\mu_o - \mu_s) \quad (12)$$

$$p = -g \cdot (\mu_s \cdot \mu_o) \quad (13)$$

Logo,

$$S(\mu_a) = g \cdot \mu_a + \frac{p}{\mu_a} + m \quad (14)$$

Uma rápida análise mostra que m é um número real, podendo ser inclusive zero, e p é um real positivo diferente de zero. Sendo S função de $1/\mu_a$, haverá uma descontinuidade quando a mobilidade do analito for zero. Com exceção deste valor – o qual, de fato, não possui interesse em eletroforese, já que a espécie seria neutra –, a função $S(\mu_a)$ será infinitamente derivável, o que permitiria ser localmente expandida em série de Taylor. Portanto, $S(\mu_a)$ é uma função analítica e suave.

Considerando a expansão da série de Taylor apenas para o entorno da mobilidade do analito, teremos uma boa aproximação considerando apenas os dois primeiros termos:

$$S(\mu) = g \cdot \mu_a + \frac{p}{\mu_a} + m + \left(g - \frac{p}{\mu_a^2}\right)(\mu - \mu_a) \quad (15)$$

Substituindo os primeiro e segundo termos por q e w , temos:

$$q = g \cdot \mu_a + \frac{p}{\mu_a} + m \quad (16)$$

$$w = \left(g - \frac{p}{\mu_a^2}\right) \quad (17)$$

Portanto,

$$S(\mu) = q + w(\mu - \mu_a) \quad (18)$$

sendo q e w constantes. Esta equação é de primeira ordem em relação à mobilidade μ . Assim, a sensibilidade do detector condutométrico não é constante para todos os possíveis analitos, mas possui um comportamento linear em um pequeno intervalo de mobilidades em torno da mobilidade do analito.

Esta observação é bastante relevante, pois permite vislumbrar uma técnica de calibração que prescindiria não apenas do analito em favor de uma espécie padrão de mesma mobilidade, mas que permitiria calibrar o detector utilizando um conjunto de espécies com mobilidades próximas à do analito, obtendo a sensibilidade desejada por interpolação.

Vale lembrar que todas estas considerações são válidas para o caso específico ao qual a Equação 8 se aplica, isto é, espécies totalmente dissociadas e monovalentes. Como a obtenção de soluções analíticas para outros casos não são triviais, passamos a considerar a demonstração do comportamento geral a partir de simulações e de experimentos apropriados.

As simulações foram realizadas utilizando-se o software PeakMaster 5.3 (PEAKMASTER, 2000), sendo uma ferramenta de grande auxílio aos usuários de CE. Como não é possível obter os valores de sensibilidade dos analitos por meio das simulações, optou-se em utilizar a área dos picos na demonstração.

3.2 Resultados obtidos por meio das simulações realizadas pelo PeakMaster

O propósito das simulações é estudar o comportamento de espécies com condições diferentes das propostas pela Equação 8. Para essas previsões, criou-se espécies hipotéticas de diferentes mobilidades e de valores iguais de pK_a , analisando-as em BGEs hipotéticos de diferentes valores de pH. As condições avaliadas envolvem diferentes porcentagens de ionização bem como a análise de espécies com mono, duplas e triplas cargas. Todas as simulações foram feitas com EOF de 7 minutos.

3.2.1 Analitos com um grupo protonável

A série de analitos com um grupo protonável compreende os grupos de aminas alifáticas e de ácidos carboxílicos hipotéticos. Cada grupo apresenta 15 espécies.

3.2.1.1 Co-íon parcialmente dissociado

A ideia neste tópico foi modificar o grau de ionização do co-íon e do contra-íon, mantendo-os em 50% e 100%, respectivamente, sendo condições não abordadas pela Equação 8. Para os analitos o grau de ionização é variável, sendo dependente do valor de pH no qual estão sendo analisados. As condições para as simulações encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com um grupo protonável e co-íon parcialmente ionizado

Espécie	Analitos	Análise de ânions		Análise de cátions		
		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	
pK_a^1	4,7	3,7	5,7	2,7	4,7	
			7,7	-	-	
		4,7	6,7	3,7	5,7	
Grau de ionização \ α	Variável	50%	100%	50%	100%	
	2	25	50			
	5	30	55			
	Mobilidade iônica \ Ti	10	35	60	Fixado em 24,0	51,9 (Na ⁺)
		15	40	70	Fixado em 24,0	79,1 (Cl ⁻)
20	45	80				
Mobilidade efetiva \ Ti	Variável	12,0	51,9 (Na ⁺)	12,0	79,1 (Cl ⁻)	
Concentração \ mmol.L⁻¹	-	20	10	20	10	

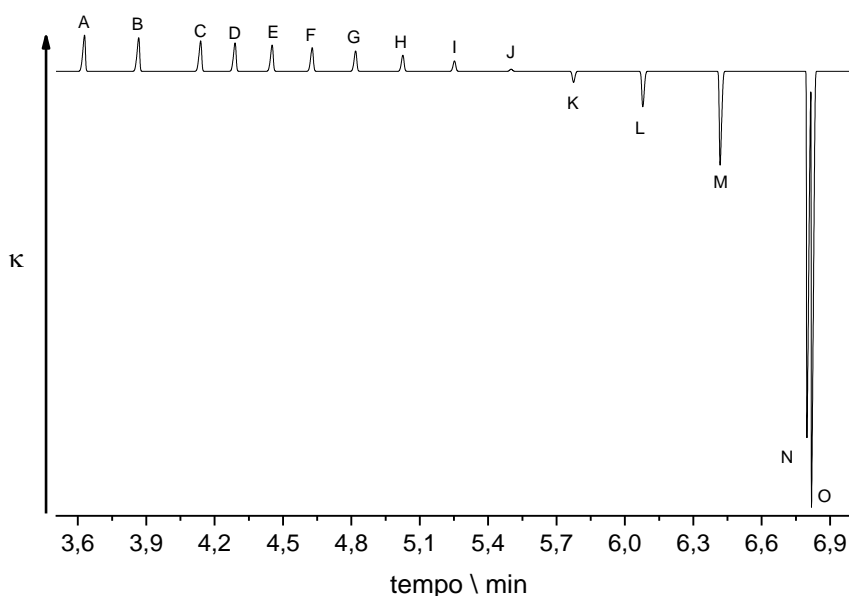
¹O valor de pH das soluções hipotéticas é igual ao valor de pK_a do ácido hipotético.

Em todas as simulações nas quais o co-íon estiver parcialmente ionizado, será adotada a porcentagem de 50% e para o contra-íon, 100%.

a) Ânions

Um eletroferograma típico para os ácidos carboxílicos é visualizado na Figura 5, representando as espécies com 50% de ionização.

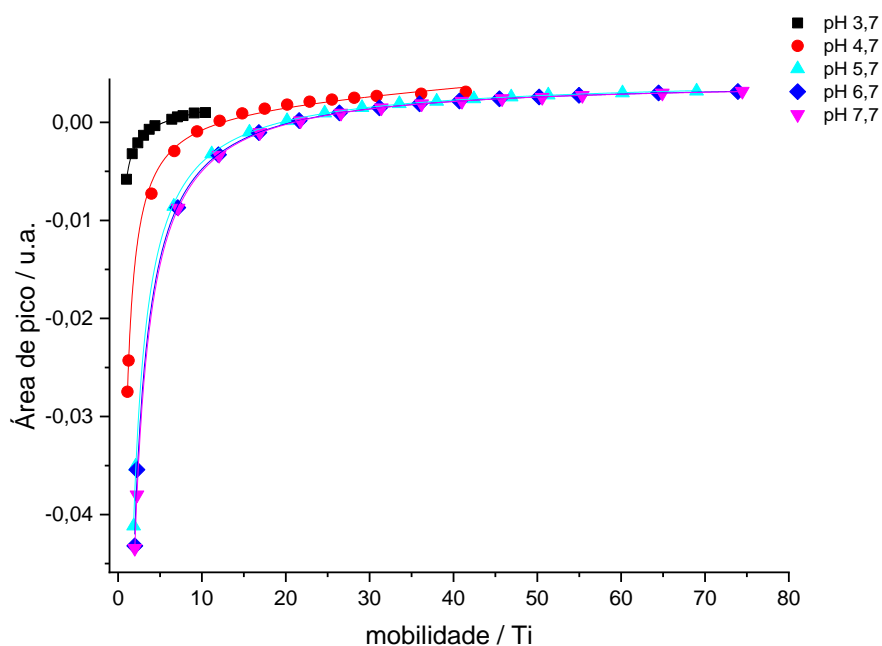
Figura 5. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 4,7, com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do ânion de A: 40, B: 35, C: 30, D: 27,5, E: 25, F: 22,5, G: 20, H: 17,5, I: 15, J: 12,5, K: 10, L: 7,5, M: 5, N: 2,5, O: 1 Ti. Potencial: -30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.



Como pode ser visto na Figura 5, há picos negativos e positivos. Para o analito de maior mobilidade efetiva (40 Ti, representado por A), o sinal é máximo, decaindo para os demais analitos até 12,5 Ti (representado por J). A partir deste analito, os picos passam a ser negativos com intensidade crescente até 1 Ti (representado por O). Este comportamento é previsto pela Equação 8. Portanto, confirma-se a tendência de que o sinal obtido pelo detector condutométrico ser dependente das mobilidades presentes no sistema. Ao calcular a área de

cada pico e colocando-as em função de suas respectivas mobilidades efetivas, observa-se o seguinte perfil, mostrado na Figura 6.

Figura 6. Curvas de área de pico de ânions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mas o contra-íon apresenta-se totalmente dissociado.



Ao ajustar o conjunto de pontos da Figura 6 à Equação 14 obtêm-se os valores para os parâmetros descritos na Tabela 2.

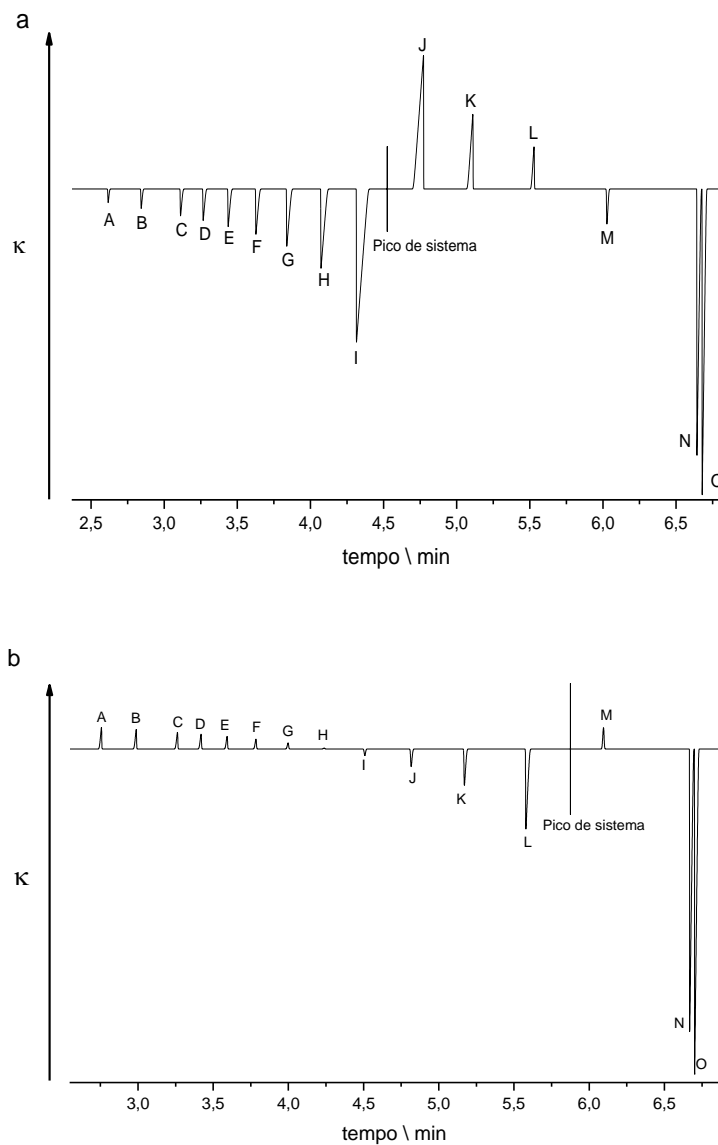
Tabela 2. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 6

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-4}$	R ²
3,7	$1,2 \pm 0,2$	65 ± 2	5 ± 2	0,99795
4,7	$0,6 \pm 0,1$	330 ± 6	19 ± 3	0,99828
5,7	$0,03 \pm 0,04$	832 ± 5	42 ± 2	0,99977
6,7	$-0,01 \pm 0,08$	922 ± 12	45 ± 4	0,99886
7,7	$-0,03 \pm 0,01$	960 ± 1	46 ± 1	1,0000

b) Cátions

O perfil dos eletroferogramas apresentados para esse sistema é similar à análise de ânions, ou seja, apresentam-se picos negativos e positivos ao longo da faixa de mobilidade analisada. Uma peculiaridade relacionada às simulações realizadas em pH 2,7 e 3,7 é o aparecimento de picos de sistema na região de migração dos cátions (GAS et al., 2007). Para valores de pH maiores, tais como 4,7 e 5,7, o pico de sistema desaparece de região de interesse. O fenômeno pode ser explicado pela composição do BGE escolhido, bem como o valor de pH em que a análise é realizada, valor de pK_a e mobilidades dos constituintes do BGE. Na Figura 7, encontra-se o eletroferograma que ilustra esse comportamento.

Figura 7. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 2,7 (a) e pH 3,7 (b), com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do cátion de A a O, respectivamente: (a) 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 2 Ti; (b) 68, 60, 51, 46, 42, 37, 33, 29, 24, 20, 15, 11, 6, 2 e 1 Ti. Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.



Como pode ser visto na Figura 7a, o pico de sistema aparece entre os picos representados por *I* e *J*, resultando na inversão dos picos; de acordo com a Equação 8, os picos de *A* a *J* deveriam ser positivos, visto que as mobilidades desses analitos são superiores à mobilidade do co-íon. Por conta disso, pode se visualizar a dependência do sinal com a mobilidade em duas regiões do eletroferograma apresentado: faixa que compreende os analitos de *A* a *I* e *J* a *O*. Já para a Figura 7b, o pico de sistema aparece entre os picos

representados por *L* e *M*, porém, dessa vez, invertendo apenas o pico *M*. Na Figura 8 encontram-se as curvas obtidas de área de pico em função das mobilidades efetivas dos analitos e, na Tabela 3, os valores dos parâmetros obtidos pelo ajuste do conjunto de pontos à Equação 14.

Figura 8. Curvas de área de pico de cátions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do cátion no BGE é modificada, mas o contra-íon apresenta-se totalmente dissociado.

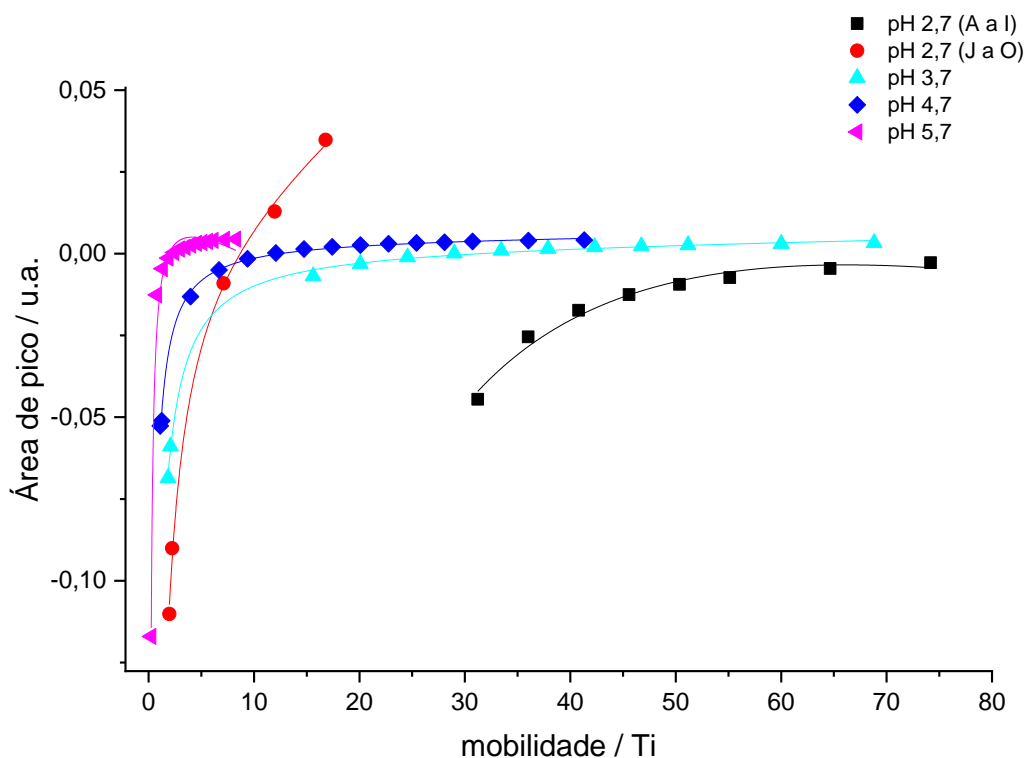


Tabela 3. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 8

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-2}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-2}$	R ²
2,7 (A a I)	$-9,9 \pm 2,3$	430 ± 50	13 ± 2	0,9813
2,7 (J a O)	25 ± 7	23 ± 2	$0,5 \pm 1,1$	0,99827
3,7	$0,5 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	0,99878
4,7	$0,3 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	0,99668
5,7	-19 ± 6	$3,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$	0,9878

3.2.1.2 Contra-íon parcialmente dissociado

O item segue a mesma lógica da seção 3.2.1.1: o grau de ionização do co-íon e contra-íon foram mantidos em 100% e 50%, respectivamente. Para os analitos, o grau de ionização é variável sendo dependente do valor de pH. As condições para as simulações encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com um grupo protonável e contra-íon parcialmente ionizado

Espécie	Analitos	Análise de ânions		Análise de cátions	
		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>
pK_a^1	4,7	-	3,7 5,7 4,7 6,7 7,7	-	2,7 4,7 3,7 5,7
Grau de ionização \ α	Variável	100%	50%	100%	50%
	2 25 50				
	5 30 55				
Mobilidade iônica \ Ti	10 35 60	79,1 (Cl ⁻)	Fixado em 24,0	51,9 (Na ⁺)	Fixado em 24,0
	15 40 70				
	20 45 80				
Mobilidade efetiva \ Ti	Variável	79,1 (Cl ⁻)	12,0	51,9 (Na ⁺)	12,0
Concentração \ mmol.L⁻¹	-	10	20	10	20

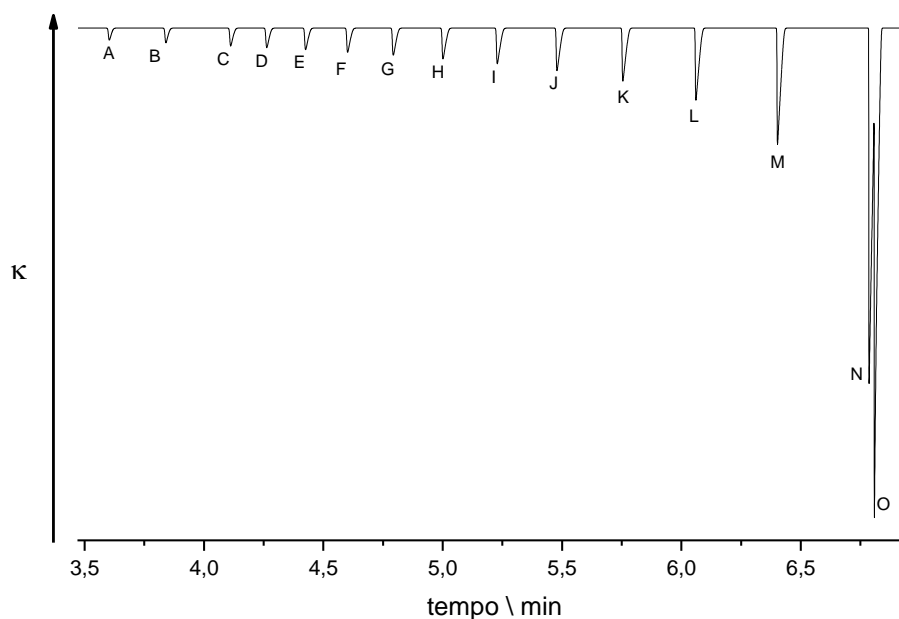
¹O valor de pH das soluções hipotéticas é igual ao valor de pK_a do ácido hipotético.

Em todas as simulações nas quais o contra-íon estiver parcialmente ionizado, será adotada a porcentagem de 50% e para o co-íon, 100%.

a) Ânions

Um eletroferograma típico desta simulação é apresentado na Figura 9.

Figura 9. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 4,7, com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do ânion de A: 40, B: 35, C: 30, D: 27,5, E: 25, F: 22,5, G: 20, H: 17,5, I: 15, J: 12,5, K: 10, L: 7,5, M: 5, N: 2,5, O: 1 Ti. Potencial: -30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.



Diferentemente da Figura 5, em que é possível visualizar picos positivos e negativos no eletroferograma, visualiza-se apenas picos negativos na Figura 9, sendo o mesmo perfil encontrado para as demais simulações. Isto é justificado pelo valor de mobilidade efetiva do cloreto (79,1 Ti) ser maior que as mobilidades dos analitos presentes. O analito de maior mobilidade efetiva (representado pela letra A, 40 Ti) apresenta sinal menos intenso, enquanto que o analito de menor mobilidade (representado pela letra O, 1 Ti) apresenta sinal mais intenso, sendo ambos os comportamentos previstos pela Equação 8. Ao plotar a área de cada pico em função das mobilidades, observa-se o perfil apresentado na Figura 10. Os valores para os parâmetros encontram-se na Tabela 5.

Figura 10. Curvas de área de pico de ânions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mas o co-íon apresenta-se totalmente dissociado.

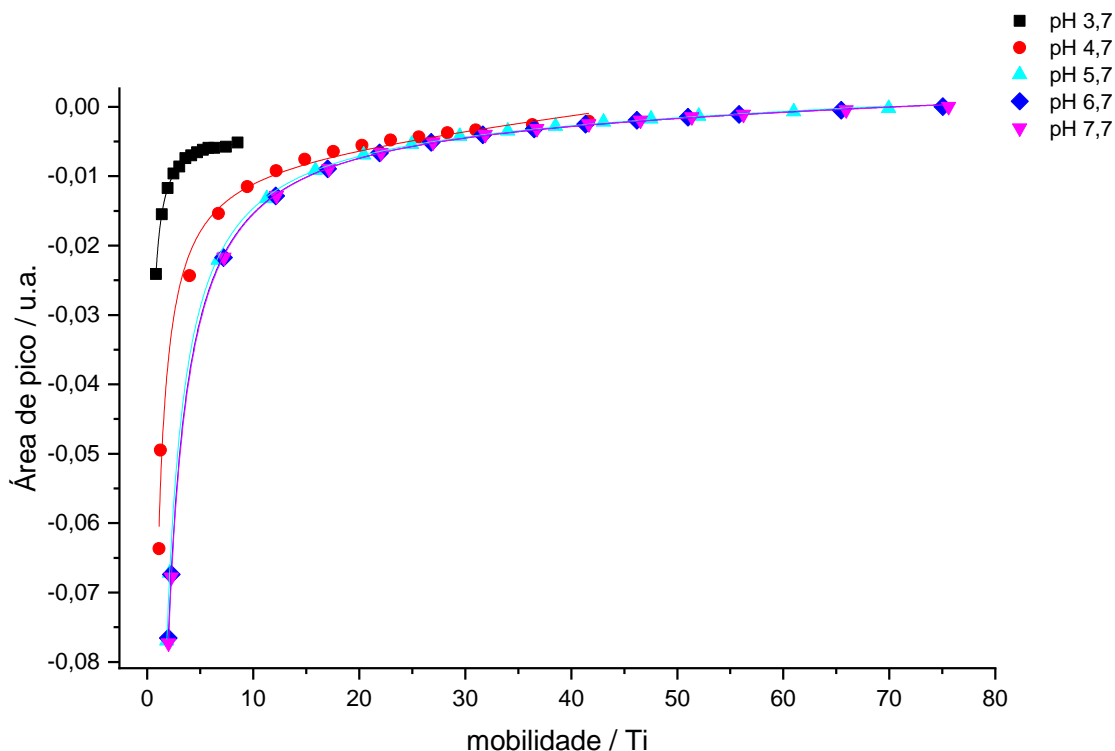


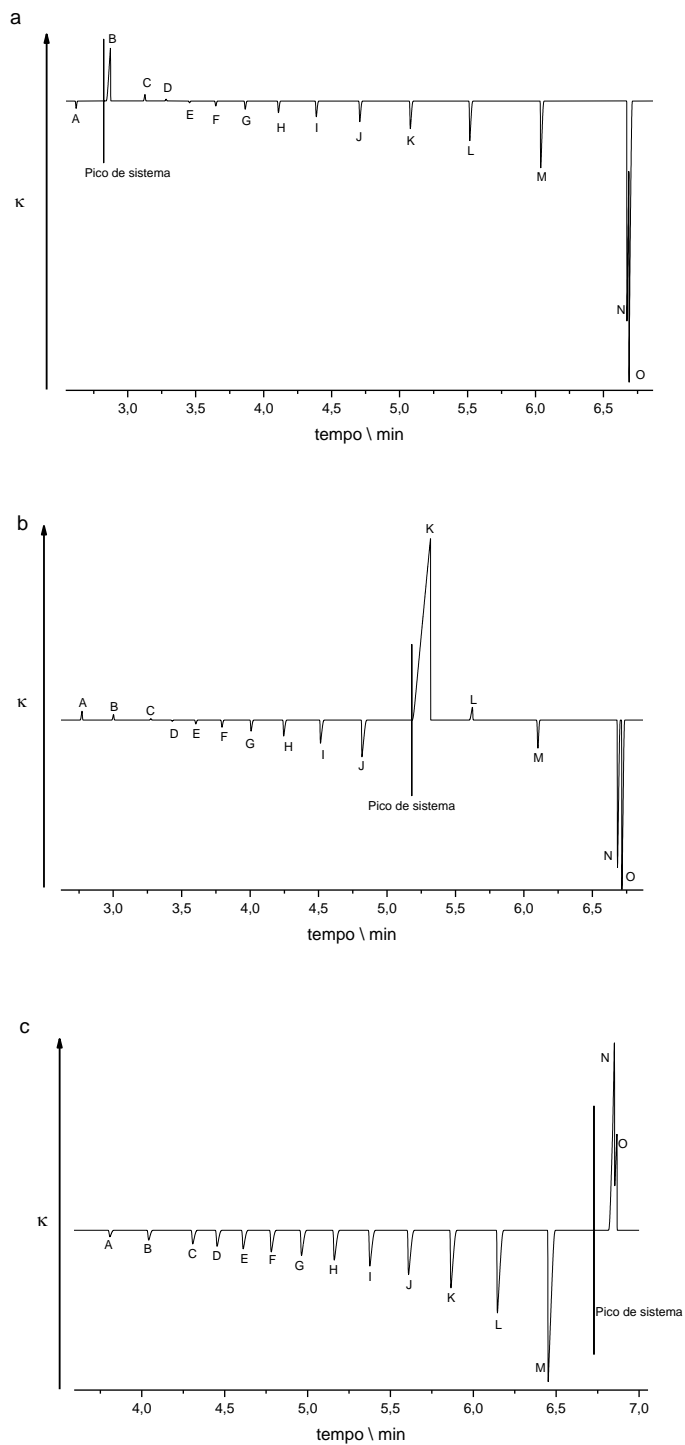
Tabela 5. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 10

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R ²
3,7	$-1,2 \pm 0,3$	$17,8 \pm 0,2$	$-2,3 \pm 0,2$	0,99939
4,7	$1,8 \pm 0,6$	59 ± 2	-7 ± 1	0,99034
5,7	$0,45 \pm 0,04$	$140,2 \pm 0,5$	$-1,1 \pm 0,2$	0,99991
6,7	$0,40 \pm 0,03$	$150,8 \pm 0,4$	$-0,7 \pm 0,1$	0,99995
7,7	$0,38 \pm 0,03$	$153,5 \pm 0,4$	$-0,5 \pm 0,1$	0,99996

b) Cátions

O eletroferograma para esta simulação é visualizada na Figura 11.

Figura 11. Eletroferograma para a simulação realizada em BGE com pH 2,7 (a), pH 3,7 (b) e pH 4,7 (c), com analitos de pK_a 4,7 e mobilidades efetivas do cátion de A a O, respectivamente: (a) 80, 70, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 2 Ti; (b) 68, 60, 51, 46, 42, 37, 33, 29, 24, 20, 15, 11, 6, 2 e 1 Ti; (c) 40, 35, 30, 27,5, 25, 22,5, 20, 17,5, 15, 12,5, 10, 7,5, 5, 2,5 e 1 Ti. Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 70 cm, respectivamente.



Assim como foi relatado na seção 3.2.1.1.b para os cátions, nessas simulações também há o aparecimento do pico de sistema na região de migração dos analitos para os valores de pH 2,7, 3,7 e 4,7.

Na figura 12, encontram-se as curvas de área de pico dos analitos em função de suas respectivas mobilidades e, na Tabela 6, os valores para os parâmetros ajustados.

Figura 12. Curvas de área de pico de cátions monovalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do cátion no BGE é modificada, mas o co-íon apresenta-se totalmente dissociado.

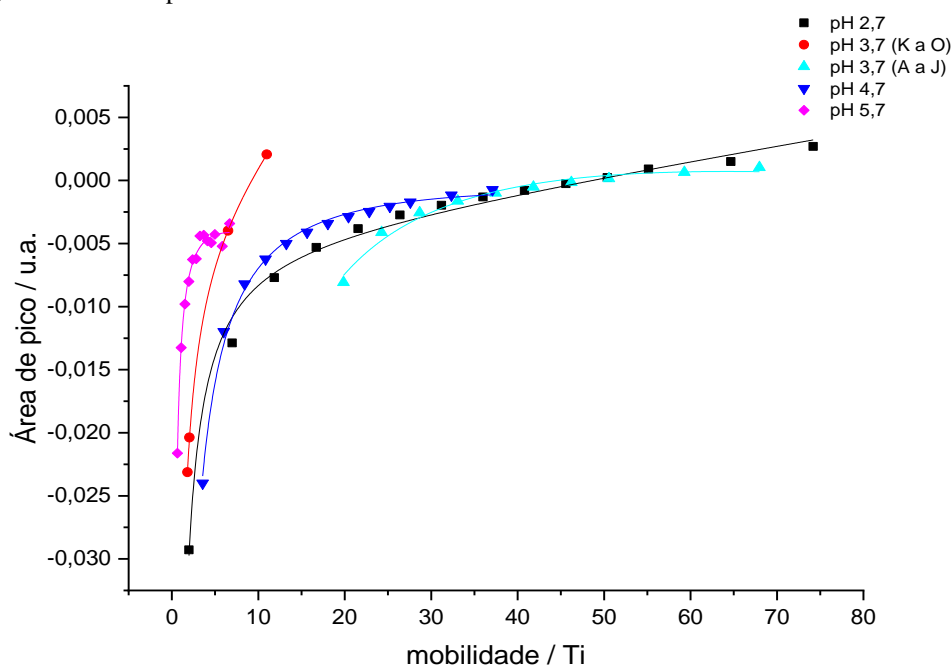


Tabela 6. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 12

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-4}$	R ²
2,7	$1,12 \pm 0,12$	504 ± 20	-44 ± 6	0,99277
3,7 (K a O)	$8,09 \pm 0,71$	382 ± 13	-33 ± 8	0,99993
3,7 (A a J)	$-0,83 \pm 0,25$	3430 ± 345	114 ± 20	0,98237
4,7	$-0,34 \pm 0,22$	924 ± 31	26 ± 6	0,99561
5,7	-3 ± 2	138 ± 7	$-0,85 \pm 8,04$	0,9891

3.2.2 Analitos com dois grupos protonáveis

A série de analitos com dois grupos protonáveis compreende os grupos de amins alifáticas e de ácidos carboxílicos hipotéticos. Cada grupo apresenta 12 espécies.

3.2.2.1 Co-íon parcialmente ionizado

As condições para as simulações encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com dois grupos protonáveis e co-íon parcialmente ionizado

Espécie	Analitos			Análise de ânions			Análise de cátions			
				<u>Co-íon</u>		<u>Contra-íon</u>	<u>Co-íon</u>		<u>Contra-íon</u>	
pK_a^1	4,7			3,7	6,7			2,7	5,7	
	7,7			4,7	7,7	9,7	-	3,7	6,7	-
				5,7	8,7			4,7	8,7	
Grau de ionização \ α	Variável			50%		100%	50%		100%	
Mobilidade iônica \ Ti	μ_1			μ_2			Fixado em 24,0	51,9 (Na ⁺)	Fixado em 24,0	79,1 (Cl ⁻)
	5	25	45	20	40	60				
	10	30	50	25	45	65				
	15	35	55	30	50	70				
	20	40	60	35	55	75				
Mobilidade efetiva \ Ti	Variável			12,0			51,9 (Na ⁺)	12,0		79,1 (Cl ⁻)
Concentração \ mmol.L⁻¹	-			20			10	20		10

¹O valor de pH das soluções hipotéticas é igual ao valor de pK_a do ácido hipotético.

a) Ânions

Na Figura 13 encontram-se os gráficos de área de pico em função das respectivas mobilidades efetivas dos analitos e na Tabela 8, os valores dos parâmetros obtidos por meio do ajuste à Equação 14. Os eletroferogramas para as análises foram omitidos por apresentarem o mesmo perfil dos eletroferogramas apresentados anteriormente.

Figura 13. Curvas de área de pico de ânions divalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado.

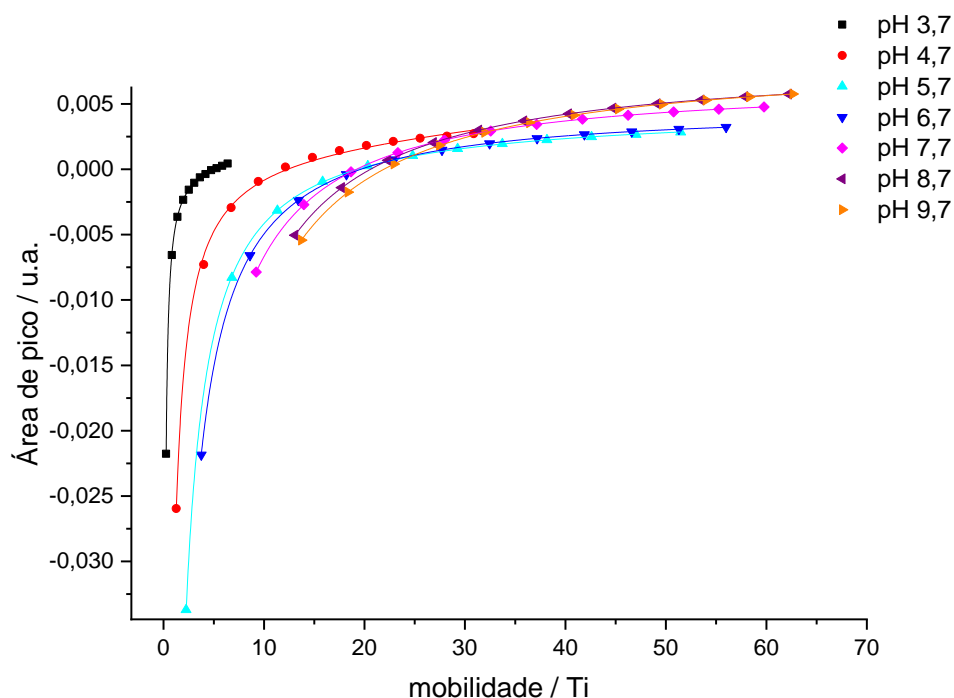


Tabela 8. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 13

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-4}$	R ²
3,7	$1,76 \pm 0,09$	$5,69 \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,4$	0,99996
4,7	$0,69 \pm 0,13$	$35,7 \pm 0,6$	20 ± 3	0,99879
5,7	$0,02 \pm 0,01$	$85,74 \pm 0,15$	$43,9 \pm 0,4$	0,99999

(continua)

(conclusão)

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-4}$	R ²
6,7	-0,042 ± 0,003	101,65 ± 0,07	52,6 ± 0,1	1,00000
7,7	-0,046 ± 0,003	140,1 ± 0,2	73,8 ± 0,2	1,00000
8,7	-0,037 ± 0,003	181,7 ± 0,3	89,0 ± 0,2	1,00000
9,7	-0,041 ± 0,004	199,9 ± 0,4	92,0 ± 0,3	1,00000

b) Cátions

Na Figura 14 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas dos analitos e na Tabela 9, os parâmetros obtidos por meio do ajuste dos pontos à Equação 14. O perfil da curva para o pH 2,7 é diferente dos demais devido ao surgimento de um pico de sistema no eletroferograma, invertendo a ordem dos três últimos picos de menor mobilidade, justificando também a presença de apenas oito pontos na curva. Esse resultado é semelhante ao que foi relatado na seção 3.2.1.1.b.

Figura 14. Curvas de área de pico de cátions divalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado.

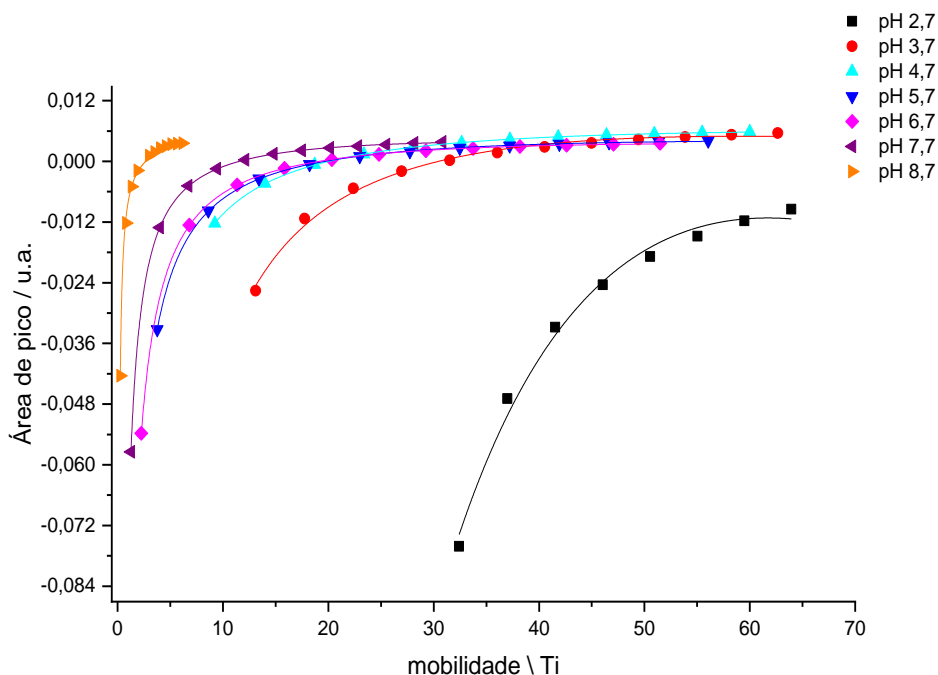


Tabela 9. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 14

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R ²
2,7	$-23,7 \pm 4,3$	9010 ± 904	$280,9 \pm 40,3$	0,99171
3,7	$-1,80 \pm 0,32$	637 ± 29	$26,4 \pm 2,1$	0,99477
4,7	$-0,34 \pm 0,02$	215 ± 1	$11,4 \pm 0,1$	0,99993
5,7	$-0,33 \pm 0,02$	$156,6 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,1$	0,99995
6,7	$-0,34 \pm 0,02$	$138,5 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,1$	0,99998
7,7	$-0,38 \pm 0,03$	$81,9 \pm 0,1$	$7,54 \pm 0,07$	0,99999
8,7	5 ± 1	$11,5 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,6$	0,99853

3.2.2.2 Contra-íon parcialmente ionizado

As condições para as simulações encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com dois grupos protonáveis e contra-íon parcialmente ionizado

Espécie	Analitos	Análise de ânions			Análise de cátions	
		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>
pK_a^1	4,7		3,7	6,7		2,7 5,7
	7,7	-	4,7	7,7 9,7	-	3,7 6,7
			5,7	8,7		4,7 8,7
Grau de ionização \ α	Variável	100%	50%	100%	50%	
Mobilidade iônica \ Ti	μ_1	μ_2				
	5 25 45	20 40 60				
	10 30 50	25 45 65	79,1 (Cl ⁻)	Fixado em 24,0	51,9 (Na ⁺)	Fixado em 24,0
	15 35 55	30 50 70				
	20 40 60	35 55 75				
Mobilidade efetiva \ Ti	Variável	79,1 (Cl ⁻)	12,0	51,9 (Na ⁺)	12,0	
Concentração \ mmol.L⁻¹	-	10	20	10	20	

¹O valor de pH das soluções hipotéticas é igual ao valor de pK_a do ácido hipotético.

a) Ânions

Na Figura 15 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas e na Tabela 11, os parâmetros obtidos para o ajuste dos pontos à Equação 14.

Figura 15. Curvas de área de pico de ânions divalentes com dois grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado.

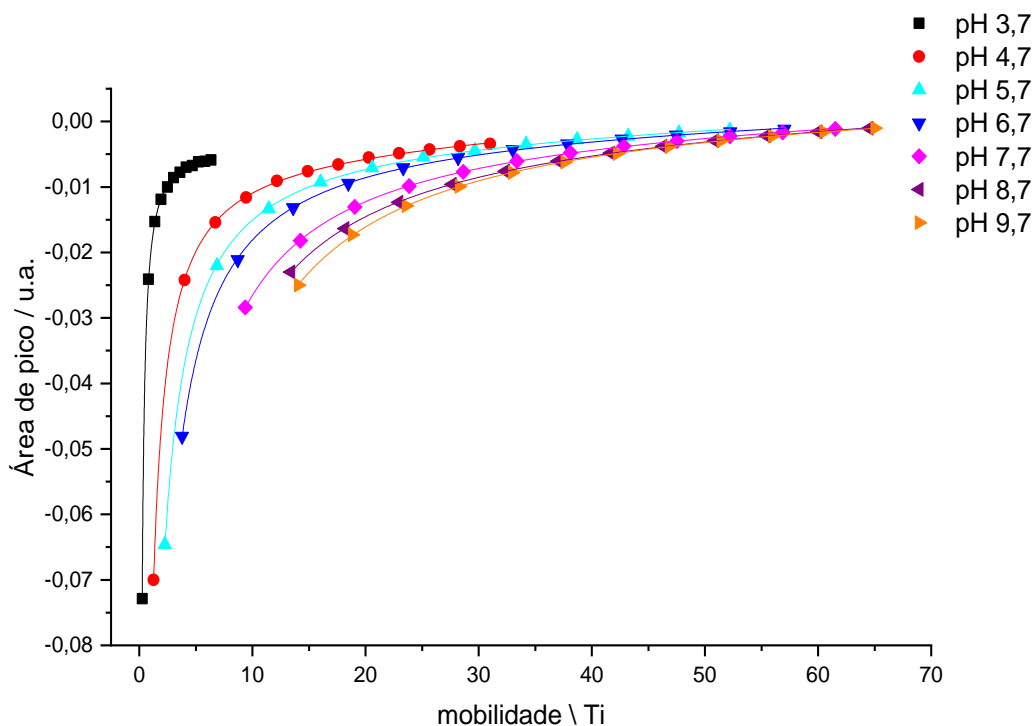


Tabela 11. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 15

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-4}$	R ²
3,7	$-1,5 \pm 0,4$	$18,09 \pm 0,07$	-21 ± 2	0,99993
4,7	$0,94 \pm 0,06$	$84,4 \pm 0,3$	-34 ± 1	0,99996
5,7	$0,53 \pm 0,03$	$144,2 \pm 0,5$	-12 ± 1	0,99995
6,7	$0,45 \pm 0,03$	$181,4 \pm 0,8$	-4 ± 1	0,99994
7,7	$0,44 \pm 0,02$	277 ± 1	7 ± 1	0,99995
8,7	$0,48 \pm 0,02$	331 ± 2	11 ± 2	0,99994
9,7	$0,18 \pm 0,02$	411 ± 2	41 ± 2	0,99996

b) Cátions

Na Figura 16 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas e na Tabela 12, os parâmetros obtidos para o ajuste dos pontos à Equação 14.

Figura 16. Curvas de área de pico de cátions divalentes em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado.

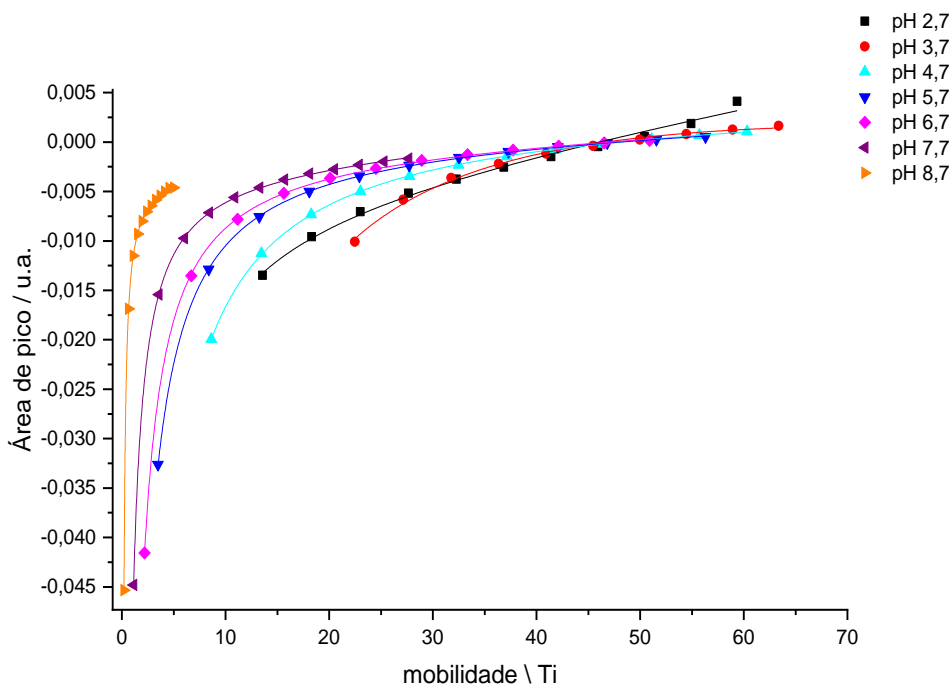


Tabela 12. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 16

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R ²
2,7	$1,9 \pm 0,3$	136 ± 21	$-5,8 \pm 1,6$	0,99341
3,7	$-0,9 \pm 0,2$	517 ± 32	15 ± 2	0,99616
4,7	$0,15 \pm 0,02$	203 ± 1	$3,5 \pm 0,1$	0,99994
5,7	$0,30 \pm 0,01$	$117,8 \pm 0,4$	$0,99 \pm 0,06$	0,99997
6,7	$0,41 \pm 0,03$	$91,2 \pm 0,3$	$-0,00 \pm 0,01$	0,99994
7,7	$0,83 \pm 0,04$	$48,3 \pm 0,1$	$-2,13 \pm 0,07$	0,99996
8,7	$2,7 \pm 0,2$	$8,32 \pm 0,02$	$-4,2 \pm 0,1$	0,99996

3.2.3 Analitos com três grupos protonáveis

A série de analitos com três grupos protonáveis compreende os grupos de aminas alifáticas e de ácidos carboxílicos hipotéticos. Cada grupo apresenta 12 espécies.

3.2.3.1 Co-íon parcialmente ionizado

As condições para as simulações encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com três grupos protonáveis e co-íon parcialmente ionizado

Espécie	Analitos	Análise de ânions		Análise de cátions									
		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>								
pK_a^1	4,7	3,7	8,7	2,7	7,7								
	7,7	4,7	9,7	3,7	8,7								
	9,7	5,7	-	4,7	-								
			10,7		9,7								
			6,7		5,7								
			7,7		10,7								
Grau de ionização \ α	Variável				50%	100%	50%	100%					
	μ_1	5	10	15	20	Fixado em 24,0	51,9 (Na ⁺)	Fixado em 24,0	79,1 (Cl ⁻)				
		25	30	35	40								
		45	50	55	60								
	μ_2	20	25	30	35								
		40	45	50	55								
		60	65	70	75								
	μ_3	30	35	40	45								
		50	55	60	65								
		70	75	80	85								
	Mobilidade efetiva \ Ti	Variável								12,0	51,9 (Na ⁺)	12,0	79,1 (Cl ⁻)

(continua)

(conclusão)

Espécie	Analitos	Análise de ânions		Análise de cátions	
		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>
Concentração mmol.L ⁻¹	-	20	10	20	10

¹O valor de pH das soluções hipotéticas é igual ao valor de pK_a do ácido hipotético.

a) Ânions

Na Figura 17 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas dos analitos e na Tabela 14, os parâmetros obtidos por meio do ajuste dos pontos à Equação 14.

Figura 17. Curvas de área de pico de ânions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado.

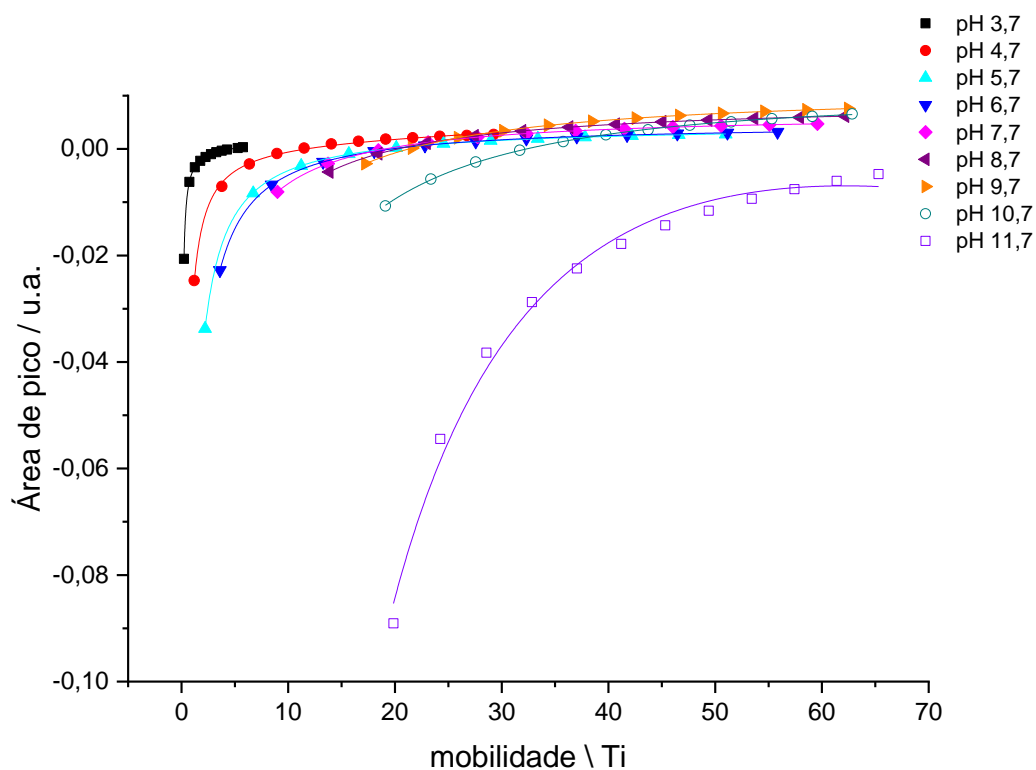


Tabela 14. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 17

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-3}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-4}$	R²
3,7	$1,7 \pm 0,1$	$4,87 \pm 0,02$	$2,7 \pm 0,5$	0,99993
4,7	$0,8 \pm 0,2$	$32,1 \pm 0,6$	18 ± 3	0,99855
5,7	$0,03 \pm 0,02$	$84,3 \pm 0,2$	$43,4 \pm 0,6$	0,99997
6,7	$-0,038 \pm 0,009$	$100,8 \pm 0,2$	$51,9 \pm 0,4$	0,99998
7,7	$-0,047 \pm 0,004$	$137,8 \pm 0,3$	$73,1 \pm 0,2$	0,99999
8,7	$-0,039 \pm 0,008$	$189,8 \pm 0,7$	$94,5 \pm 0,5$	0,99998
9,7	$-0,048 \pm 0,005$	$250,8 \pm 0,6$	$118,8 \pm 0,4$	0,99999
10,7	$-0,46 \pm 0,06$	523 ± 8	176 ± 5	0,99973
11,7	-9 ± 2	3362 ± 218	1012 ± 125	0,99136

b) Cátions

Na Figura 18 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas dos analitos e na Tabela 15, os parâmetros obtidos por meio do ajuste dos pontos à Equação 14. O perfil da curva para o pH 2,7 é diferente dos demais devido ao surgimento a um pico de sistema no eletroferograma, semelhante ao relatado nas seções 3.2.1.1.b e 3.2.2.1.b.

Figura 18. Curvas de área de pico de cátions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o contra-íon totalmente dissociado.

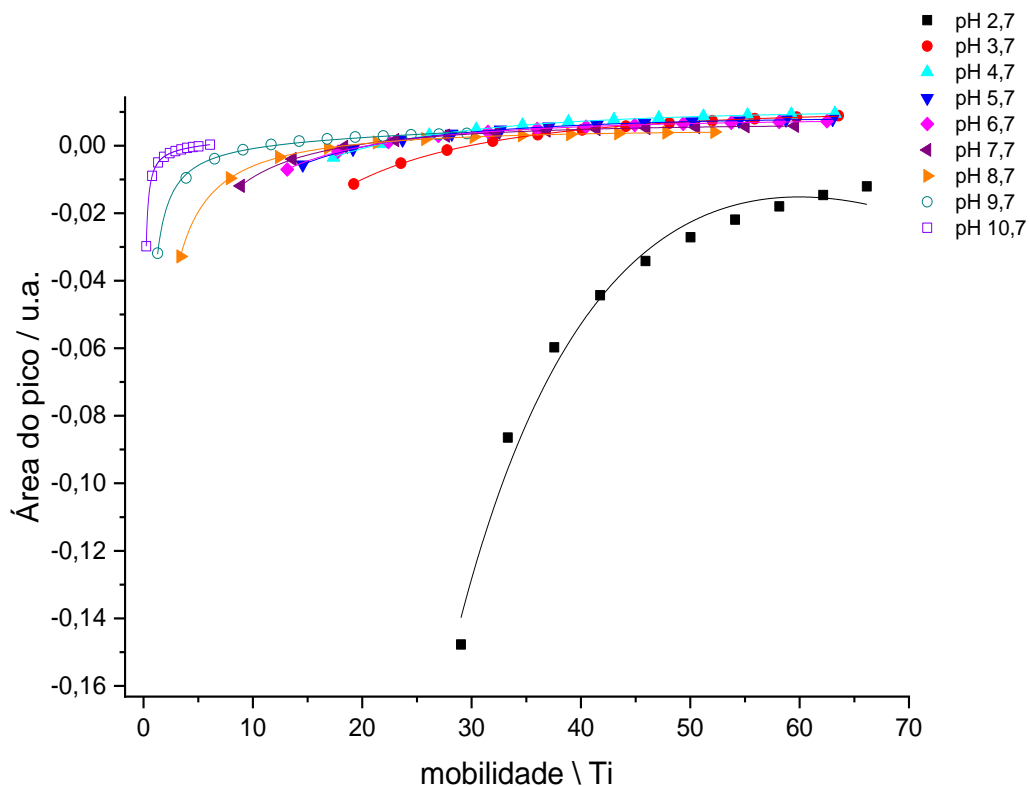


Tabela 15. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 18

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-2}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R ²
2,7	-38 ± 7	1359 ± 141	438 ± 66	0,98346
3,7	$-0,89 \pm 0,08$	66 ± 1	$24,7 \pm 0,6$	0,99967
4,7	$-0,44 \pm 0,02$	$35,8 \pm 0,2$	$17,9 \pm 0,2$	0,99994
5,7	$-0,39 \pm 0,02$	$28,9 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,1$	0,99992
6,7	$-0,36 \pm 0,02$	$26,4 \pm 0,2$	$13,6 \pm 0,2$	0,99989
7,7	$-0,35 \pm 0,03$	$20,3 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,1$	0,9999
8,7	$-0,24 \pm 0,01$	$13,68 \pm 0,02$	$7,87 \pm 0,05$	0,99999
9,7	$1,0 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,5$	0,99794
10,7	$2,0 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,05$	0,99997

3.2.3.2 Contra-íon parcialmente ionizado

As condições para as simulações encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16. Condições das simulações eletroforéticas de analitos com três grupos protonáveis e contra-íon parcialmente ionizado

Espécie	Analitos	Análise de ânions		Análise de cátions		
		<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	<u>Co-íon</u>	<u>Contra-íon</u>	
pK_a^1	4,7		3,7		2,7	
			8,7		7,7	
	7,7		4,7		3,7	
			9,7		8,7	
	9,7	-	5,7	-	4,7	
			10,7		9,7	
		6,7		5,7		
			11,7		10,7	
			7,7		6,7	
Grau de ionização \ α	Variável	100%	50%	100%	50%	
Mobilidade iônica \ Ti	μ_1	5 10 15 20	79,1 (Cl ⁻)	Fixado em 24,0	51,9 (Na ⁺)	Fixado em 24,0
		25 30 35 40				
		45 50 55 60				
	μ_2	20 25 30 35				
		40 45 50 55				
		60 65 70 75				
	μ_3	30 35 40 45				
		50 55 60 65				
		70 75 80 85				
	Mobilidade efetiva \ Ti	Variável				
Concentração \ mmol.L⁻¹	-	10	20	10	20	

¹O valor de pH das soluções hipotéticas é igual ao valor de pK_a do ácido hipotético.

a) Ânions

Na Figura 19 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas dos analitos e na Tabela 17, os parâmetros obtidos por meio do ajuste dos pontos à Equação 14.

Figura 19. Curvas de área de pico de ânions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado.

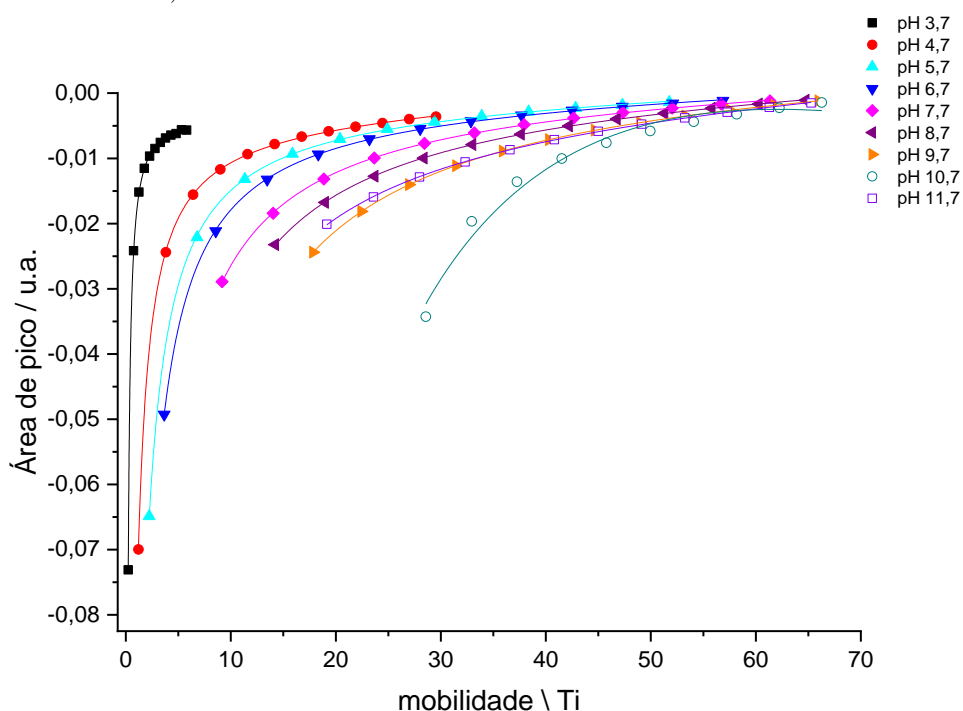


Tabela 17. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 19

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-2}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R ²
3,7	$-1,7 \pm 0,3$	$1,674 \pm 0,005$	$-1,8 \pm 0,1$	0,99995
4,7	$0,97 \pm 0,04$	$7,99 \pm 0,02$	$-3,65 \pm 0,09$	0,99998
5,7	$0,52 \pm 0,03$	$14,27 \pm 0,05$	$-1,17 \pm 0,13$	0,99995
6,7	$0,45 \pm 0,03$	$17,94 \pm 0,07$	$-0,4 \pm 0,1$	0,99995

(continua)

(conclusão)

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-2}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R ²
7,7	0,44 ± 0,02	27,62 ± 0,15	0,7 ± 0,1	0,99995
8,7	0,47 ± 0,03	36,25 ± 0,24	1,5 ± 0,2	0,99995
9,7	0,32 ± 0,01	52,92 ± 0,13	4,71 ± 0,08	0,99999
10,7	-8 ± 1	293 ± 33	92 ± 16	0,98238
11,7	0,84 ± 0,04	40,4 ± 0,5	-0,7 ± 0,3	0,9999

b) Cátions

Na Figura 20 encontram-se os gráficos de área de pico em função das mobilidades efetivas dos analitos e na Tabela 18, os parâmetros obtidos por meio do ajuste dos pontos à Equação 14. O perfil da curva para o pH 2,7 é diferente dos demais devido ao surgimento a um pico de sistema no eletroferograma, semelhante ao relatado nas seções [3.2.1.1.b](#), [3.2.2.1.b](#) e [3.2.3.1.b](#).

Figura 20. Curvas de área de pico de cátions com três grupos protonáveis em função de suas mobilidades para diferentes valores de pH do BGE. Para cada valor de pH, a porcentagem de dissociação do ânion no BGE é modificada, mantendo o co-íon totalmente dissociado.

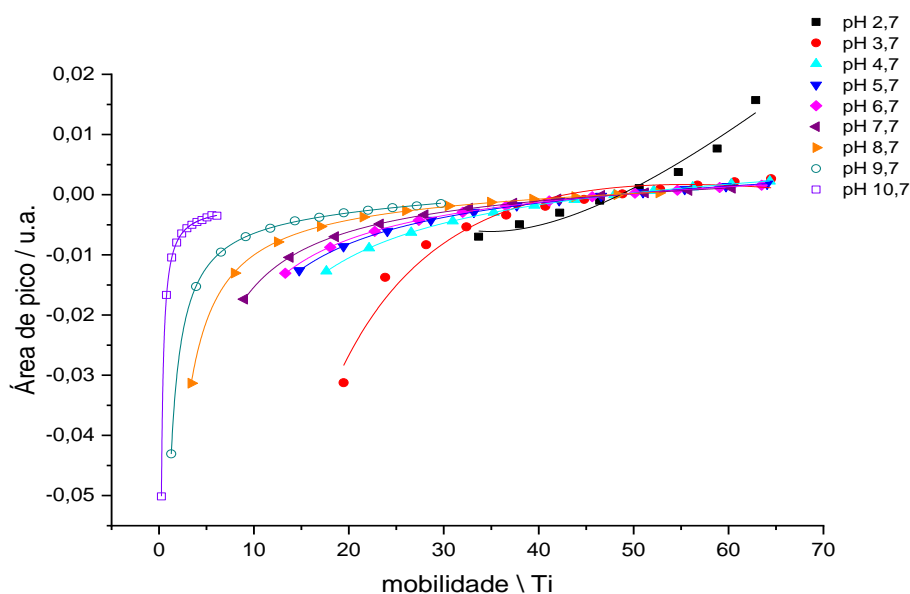


Tabela 18. Valores dos parâmetros obtidos para as curvas da Figura 20

pH	Parâmetro $g \cdot 10^{-4}$	Parâmetro $p \cdot 10^{-2}$	Parâmetro $m \cdot 10^{-3}$	R²
2,7	16 ± 3	-194 ± 71	-117 ± 31	0,96678
3,7	-4 ± 1	139 ± 16	52 ± 9	0,96768
4,7	$0,36 \pm 0,01$	$32,4 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,1$	0,99998
5,7	$0,39 \pm 0,02$	$24,0 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,1$	0,99993
6,7	$0,39 \pm 0,02$	$21,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$	0,9999
7,7	$0,35 \pm 0,02$	$17,7 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	0,99991
8,7	$0,39 \pm 0,03$	$10,82 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,1$	0,99991
9,7	$0,75 \pm 0,04$	$5,32 \pm 0,02$	$-1,86 \pm 0,08$	0,99996
10,7	$-0,2 \pm 0,2$	$1,219 \pm 0,004$	$-1,3 \pm 0,1$	0,99995

3.2.4 Conclusão sobre os resultados obtidos por meio das simulações

Os resultados apresentados pelas figuras e coeficientes de determinação apresentados nas seções de [3.2.1](#), [3.2.2](#) e [3.2.3](#) sugerem que o modelo matemático apresentado na Equação 14, proposto apenas para espécies monovalentes e totalmente dissociadas, possa ser estendido a condições não contempladas por ela, ou seja, quando constituintes do BGE estão parcialmente ionizados e analitos com cargas duplas, triplas e parcialmente ionizadas.

No caso de cátions, para os valores de pH 2,7, notou-se a presença de pico de sistema nos eletroferogramas em todas as simulações; já para as ânions o fenômeno foi observado em apenas uma análise de pH 11,7, com espécies com três grupos protonáveis e co-íon do BGE parcialmente ionizado ([seção 3.2.3.1.a](#)), justificando a diferença no perfil da curva em relação às demais. A presença do pico de sistema nas análises causou mudanças na orientação de alguns picos no eletroferograma, não causando prejuízos ao estudo e a validade do modelo matemático, sendo mantida a relação entre o sinal obtido e a mobilidade efetiva.

Tão importante quanto observar a validade da Equação 14, é notar que a área dos picos varia de forma contínua com a mobilidade dos respectivos analitos. Então, como previsto pela teoria de expansão de série de Taylor descrita anteriormente na [seção 3.1](#), podemos afirmar que a área de um analito pode ser interpolada de forma linear a partir de outras espécies de mobilidades que sejam suficientemente próximas a esse analito.

3.2.5. Limitações do uso do PeakMaster na previsão do comportamento do sistema

Ao considerar o uso do PeakMaster na previsão do comportamento do sistema, não se pode deixar de citar as limitações que o mesmo apresenta, uma vez que se trata de um software de simulação eletroforética baseado em cálculos matemáticos. Como os cálculos utilizados na construção do software descrevem o comportamento dos analitos no processo de separação por migração, justifica-se seu uso no presente trabalho. Porém, por apresentar base puramente matemática, ele não consegue prever todo o comportamento dos componentes do sistema do ponto de vista químico. Dentre os possíveis comportamentos que ele não leva em consideração, pode-se citar as interações entre o analito e a superfície interna da coluna capilar ou entre o analito e o revestimento interno da coluna capilar (quando se utiliza outros tipos de capilares), adição de surfactantes ou complexantes ao BGE, uso de inversores de EOF, estabilidade dos componentes do BGE ou analitos, entre outras condições utilizadas em CE. Portanto, justifica-se a investigação do estudo em análises reais, comparando-os com os resultados obtidos por simulação.

3.3 Resultados obtidos por análises reais

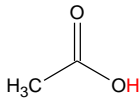
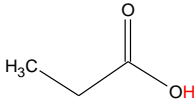
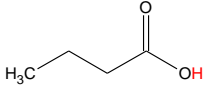
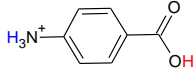
3.3.1 A importância da escolha da composição do BGE

Em geral, os BGEs são soluções tampão que tem como objetivo compensar variações de pH causadas por processos redox nos eletrodos do sistema de eletroforese, ou mesmo por componentes da amostra. Estas possíveis variações de pH podem causar flutuações no tempo de migração das espécies e, no caso da detecção condutométrica, flutuações de linha base. No entanto, nem todos os BGEs usuais para CE-C⁴D são soluções tampão. Assim, a ideia foi avaliar alguns tipos usuais de BGE e como se comportam classes de analitos de acordo com a carga efetiva.

3.3.2 Ácidos monocarboxílicos em NaHCO₃

A série de ácidos carboxílicos compreende espécies negativas com cargas monovalentes (A⁻). Os analitos utilizados nesta série, juntamente com seus respectivos valores de pK_a, estão representados na Tabela 19.

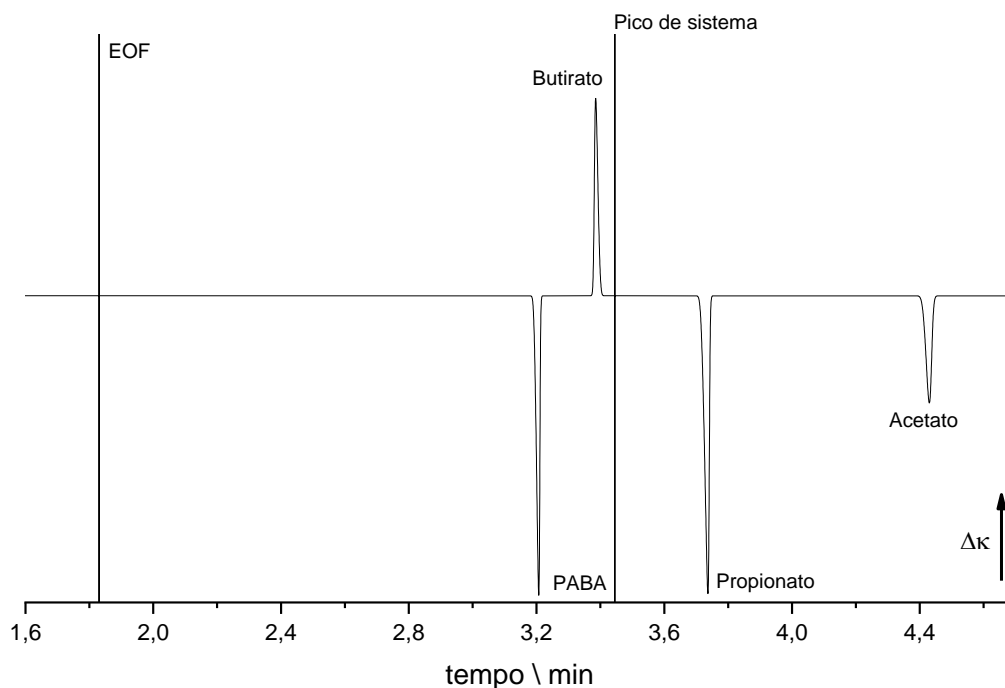
Tabela 19. Estruturas e valores de pK_a dos ácidos carboxílicos utilizados no experimento

Estrutura	Nome	pK _a ¹
	Ácido acético	4,54
	Ácido propiônico	4,75
	Ácido butírico	4,91
	PABA	2,69 e 4,77

¹Valores obtidos pelo chemicalize.com (CHEMICALIZE, 1998).

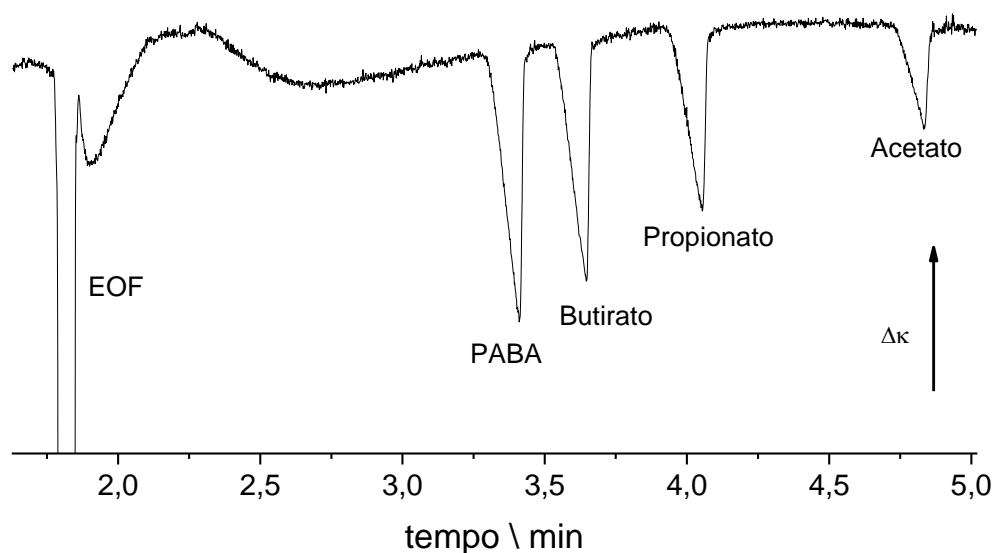
Como o pH do BGE de NaHCO_3 10 mmol/L é 8,3, todas as espécies estão como ânions monovalentes totalmente ionizados. De acordo com a previsão realizada pelo PeakMaster, neste pH as espécies H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} estão as concentrações de, respectivamente, 0,11, 9,78 e 0,11 mmol/L, mostrando que aproximadamente 98% estaria na forma de bicarbonato. Assim, este seria um caso aproximado de analitos e co-íon monovalentes e totalmente ionizados. Ao realizar uma simulação desses ânions no BGE descrito, chega-se ao eletroferograma mostrado na Figura 21. Como a simulação foi realizada no contra EOF, PABA – o mais volumoso dos ânions – é o de menor tempo de migração.

Figura 21. Eletroferograma obtido por meio da simulação pelo PeakMaster da série de ácidos monocarboxílicos utilizando como BGE NaHCO_3 10 mmol/L (pH 8,3). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 52 cm e 42 cm, respectivamente.



Como pode ser visto na Figura 21, verifica-se a presença de um pico de sistema em 3,4 minutos que faz a inversão do pico de butirato. Ao realizar a análise correspondente à simulação obtém-se o eletroferograma mostrado na Figura 22.

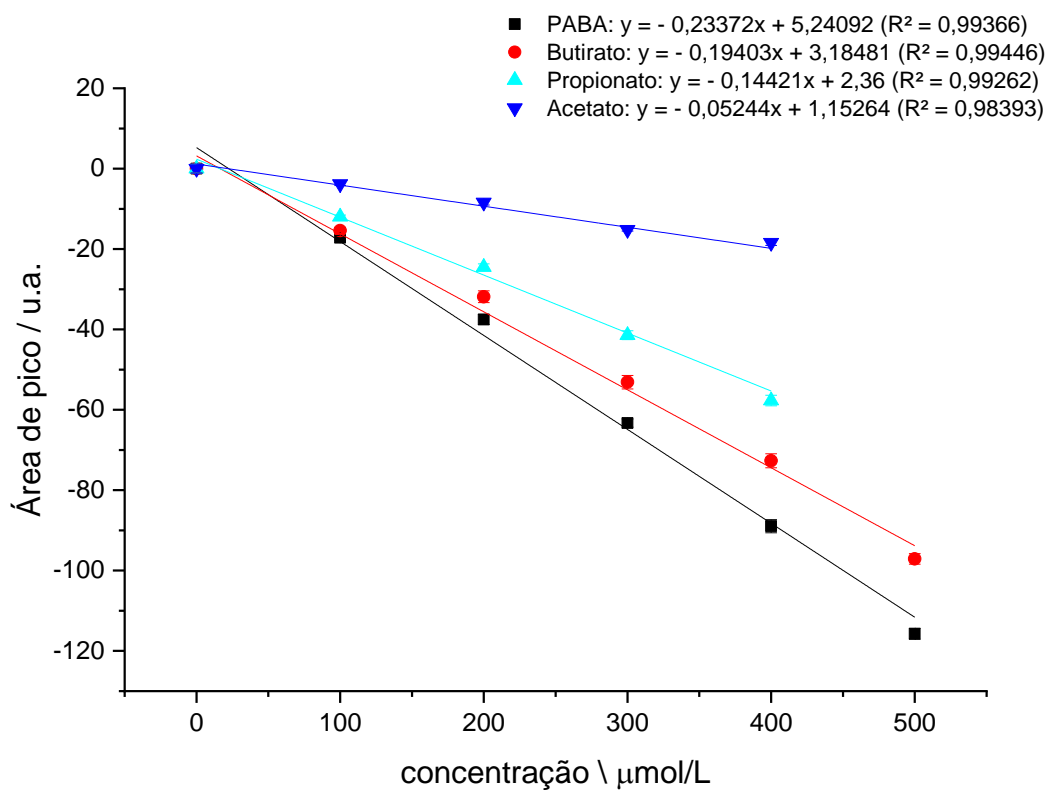
Figura 22. Eletroferograma obtido no segundo detector para a mistura de padrões de ácidos monocarboxílicos (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em NaHCO_3 10 mmol/L (pH 8,3) a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 52,5 cm e 42,5 cm, respectivamente.



Ao comparar os dois eletroferogramas das Figuras 21 e 22, vemos que o perfil de separação é semelhante entre eles. Porém, na análise real o butirato apresenta-se como um pico negativo, além de não existir o pico de sistema previsto na simulação. O aparecimento de picos de sistema está relacionado com a composição do BGE, como já foi mencionado anteriormente. No caso do NaHCO_3 , a questão está relacionada com o valor de pK_a calculado e o valor de pK_a real, sendo o valor calculado muito menor que o valor experimental. Essa ocorrência está relacionada com a dependência da concentração de gás carbônico dissolvido no meio, dentre outras condições que o cálculo não leva em consideração (DIBENEDETTO et al., 2006).

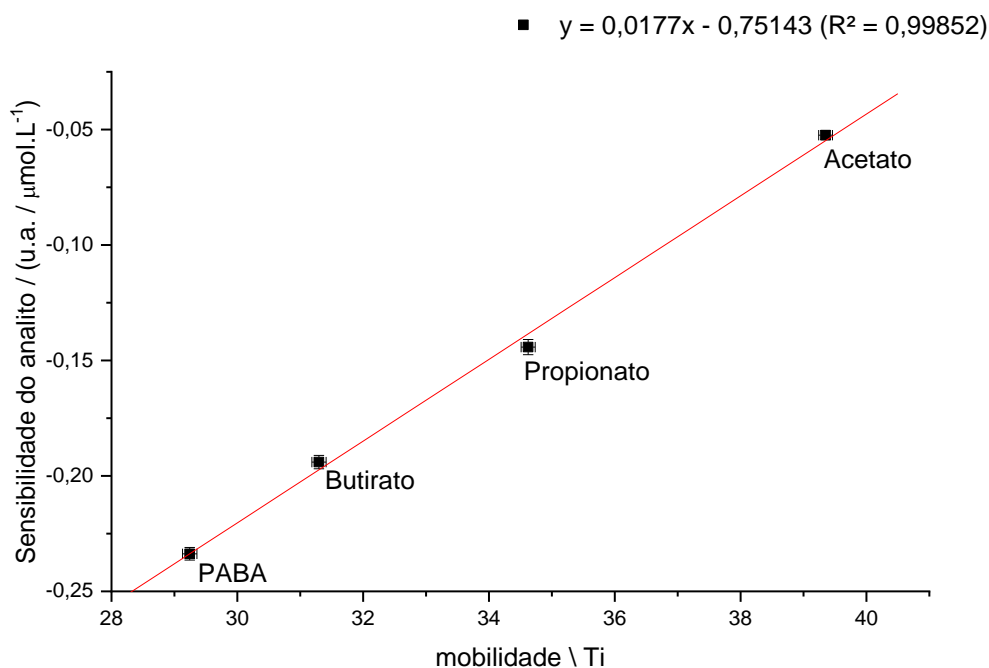
Para encontrar a sensibilidade de cada analito, plota-se a área de pico do analito em função de sua mobilidade efetiva e traça-se o ajuste linear para os pontos, obtendo-se uma curva de calibração. As curvas obtidas estão na Figura 23.

Figura 23. Curvas analíticas de calibração para os ácidos monocarboxílicos em NaHCO₃ 10 mmol/L, pH 8,3.



Para os analitos propionato e acetato, utilizou-se a faixa de concentração entre 100 a 400 μmol/L, pois a concentração de 500 μmol/L não faz parte do intervalo linear. Por meio da inclinação da reta obtida no ajuste, obtêm-se os valores de sensibilidade. Ao colocar esses valores em função das respectivas mobilidades efetivas, obtemos o gráfico visualizado na Figura 24.

Figura 24. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito (coeficiente angular da curva de calibração) em função das suas respectivas mobilidades efetivas. Ácidos monocarboxílicos em NaHCO₃ 10 mmol/L, pH 8,3.

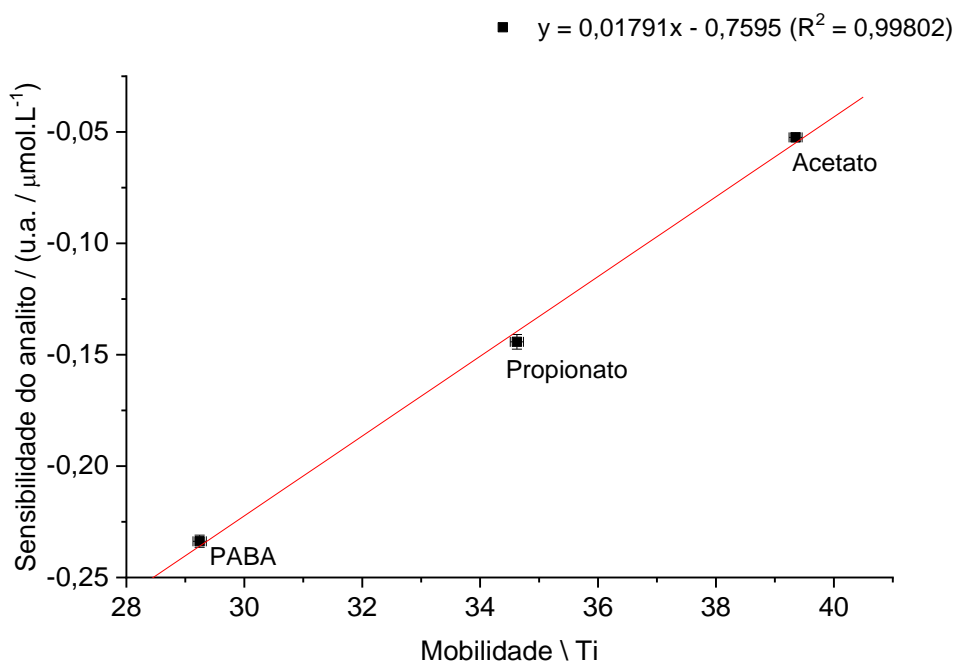


Como pode ser visto na Figura 24, as mobilidades dos analitos são próximas entre si, distando apenas 10 unidades entre o primeiro e o último ponto. Como já foi citada anteriormente, a relação entre a sensibilidade e a mobilidade de um analito não obedece a uma função linear, porém, considerando um pequeno intervalo de mobilidades, é possível aplicar o ajuste linear a esse conjunto de dados, como foi amplamente discutido na seção 3.1. Pelo valor do coeficiente de determinação calculado para a reta ajustada obtêm-se valor próximo de 1,0, concordando com a previsão anterior e indicando que a relação entre sensibilidade e mobilidade pode ser ajustada a uma reta dependendo da faixa de mobilidade considerada. Sendo assim, com a equação de reta obtida no ajuste pode-se realizar uma interpolação e calcular a sensibilidade do analito sem a necessidade da construção de uma curva padrão de calibração. Para a quantificação do analito, utiliza-se a relação descrita na Equação 19.

$$\text{Concentração } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{área do pico}}{\text{sensibilidade do analito}} \quad (19)$$

Para provar que o método é válido e confiável, compara-se os valores encontrados experimentalmente com os valores obtidos por meio da curva de calibração indireta. Para tal, é necessário excluir um dos pontos da curva mostrada na Figura 24 e realizar um novo ajuste linear com os três pontos restantes. Para uma melhor descrição do procedimento utilizaremos o butirato como exemplo. Ao remover o ponto que corresponde ao butirato obtemos uma nova curva indireta e sua equação de reta apresentadas na Figura 25.

Figura 25. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito (coeficiente angular da curva de calibração) em função das suas respectivas mobilidades efetivas na ausência de butirato. Ácidos monocarboxílicos em NaHCO_3 10 mmol/L, pH 8,3.



Com o valor de mobilidade efetiva do butirato faz-se uma interpolação nesta curva e encontra-se seu valor de sensibilidade, comparando-o com o valor de sensibilidade obtido experimentalmente por meio da curva direta de calibração. Com os dois valores de sensibilidade, aplicou-se o teste t de Student para o caso de comparação entre duas medidas repetidas (HARRIS, 2012), a fim de verificar se há diferenças significativas entre eles e, em seguida, o cálculo das diferenças das médias de sensibilidade. O nível de confiança do teste foi de 95% e número de dados igual a 3. Esse procedimento foi realizado para os demais

analitos e se estenderá para os experimentos posteriores. Os resultados encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20. Resultados obtidos para as análises estatísticas de ácidos monocarboxílicos em NaHCO₃

Analito excluído	Equação de reta¹	Sensibilidade prevista / (u.a./μmol.L⁻¹)	Sensibilidade experimental / (u.a./μmol.L⁻¹)	Diferença de sensibilidade²
Acetato	$y = 0,01648x - 0,71339$ (R ² = 0,99509)	- 0,064 ± 0,009	- 0,052 ± 0,002	- 0,013 ± 0,118
Propionato	$y = 0,01784x - 0,75395$ (R ² = 0,99974)	- 0,14 ± 0,01	- 0,144 ± 0,003	0,004 ± 0,018
Butirato	$y = 0,01791x - 0,7595$ (R ² = 0,99802)	- 0,20 ± 0,01	- 0,194 ± 0,003	- 0,006 ± 0,054
PABA	$y = 0,01771x - 0,75157$ (R ² = 0,99523)	- 0,23 ± 0,01	- 0,234 ± 0,003	0,004 ± 0,11

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 3.

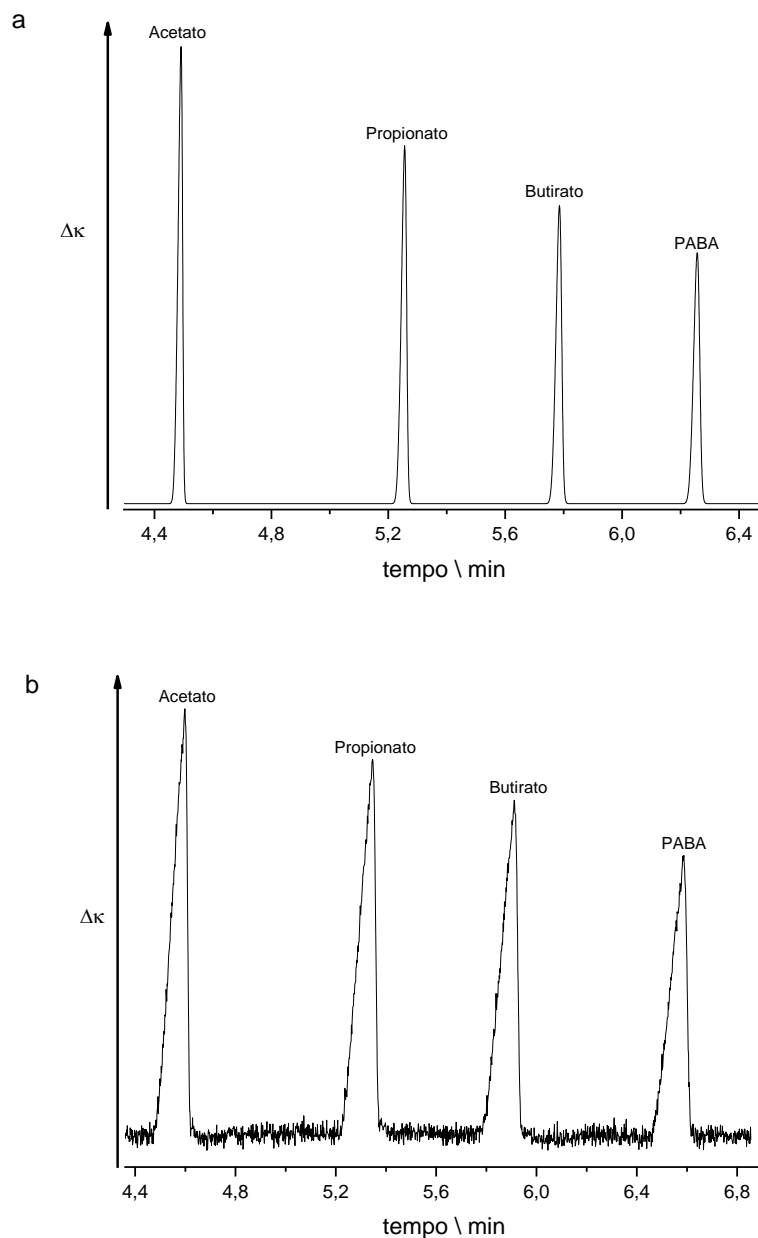
O resultado esperado para a análise estatística seria não encontrar diferenças significativas nos valores apenas para propionato e butirato, visto que para esses analitos a sensibilidade é obtida por interpolação; com relação a acetato e PABA, obtêm-se os valores por extrapolação. Com base nos dados apresentados na Tabela 20 e no resultado do teste conclui-se que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidades experimentais e calculadas para os analitos. O resultado do teste obtido para PABA e acetato nos mostra que mesmo em alguns casos de extrapolação o método funciona desde que não esteja muito distante do domínio contemplado pela equação. Portanto, pode-se concluir que os

resultados obtidos por meio da curva de calibração são confiáveis para os cálculos de quantificação.

3.3.3 Ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina

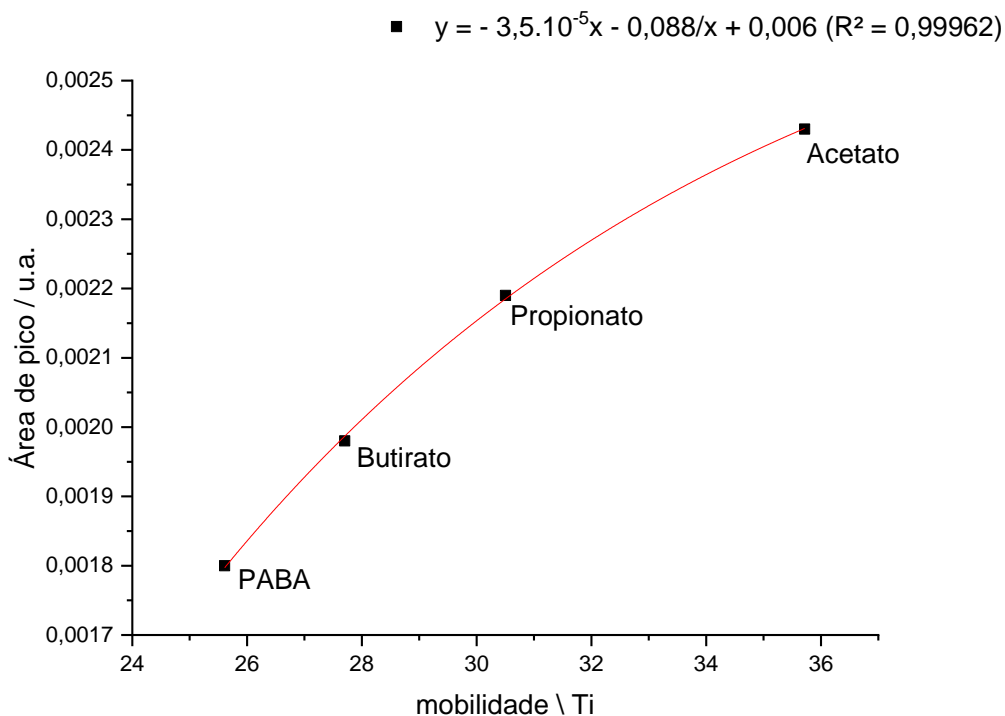
Nesta seção serão apresentados os resultados das análises dos mesmos ácidos monocarboxílicos em BGE de MES/His 30 mmol/L. Como o pH desse BGE é 6,1, todas as espécies estão em torno de 96% na forma aniônica, segundo os cálculos realizados pelo Chemicalize (CHEMICALIZE, 1998). De acordo com a previsão realizada pelo PeakMaster para este valor de pH, a histidina está em equilíbrio entre as espécies zwitteriônica e carregada positivamente. Nesse caso, as concentrações são 14,57 e 15,42 mmol/L. Já para MES e sua base conjugada, as concentrações são 14,58 e 15,41 mmol/L. Sendo assim, tanto o co-íon como o contra-íon do eletrólito estão aproximadamente 50% na forma ionizada, sendo uma das condições que a Equação 8 não abrange. Os eletroferogramas simulado e real para essa análise são vistos na Figura 26.

Figura 26. a) Eletroferograma obtido por meio da simulação pelo PeakMaster da série de ácidos monocarboxílicos utilizando como BGE MES/Histidina 30 mmol/L de pH 6,1. Potencial: -30 kV. Tamanho total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente. b) Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de ácidos monocarboxílicos (500 μ mol/L). O experimento foi realizado em MES/Histidina 30 mmol/L, de pH 6,1 a -30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μ m d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.



Como pode ser visto na Figura 26, os eletroferogramas são semelhantes entre si, mostrando novamente que a previsão pelo PeakMaster é bastante precisa. Com o uso dos dados do PeakMaster construiu-se uma curva de área de pico dos analitos em função das mobilidades, sendo apresentada na Figura 27.

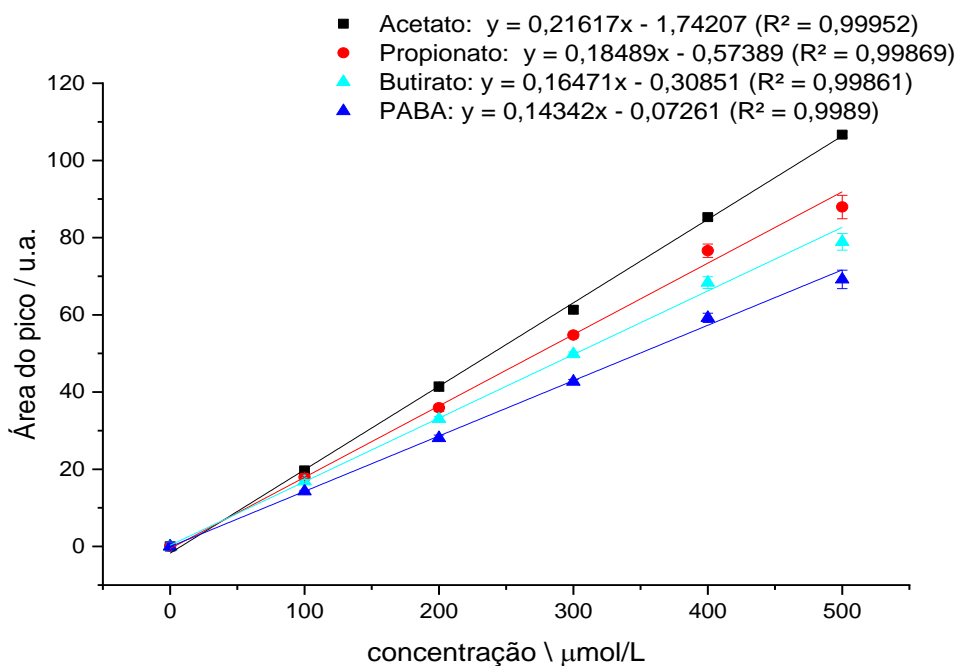
Figura 27. Área de pico em função da mobilidade de monocarboxilatos em Mes/His 30mmol/L, pH 6,0. Resultado obtido por simulação.



Na Figura 27 visualiza-se a curva ajustada para o conjunto de pontos. Nota-se que o perfil obtido para os analitos não é linear como é esperado para a faixa de mobilidades dos monocarboxilatos nesse valor de pH. Sendo assim, ajustaram-se os pontos pela Equação 14, apresentando boa correlação como demonstrado pelo valor do coeficiente de determinação.

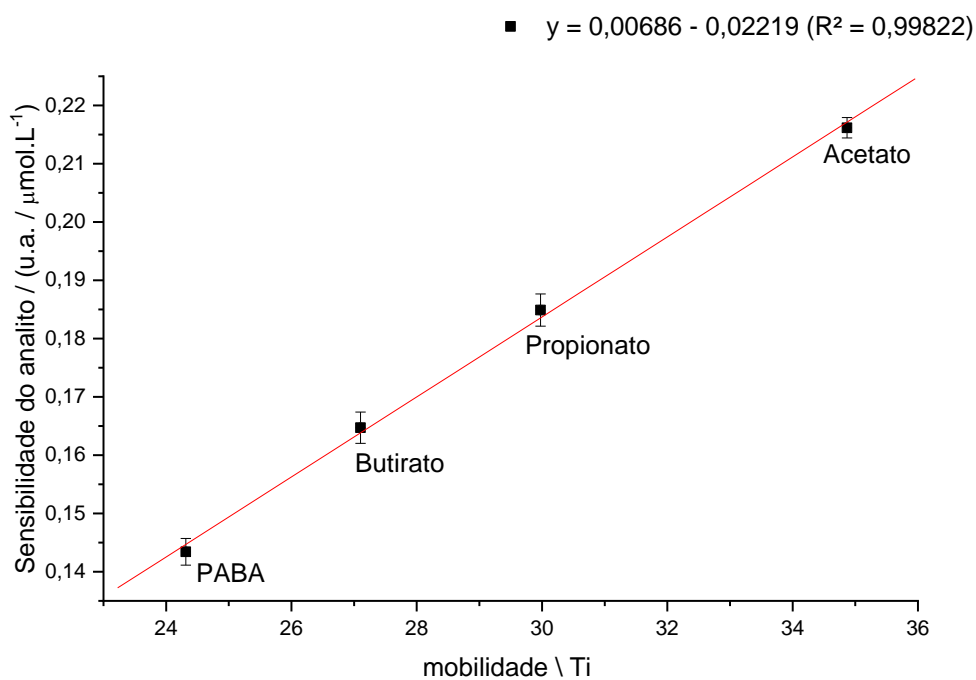
Para as análises reais, a curva a ser construída é de sensibilidade do analito em função de respectivas mobilidades. Sendo assim, as curvas de calibração para os ácidos monocarboxílicos encontram-se na Figura 28.

Figura 28. Curvas analíticas de calibração para os ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.



Ao plotar as sensibilidades dos analitos em função das respectivas mobilidades efetivas obtêm-se o gráfico visualizado na Figura 29.

Figura 29. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função das suas respectivas mobilidades efetivas. Ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.



Como pode ser visto na Figura 29, o perfil obtido pelas análises reais é diferente do perfil obtido pela simulação (figura 27). Uma justificativa plausível para esta diferença refere-se ao pK_a dos ácidos utilizados nas simulações. Como já foi relatado na seção anterior pelas Figuras 21 e 22, esses valores podem ser diferentes dos valores reais de pK_a dos componentes utilizados na investigação. Portanto haverá diferenças entre as análises reais e as simulações. Fazendo o ajuste linear para o conjunto de pontos apresentados, obtém-se coeficiente de determinação próximo de 1,0, indicando que a relação entre a sensibilidade e mobilidade pode ser expressa em uma equação de 1º grau para a faixa de mobilidades considerada. Ao realizar o teste t para os valores de sensibilidade calculados e os obtidos experimentalmente para cada analito e o cálculo das diferenças das médias de sensibilidade temos os resultados apresentados na Tabela 21. O nível de confiança utilizado foi de 95%.

Tabela 21. Resultados obtidos para as análises estatísticas de ácidos monocarboxílicos em MES/Histidina

Analito excluído	Equação de reta¹	Sensibilidade prevista / (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidade experimental / (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Diferença de sensibilidade²
Acetato	$y = 0,00732x - 0,03434$ ($R^2 = 0,99940$)	$0,221 \pm 0,001$	$0,216 \pm 0,002$	$0,005 \pm 0,018$
Propionato	$y = 0,00684x - 0,02185$ ($R^2 = 0,99904$)	$0,183 \pm 0,001$	$0,185 \pm 0,003$	$- 0,002 \pm 0,013$
Butirato	$y = 0,0069x - 0,02372$ ($R^2 = 0,99852$)	$0,163 \pm 0,001$	$0,165 \pm 0,003$	$- 0,002 \pm 0,018$
PABA	$y = 0,0066x - 0,01375$ ($R^2 = 0,99938$)	$0,147 \pm 0,001$	$0,143 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,015$

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

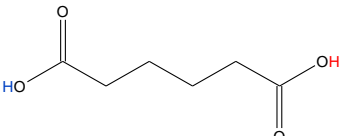
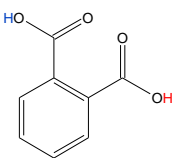
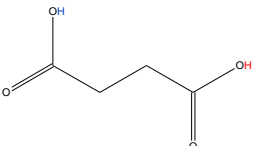
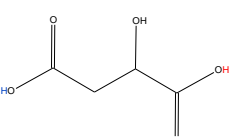
² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 3.

Com base nos dados apresentados na Tabela 21 conclui-se que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidades experimentais e calculadas para os analitos.

3.3.4 Ácidos dicarboxílicos em NaHCO₃

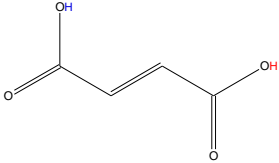
A série de ácidos dicarboxílicos compreende espécies negativas com cargas divalentes (A²⁻). Os analitos utilizados nesta série, juntamente com seus respectivos valores de pK_a, estão representados na Tabela 22.

Tabela 22. Estruturas e valores de pK_a dos ácidos dicarboxílicos utilizados no experimento

Estrutura	Nome	pK _a ¹
	Ácido adípico	3,92 e 4,70
	Ácido ftálico (biftalato)	2,94 e 5,49
	Ácido succínico	3,55 e 5,59
	Ácido málico	3,20 e 5,30

(continua)

(conclusão)

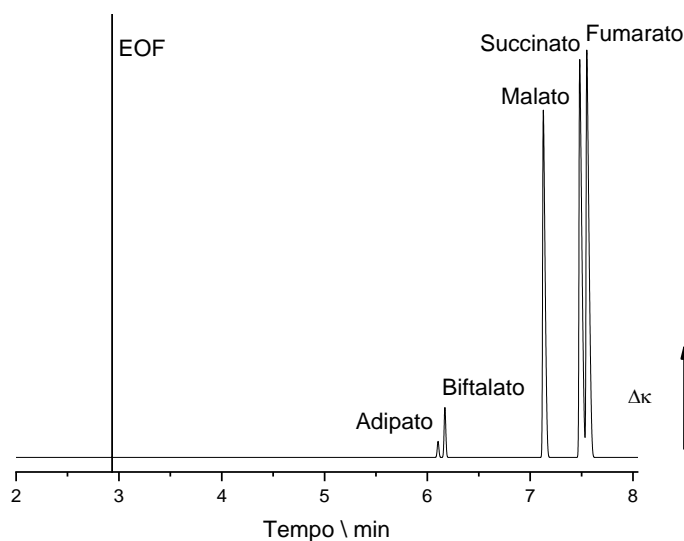
Estrutura	Nome	pK _a ¹
	Ácido fumárico	3,55 e 4,41

¹Valores obtidos pelo chemicalize.com (CHEMICALIZE, 1998).

Neste BGE, de pH 8,3, as espécies estão como ânions divalentes totalmente ionizados.

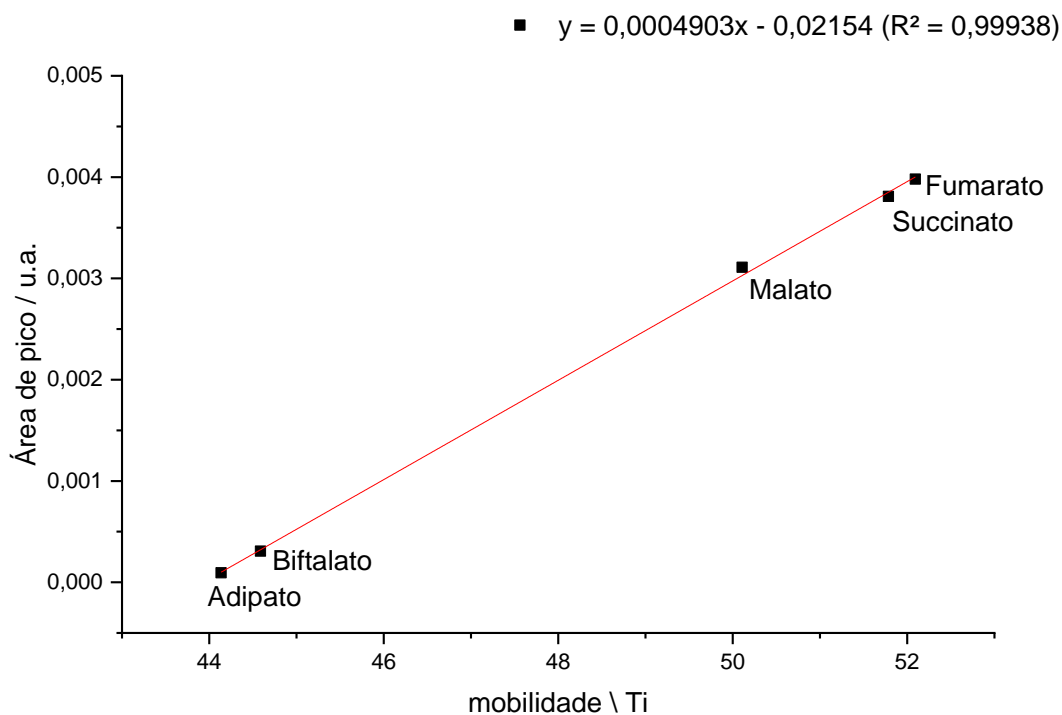
Iniciando os estudos por meio de simulação pelo PeakMaster, obtemos o eletroferograma visualizado na Figura 30.

Figura 30. Eletroferograma obtido por meio da simulação pelo PeakMaster da série de ácidos dicarboxílicos utilizando como BGE NaHCO₃ 10 mmol/L (pH 8,3). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 80 cm e 56,1 cm, respectivamente.



Como a simulação foi realizada no contra EOF, adipato – o analito com maior raio iônico hidratado dos ânions – é o de menor tempo de migração. Ao calcular as áreas de picos obtidos por simulação e colocando-os em função de suas mobilidades, obtemos o gráfico apresentado na Figura 31.

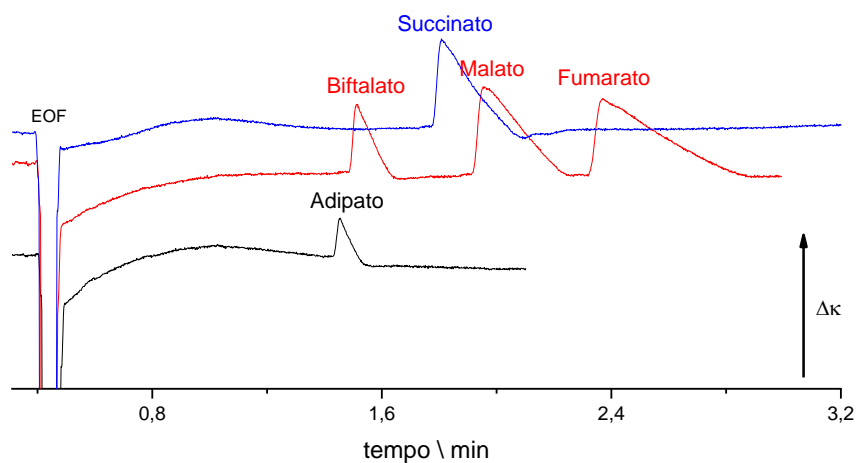
Figura 31. Área de pico em função da mobilidade de carboxilatos em NaHCO₃ 10 mmol/L, pH 8,3. Resultado obtido por simulação.



Ao realizar o ajuste linear para o conjunto de pontos, obteve-se coeficiente de determinação próximo de 1,0, sugerindo que o comportamento destes ânions é linear na faixa de mobilidade apresentada.

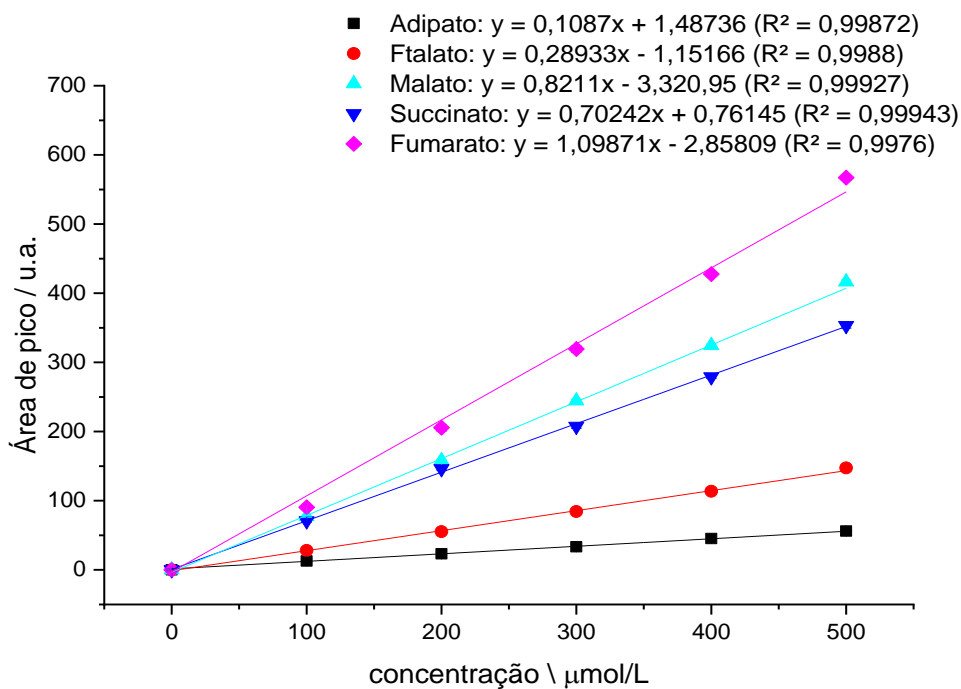
Após as investigações com as simulações, passou-se para as amostras reais. O eletroferograma para a análise correspondente à simulação encontra-se na Figura 32.

Figura 32. Eletroferograma obtido no primeiro detector de ácidos dicarboxílicos (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em NaHCO_3 10 mmol/L, de pH 8,3 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 51,7 cm e 10 cm, respectivamente.



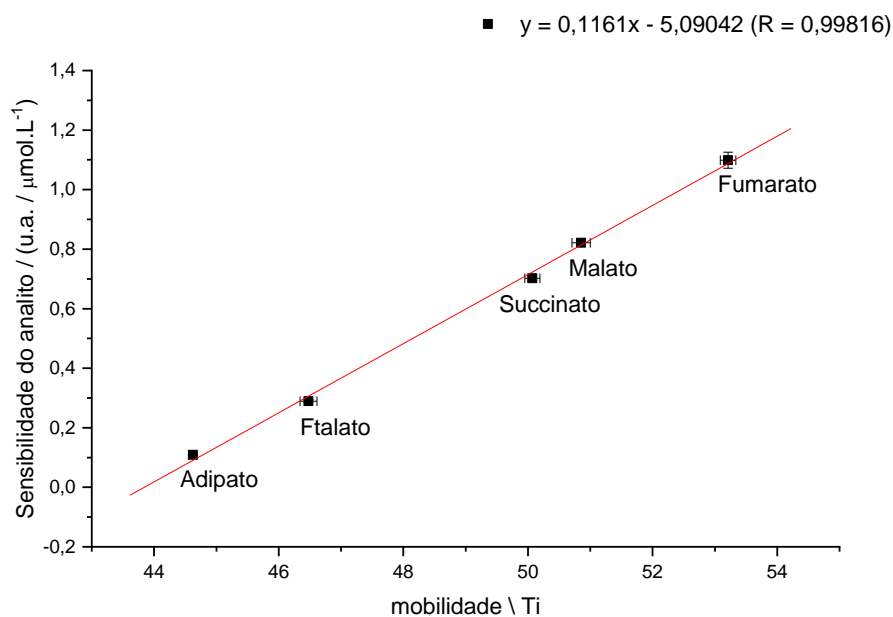
A fim de reduzir o tempo de análise e evitar o efeito do alargamento dos picos, optou-se por realizar as análises utilizando a detecção no primeiro detector. Com isso, foi necessário injetar adipato e succinato separados dos demais, visto que estes analitos têm tempos de migração muito próximos de biftalato e malato, como pode ser visto na Figura 32. As curvas de calibração para os analitos encontram-se na Figura 33.

Figura 33. Curvas analíticas de calibração diretas para os ácidos dicarboxílicos em NaHCO₃ 10 mmol/L, pH 8,3.



Ao plotar as sensibilidades dos analitos em função das respectivas mobilidades efetivas obtêm-se o gráfico visualizado na Figura 34.

Figura 34. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Ácidos dicarboxílicos em NaHCO₃ 10 mmol/L, pH 8,3.



Como pode ser visto na Figura 34, o ajuste linear obtido para o conjunto de pontos fornece uma reta com coeficiente de determinação próximo de 1,0, sendo compatível com resultado obtido pela simulação. Portanto, este é um caso que apresenta condições distintas das previstas pela Equação 14 e exibe comportamento que pode ser ajustado pela mesma. Ao aplicar o teste t para os valores de sensibilidade calculados e os obtidos experimentalmente para cada analito obtemos os resultados apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Resultados obtidos para as análises estatísticas de ácidos dicarboxílicos em NaHCO₃

Analito excluído	Equação de reta¹	Sensibilidade prevista / (u.a./μmol.L⁻¹)	Sensibilidade experimental / (u.a./μmol.L⁻¹)	Diferença de sensibilidade²
Adipato	$y = 0,12042x - 5,31169$ (R ² = 0,999)	0,063 ± 0,035	0,109 ± 0,002	- 0,046 ± 0,071
Ftalato	$y = 0,11478x - 5,02039$ (R ² = 0,99850)	0,31 ± 0,08	0,289 ± 0,005	0,025 ± 0,063
Succinato	$y = 0,11666x - 5,11258$ (R ² = 0,99896)	0,729 ± 0,07	0,702 ± 0,008	0,027 ± 0,045
Malato	$y = 0,11573x - 5,07401$ (R ² = 0,99810)	0,811 ± 0,08	0,82 ± 0,01	- 0,01 ± 0,06
Fumarato	$y = 0,11388x - 4,98666$ (R ² = 0,99734)	1,07 ± 0,07	1,10 ± 0,03	- 0,03 ± 0,11

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

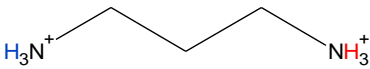
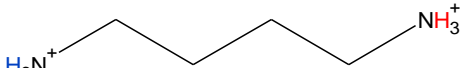
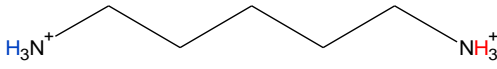
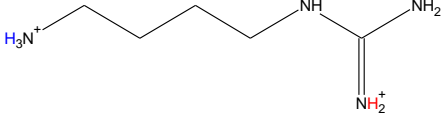
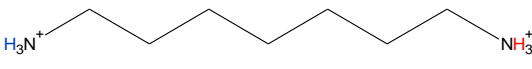
² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 4.

Com base nos dados apresentados na Tabela 23 e no resultado do teste conclui-se que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidades experimentais e calculadas para os analitos.

3.3.5 Diaminas em ácido acético

A série de diaminas compreende espécies positivas com cargas divalentes (A^{2+}). Os analitos utilizados nesta série, juntamente com seus respectivos valores de pK_a , estão representados na Tabela 24.

Tabela 24. Estruturas e valores de pK_a das diaminas utilizados no experimento

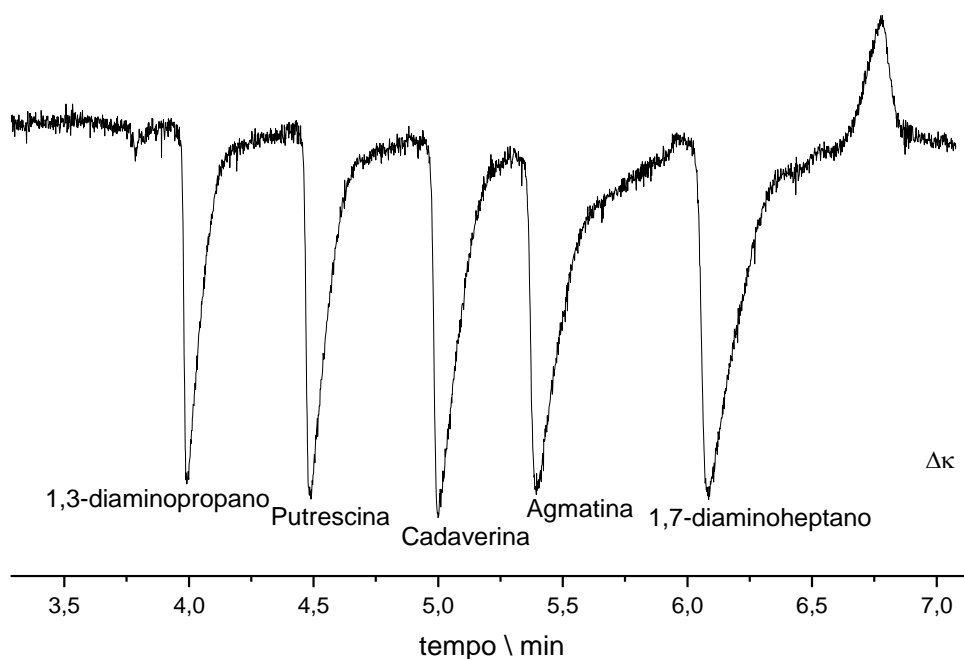
Estrutura	Nome	pK_a ¹
	1,3-diaminopropano	8,42 e 10,17
	1,4-diaminobutano (putrescina)	9,90 e 10,51
	1,5-diaminopentano (cadaverina)	9,90 e 10,51
	4-aminobutil-guanidina (agmatina)	9,78 e 12,61
	1,7-diaminoheptano	9,90 e 10,51

¹Valores obtidos pelo chemicalize.com (CHEMICALIZE, 1998).

Nesta análise, o pH do BGE é 2,5 e, segundo os cálculos realizados pelo Chemicalize, todas as espécies estão duplamente carregadas positivamente. De acordo com a previsão do PeakMaster, as concentrações de ácido acético e acetato neste BGE são 496,87 e 3,13 mmol/L. Tanto a carga dos analitos como a porcentagem de ionização dos componentes do BGE não são condições previstas pela Equação 8, sendo um experimento inédito para a

proposta. Nas Figuras 35 encontra-se o eletroferograma para a análise realizada em capilar de sílica fundida.

Figura 35. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 65,1 cm e 55,1 cm, respectivamente.



O eletroferograma apresentado na Figura 35 refere-se à análise de diaminas em capilar de sílica fundida. Por apresentarem carga positiva, deve-se considerar possibilidade dessas espécies adsorvem na superfície interna do capilar de sílica fundida, o que pode prejudicar a resolução e integração dos picos e, como consequência, a quantificação. Se observarmos os picos apresentados na Figura 35, nota-se que há um prolongamento ao longo de seu formato (pico com cauda), o que indica a adsorção, mas sem confirmação deste fenômeno durante a análise. Com relação ao pico de agmatina, nota-se que o prolongamento citado é mais acentuado em relação aos demais analitos, fato que pode ser explicado pela carga total da espécie em pH 2,5. A agmatina apresenta o grupo guanidina em sua estrutura química, sendo

a única espécie dentre as diaminas que possui mais que dois nitrogênios passíveis de protonação. Sendo assim, é possível que em valores de pH menores a agmatina tenha carga maior que 2. A fim de eliminar essa possível interferência escolheu realizar as análises das diaminas em capilar revestido internamente por PVA (DANIEL et al., 2015). Nas Figuras 36, 37 e 38 encontram-se o eletroferograma para a análise realizada em capilar revestido internamente por PVA, as curvas de calibração para as espécies e a curva de calibração indireta (sensibilidade em função das mobilidades efetivas).

Figura 36. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.

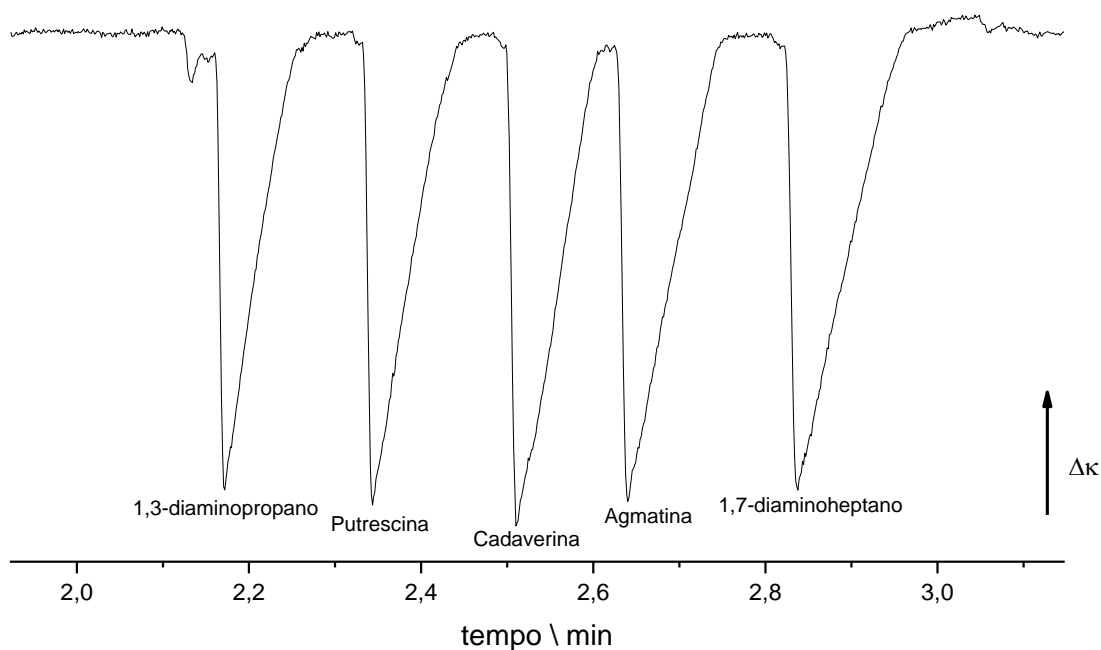


Figura 37. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5.

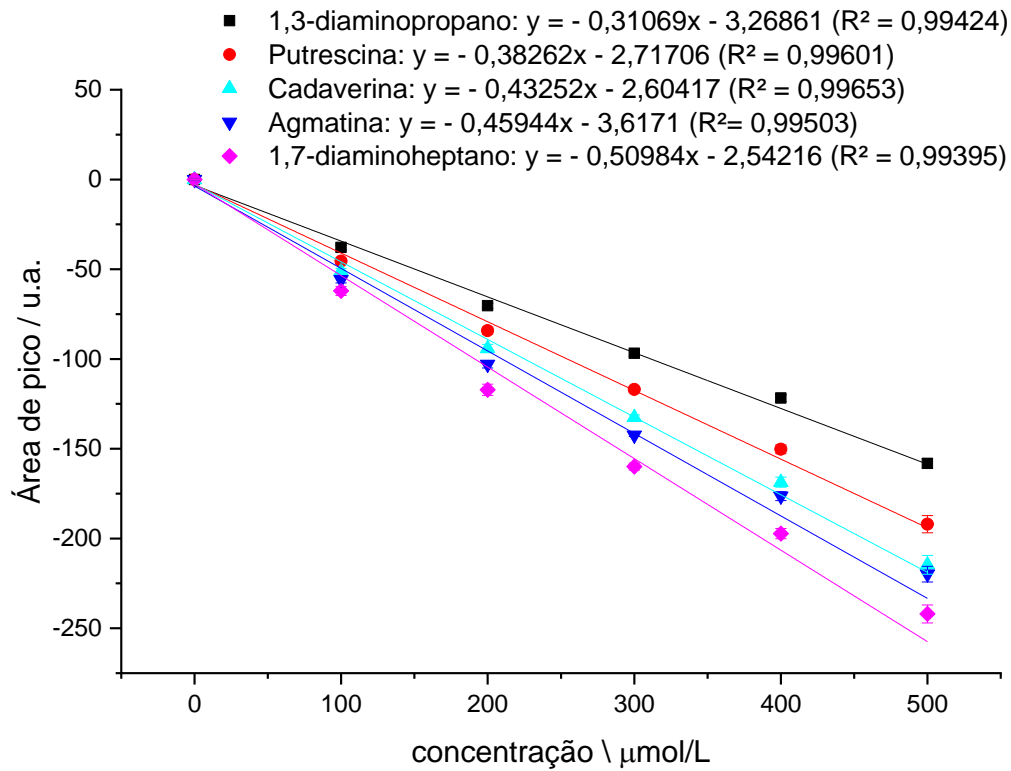
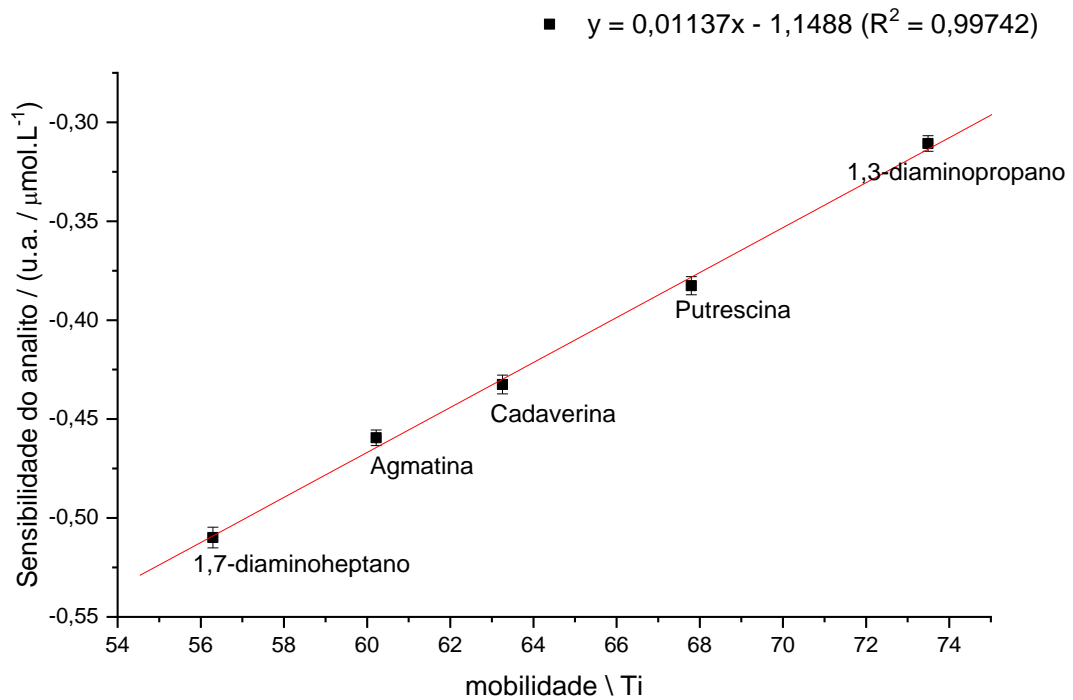


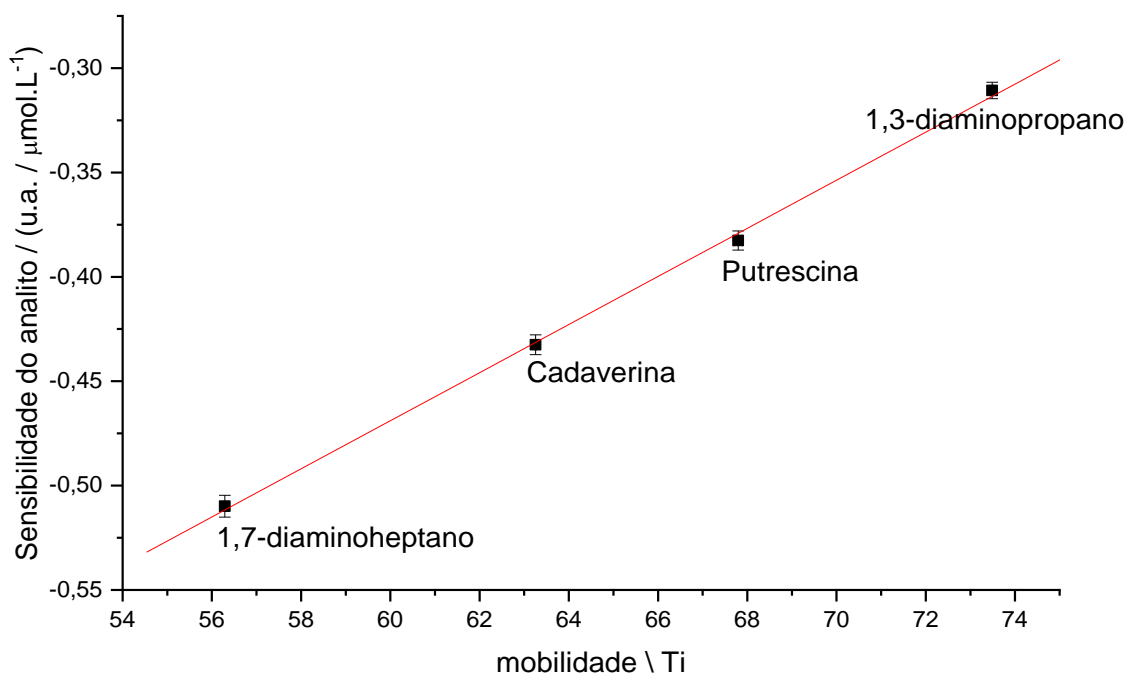
Figura 38. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.



Como pode ser visto pela Figura 38, o coeficiente de determinação calculado para a reta ajustada é próximo de 1,0. Se observarmos o alinhamento dos pontos no gráfico, nota-se que o ponto de agmatina encontra-se um pouco deslocado em relação aos demais, o que reforça a proposição de que esta espécie apresente carga maior que 2 em pH 2,5, fornecendo valor de sensibilidade ligeiramente maior que o esperado. Pelos cálculos do Chemicalize, 0,08% da espécie está na forma de tripla carga. Na Figura 39 encontra-se a curva de calibração indireta com exclusão de agmatina.

Figura 39. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas com exclusão de agmatina. Diaminas em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.

$$\blacksquare \quad y = 0,01152x - 1,16021 \quad (R^2 = 0,99882)$$



Ao comparar a Figura 39 com a Figura 38, observa-se que o alinhamento dos pontos é um tanto melhor na ausência da agmatina, justificado pelo coeficiente de determinação da curva apresentar valor ligeiramente superior, mas não tão distante com relação à curva em presença de agmatina (Figura 38). Os resultados para o teste t encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em ácido acético

Analito excluído	Equação de reta¹	Sensibilidade prevista / (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidade experimental / (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Diferença de sensibilidade²
1,3-diaminopropano	$y = 0,01106 - 1,1323$ ($R^2 = 1$)	$- 0,323 \pm 0,007$	$- 0,311 \pm 0,004$	$- 0,012 \pm 0,004$
Putrescina	$y = 0,0116x - 116427$ ($R^2 = 0,99964$)	$- 0,378 \pm 0,007$	$- 0,383 \pm 0,005$	$0,005 \pm 0,023$
Cadaverina	$y = 0,0115x - 1,15859$ ($R^2 = 0,99886$)	$- 0,431 \pm 0,006$	$- 0,433 \pm 0,005$	$0,002 \pm 0,040$
1,7-diaminoheptano	$y = 0,01194x - 1,18906$ ($R^2 = 0,99848$)	$- 0,520 \pm 0,005$	$- 0,510 \pm 0,005$	$- 0,01 \pm 0,075$

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 3.

Os resultados da análise estatística do teste t, levando em consideração os dados apresentados na Tabela 25, mostrou que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidades experimentais e calculados, com exceção de 1,3-diaminopropano.

3.3.6 Diaminas em ácido fórmico

Para esta análise, utilizou-se BGE de ácido fórmico 50 mmol/L de pH 2,5. De acordo com a previsão do PeakMaster, as concentrações de ácido fórmico e formiato neste BGE são 46,09 e 3,06 mmol/L. O eletroferograma obtido, as curvas de calibração e a curva indireta para a análise encontram-se nas Figuras 40, 41 e 42.

Figura 40. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (400 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.

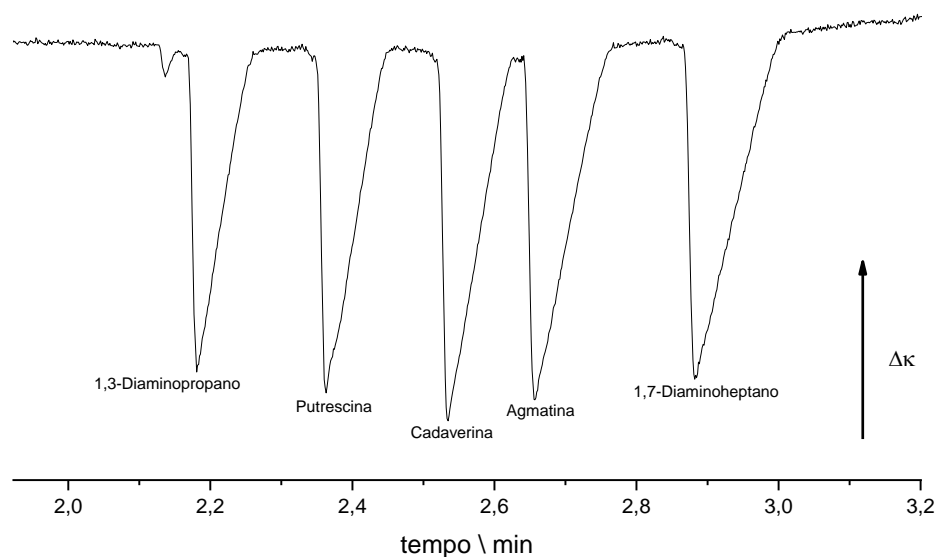


Figura 41. Curvas analíticas de calibração diretas para as diaminas em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5.

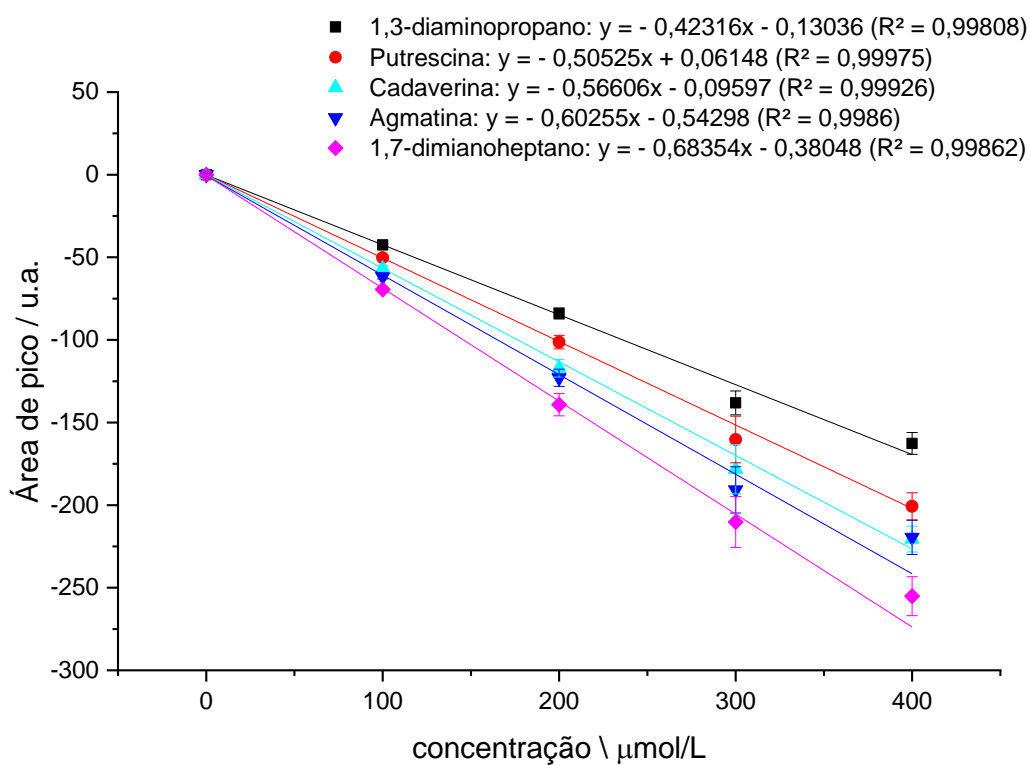
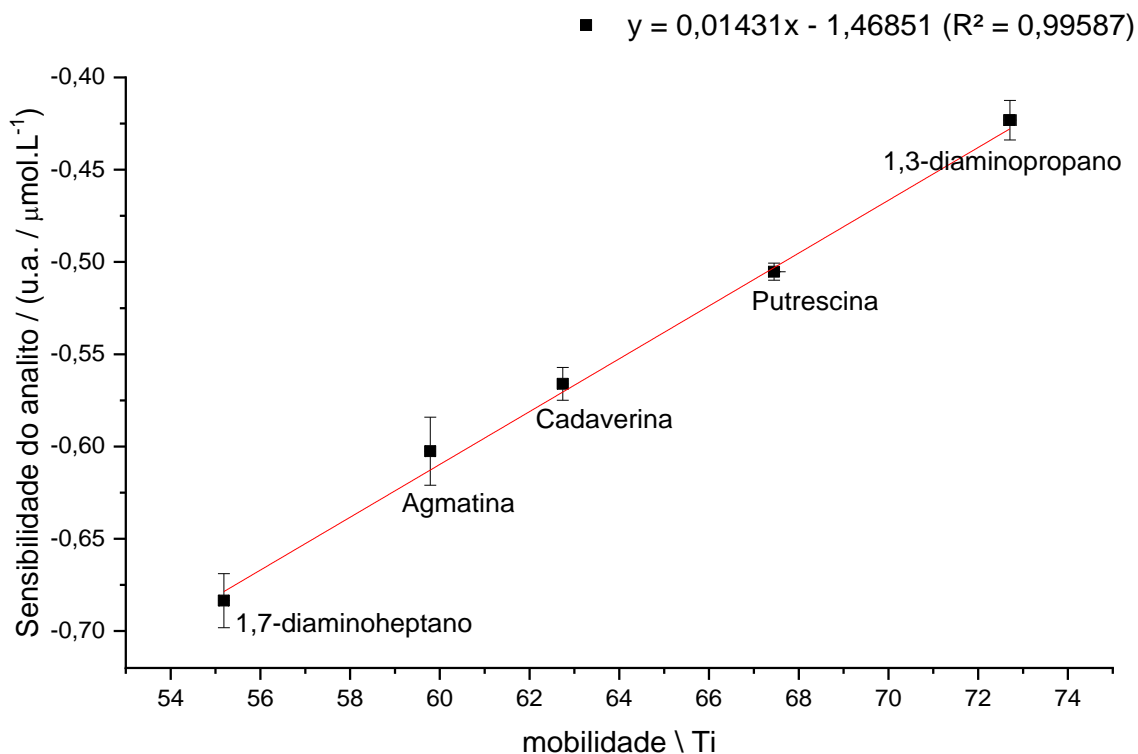


Figura 42. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em ácido fórmico 50 mmol/L, pH 2,5.



Assim como ocorreu com o BGE de ácido acético, o ponto de agmatina mostra-se um pouco deslocado em relação aos outros pontos do gráfico, porém, isto não afeta a razão entre a sensibilidade e mobilidade, não sendo necessário excluí-lo da curva. O ajuste linear dos pontos fornece coeficiente de determinação próximo de 1. Os resultados para o teste t encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em ácido fórmico

Analito excluído	Equação de reta¹	Sensibilidade prevista/ (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidade experimental/ (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Diferença de sensibilidade²
1,3-diaminopropano	$y = 0,01441x - 1,47249$ ($R^2 = 0,99169$)	$- 0,425 \pm 0,012$	$- 0,423 \pm 0,011$	$- 0,002 \pm 0,050$
Putrescina	$y = 0,01465x - 1,48596$ ($R^2 = 0,99720$)	$- 0,498 \pm 0,011$	$- 0,505 \pm 0,005$	$0,007 \pm 0,020$
Cadaverina	$y = 0,01451x - 1,47881$ ($R^2 = 0,99654$)	$- 0,568 \pm 0,010$	$- 0,566 \pm 0,009$	$- 0,002 \pm 0,019$
Agmatina	$y = 0,01473x - 1,49516$ ($R^2 = 0,99888$)	$- 0,614 \pm 0,009$	$- 0,603 \pm 0,018$	$- 0,011 \pm 0,013$
1,7-diaminoheptano	$y = 0,01385x - 1,43395$ ($R^2 = 0,99692$)	$- 0,670 \pm 0,009$	$- 0,684 \pm 0,015$	$0,014 \pm 0,028$

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 4.

A análise estatística realizada para este experimento mostrou que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidade calculadas e obtidos experimentalmente para os analitos.

3.3.7 Diaminas em Lactato/His

Para esta análise, utilizou-se BGE composto por ácido láctico e histidina 20 mmol/L de pH 5,6. De acordo com a previsão do PeakMaster, as concentrações de ácido láctico e lactato são 0,27 e 19,73 mmol/L. Já para histidina e seu ácido conjugado, as concentrações são de 19,71 e 7,28 mmol/L. De acordo com o Chemicalize, as espécies estão totalmente

ionizadas e com cargas duplas positivas. O eletroferograma obtido e as curvas de calibração para a análise encontram-se nas Figuras 43 e 44.

Figura 43. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em lactato/histidina 20 mmol/L de pH 5,6 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 56,9 cm e 46,9 cm, respectivamente.

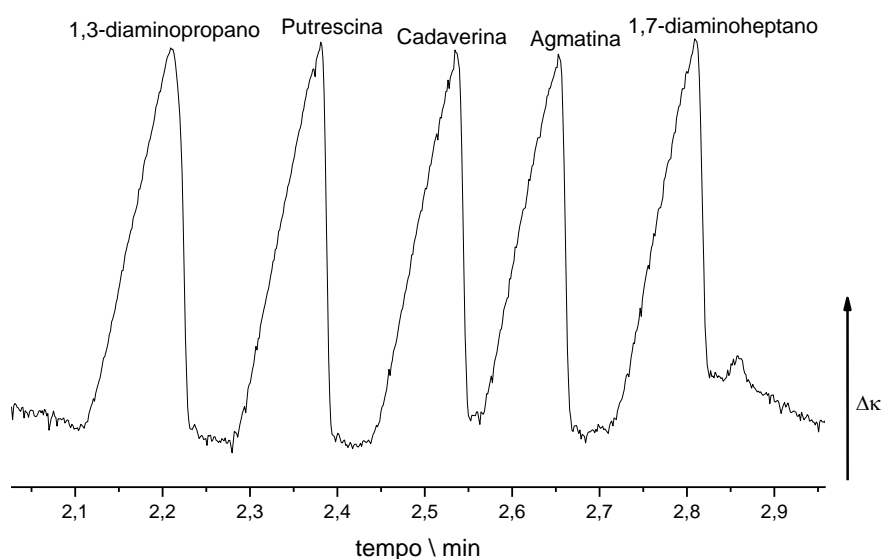
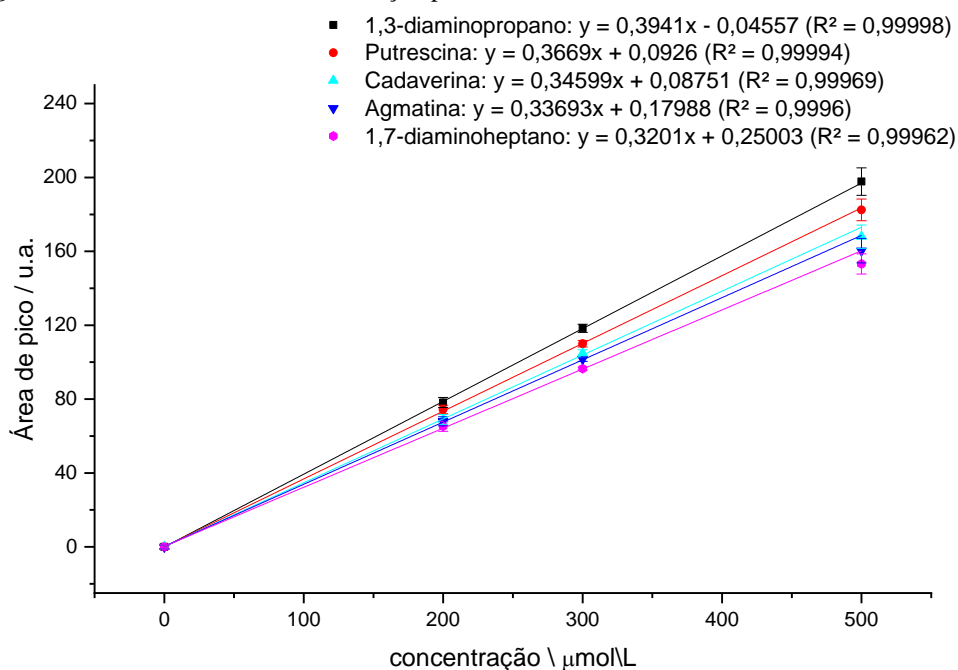
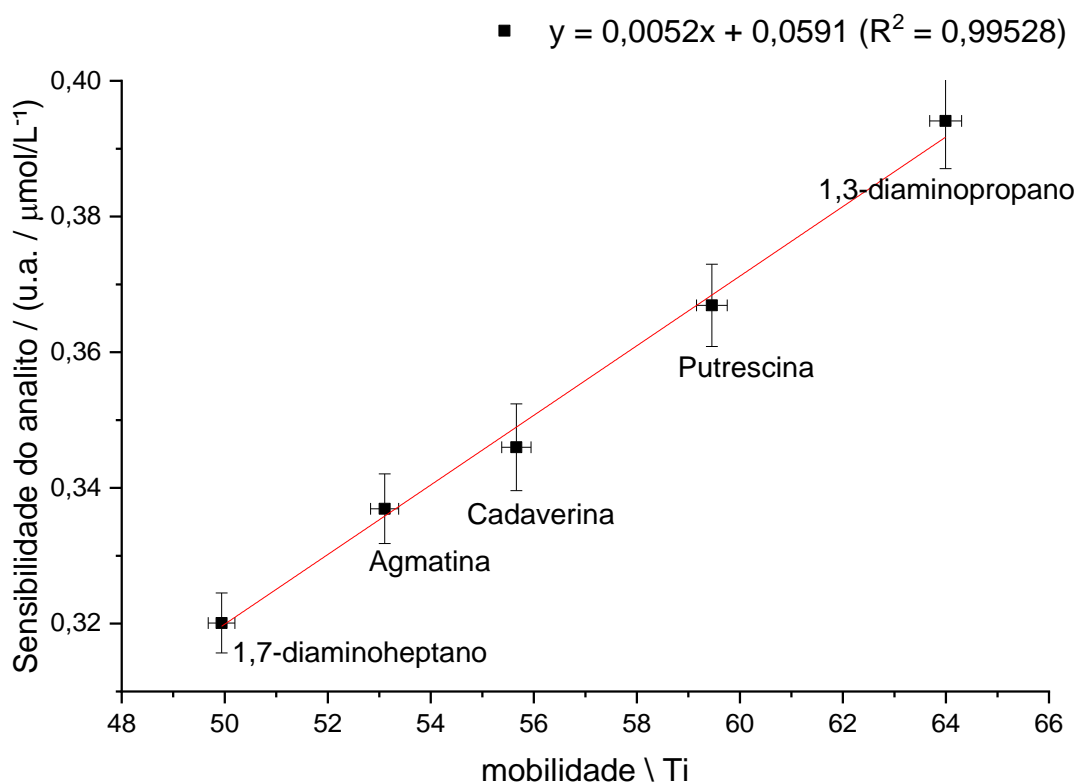


Figura 44. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em lactato/histidina 20 mmol/L, de pH 5,6.



Para a construção da curva de calibração, o ponto de 100 $\mu\text{mol/L}$ foi excluído por não apresentar linearidade com os demais. Já para 400 $\mu\text{mol/L}$, a exclusão é justificada pelo desvio negativo apresentado para essa concentração em relação à curva obtida pelo ajuste linear considerando a concentração de 400 $\mu\text{mol/L}$, fazendo com que as retas apresentassem valores de coeficientes angulares com pequena variação entre os analitos, principalmente para cadaverina e agmatina, comprometendo a construção a curva indireta. Na Figura 45 encontra-se a curva de sensibilidade do analito por mobilidade.

Figura 45. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em lactato/histidina 20 mmol/L, pH 5,6.



Como pode ser visto na Figura 45, os pontos apresentam boa linearidade, evidenciado pelo valor do coeficiente de determinação próximo de 1. Portanto, esta é mais uma condição aceita para a Equação 14, sendo simplificada para uma equação de 1º grau. Os resultados para o teste t encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em lactato/histidina

Analito excluído	Equação de reta¹	Sensibilidade prevista/ (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidade experimental/ (u.a./$\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Diferença de sensibilidade²
1,3-diaminopropano	$y = 0,00483x + 0,07911$ ($R^2 = 0,9947$)	$0,388 \pm 0,009$	$0,394 \pm 0,007$	$- 0,006 \pm 0,011$
Putrescina	$y = 0,00526x + 0,05633$ ($R^2 = 0,99543$)	$0,369 \pm 0,009$	$0,366 \pm 0,006$	$0,003 \pm 0,007$
Cadaverina	$y = 0,00469x + 0,07745$ ($R^2 = 0,99702$)	$0,350 \pm 0,001$	$0,346 \pm 0,006$	$- 0,007 \pm 0,005$
Agmatina	$y = 0,00526x + 0,05552$ ($R^2 = 0,99505$)	$0,335 \pm 0,008$	$0,337 \pm 0,005$	$- 0,002 \pm 0,008$
1,7-diaminoheptano	$y = 0,00533x + 0,05129$ ($R^2 = 0,99226$)	$0,317 \pm 0,008$	$0,320 \pm 0,004$	$- 0,003 \pm 0,013$

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 4.

Os resultados da análise estatística do teste t, levando em consideração os dados apresentados na Tabela 27, mostrou que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidades experimentais e calculadas para todos os analitos avaliados.

3.3.8 Diaminas em MES/Histidina

Para esta análise, utilizou-se BGE de MES/Histidina 30 mmol/L, de pH 6,1. De acordo com o Chemicalize, as espécies estão totalmente ionizadas e com cargas duplas positivas. O eletroferograma obtido, as curvas de calibração para a análise e a curva indireta encontram-se nas Figuras 46, 47 e 48.

Figura 46. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (400 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em MES/Histidina 30 mmol/L de pH 6,1 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 58,9 cm e 48,9 cm, respectivamente.

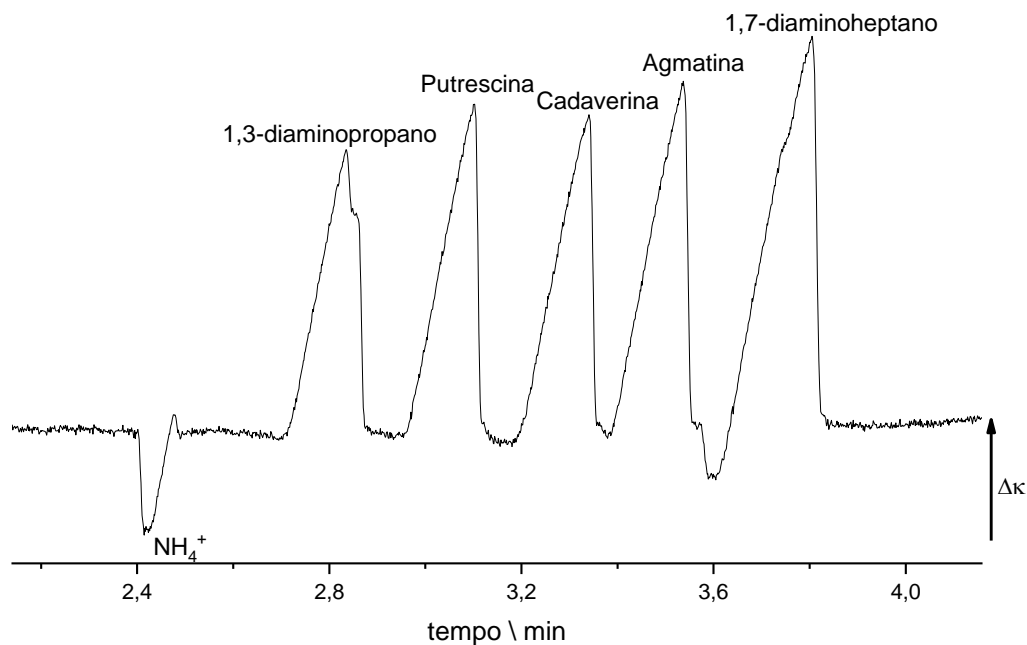


Figura 47. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em MES/Histidina 30 mmol/L, de pH 6,1.

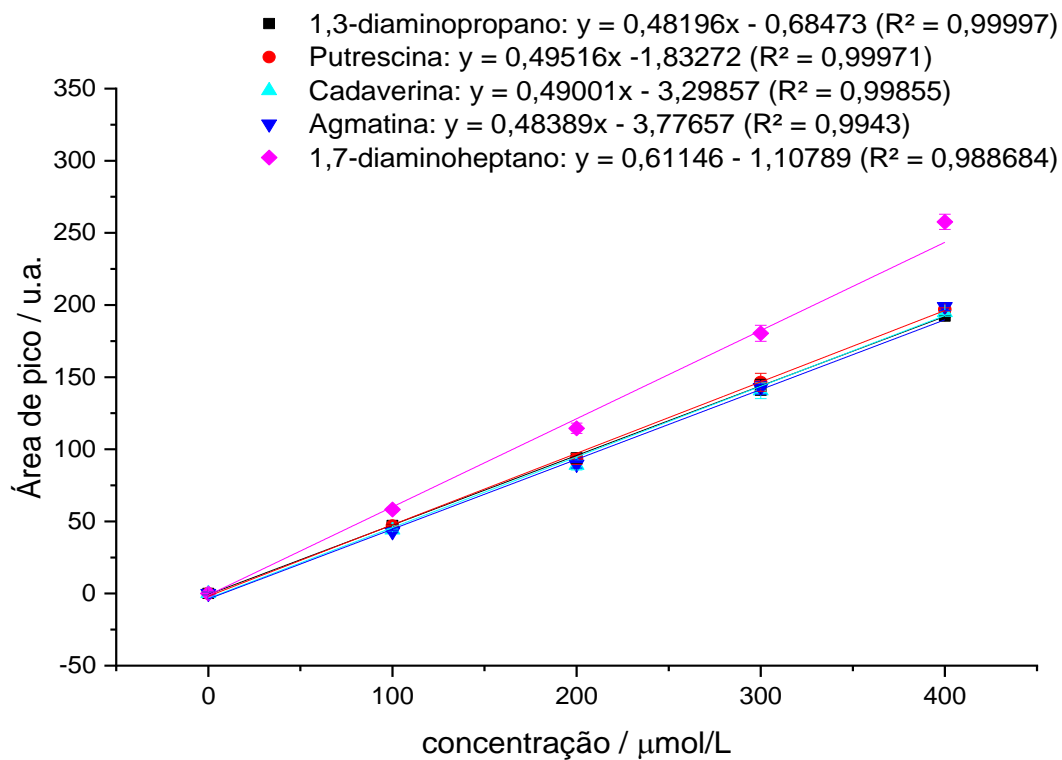
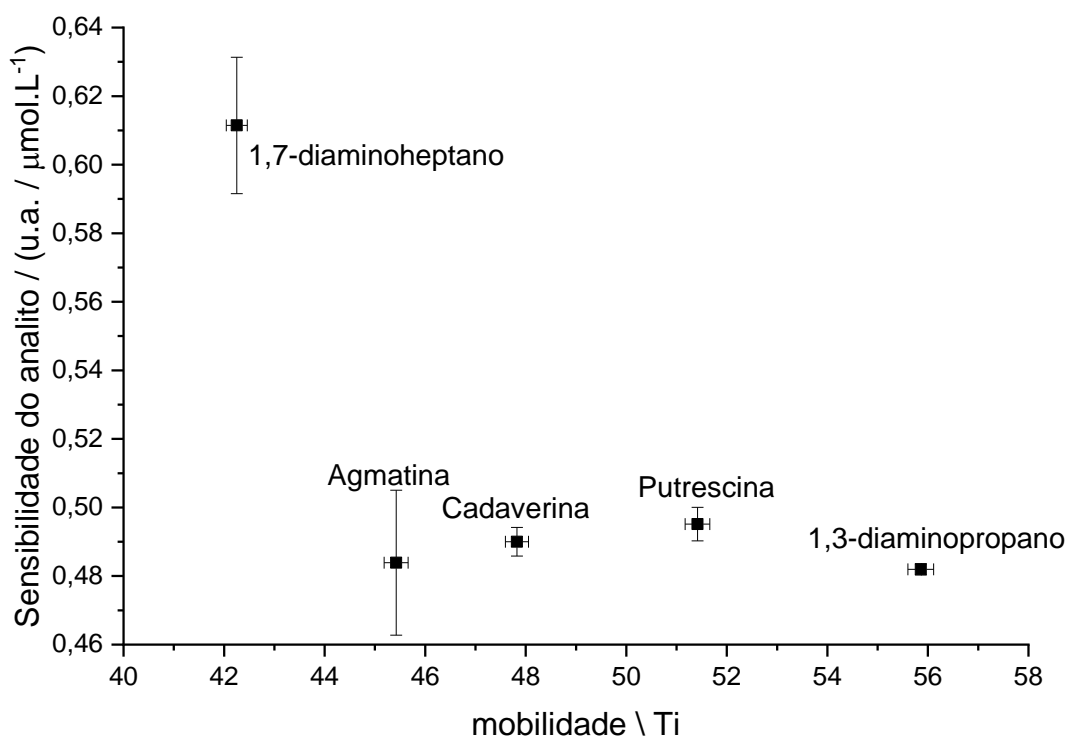


Figura 48. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas com exclusão do ponto de cadaverina. Diaminas em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.



Como pode ser visto pela Figura 48, o comportamento obtido pelas diaminas em Mes/His não é esperado para as mesmas no valor de pH estudado: as sensibilidades de 1,3-diaminopropano e 1,7-diaminoheptano são, respectivamente, menor e maior do que o previsto. Não há mudanças significativas na porcentagem de ionização, bem como na carga das espécies, que justificam o perfil totalmente diferente ao esperado. Também não há o aparecimento de picos de sistema na região de migração das espécies, de acordo com a previsão feita pelo PeakMaster. Considerando o uso do capilar revestido por PVA, pode-se pensar na possibilidade de interações entre a superfície da coluna e os constituintes do BGE, causando o efeito observado. Além disso, verificou-se que BGE de Mes/Histidina é de difícil estabilização de linha base, apresentando flutuações ao longo da análise. Por esse motivo, após cada análise foi necessário condicionar a coluna com o BGE por 5 minutos. Isto é um problema que interfere diretamente na reprodutibilidade e rapidez do método. Outro ponto a

ressaltar para o BGE é que pode estar ocorrendo decomposição de histidina ao longo das corridas gerando o íon amônio (NH_4^+), visualizado na Figura 46, podendo ser uma das causas das flutuações da linha base dos eletroferogramas.

3.3.9 Diaminas em MOPS/ Li^+

Para esta análise, utilizou-se BGE composto por MOPS e lítio 30 mmol/L de pH 7,6. De acordo com a previsão do PeakMaster, as concentrações de MOPS e sua base conjugada são 7,0 e 23,0 mmol/L. Para lítio, a concentração é de 23 mmol/L. De acordo com o Chemicalize, as espécies estariam 99% na forma ionizada, com exceção de 1,3-diaminopropano, apresentando 86,93% na forma ionizada. O eletroferograma obtido, as curvas de calibração e a curva indireta encontram-se nas Figuras 49, 50 e 51.

Figura 49. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de diaminas (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em MOPS/ Li^+ 30 mmol/L de pH 7,6 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 55,5 cm e 45,5 cm, respectivamente.

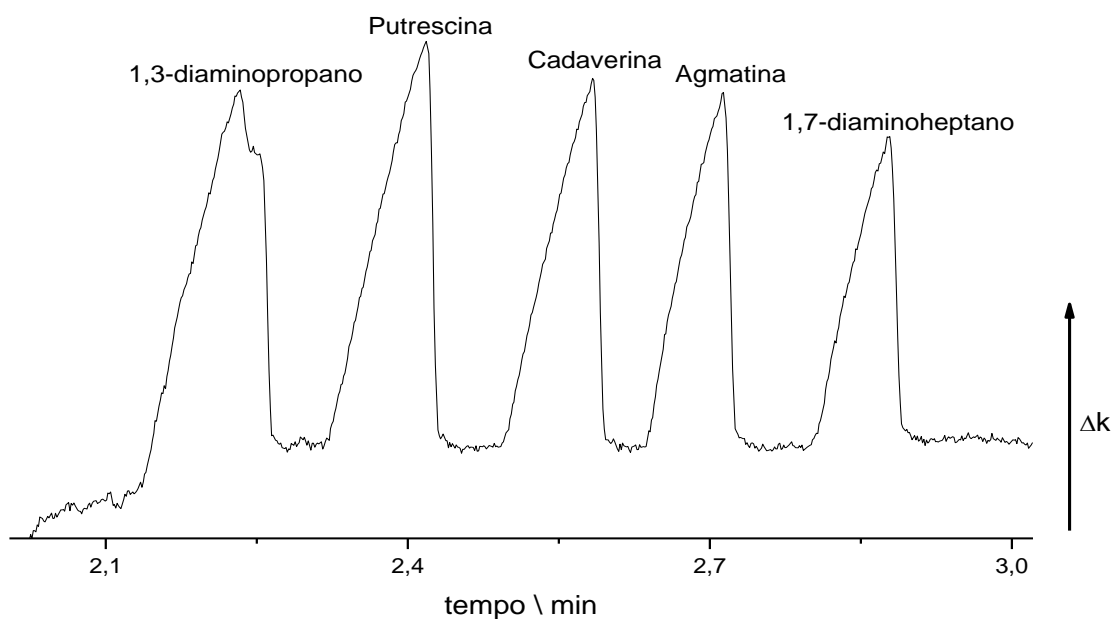


Figura 50. Curvas analíticas de calibração para as diaminas em MOPS/Li⁺ 30 mmol/L, de pH 7,6.

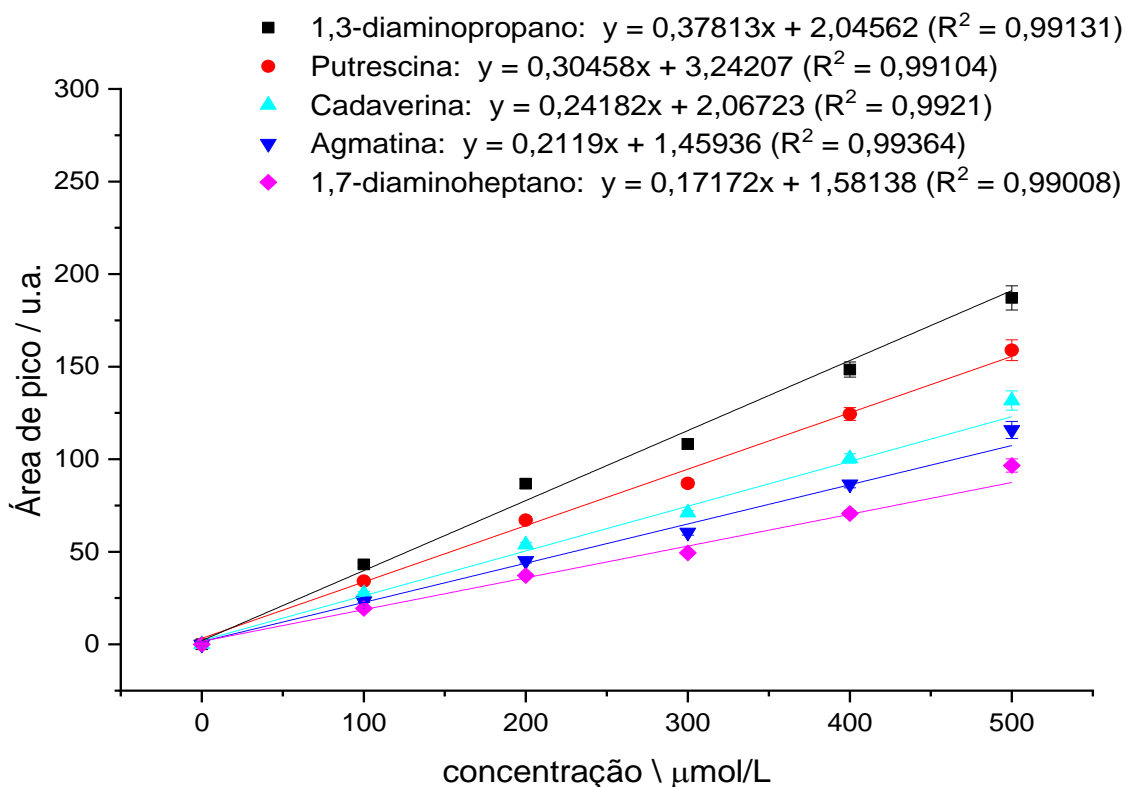
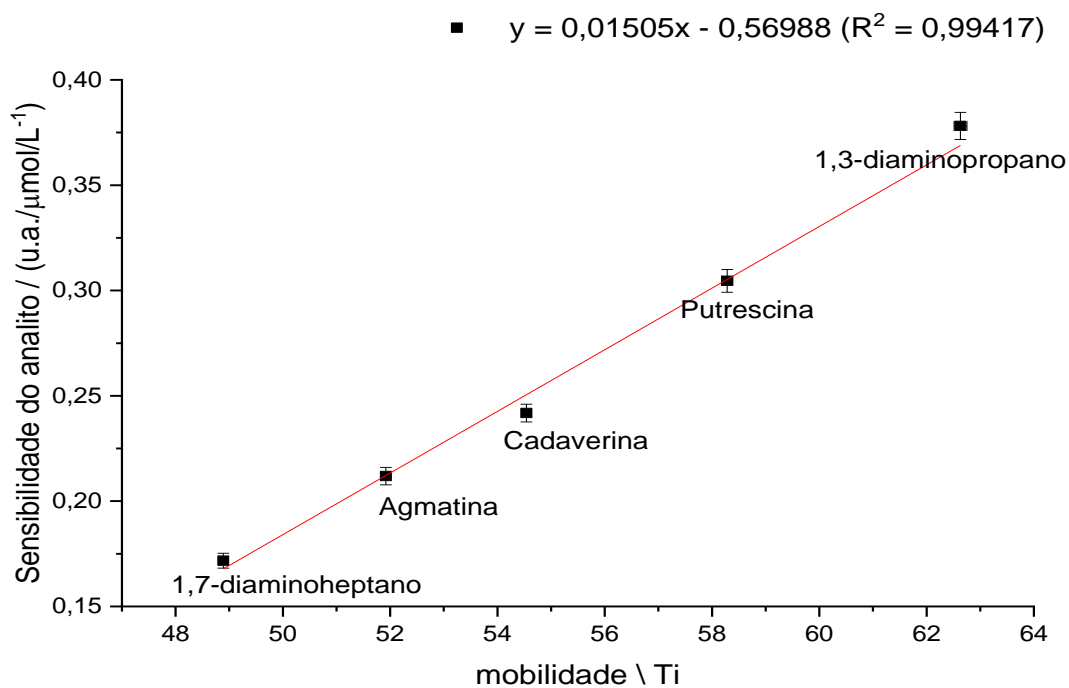


Figura 51. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Diaminas em MOPS/Li⁺ 30 mmol/L, pH 7,6.



Como pode ser visto pelos resultados apresentados, a curva indireta obtida é satisfatória e seu coeficiente de determinação é próximo de 1,0. Mesmo com o 1,3-diaminopropano apresentando porcentagem de dissociação diferente dos demais analitos, a linearidade da curva é alcançada. Portanto, essa é mais uma condição em que a equação é aceita. Os resultados para o teste t encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28. Resultados obtidos para as análises estatísticas de diaminas em MOPS/Li⁺

Analito excluído	Equação de reta ¹	Sensibilidade prevista/ (u.a./μmol.L ⁻¹)	Sensibilidade experimental/ (u.a./μmol.L ⁻¹)	Diferença de sensibilidade ²
1,3- diaminopropano	y = 0,01399x - 0,51493 (R ² = 0,99323)	0,361 ± 0,011	0,378 ± 0,006	- 0,017 ± 0,035
Putrescina	y = 0,01515x - 0,57446 (R ² = 0,99401)	0,309 ± 0,010	0,305 ± 0,005	0,004 ± 0,024
Cadaverina	y = 0,01498x - 0,56372 (R ² = 0,99806)	0,253 ± 0,009	0,242 ± 0,004	0,011 ± 0,012
Agmatina	y = 0,01507 - 0,57094 (R ² = 0,99341)	0,212 ± 0,009	0,212 ± 0,004	0 ± 0,03
1,7- diaminoheptano	y = 0,01577 - 0,61206 (R ² = 0,99525)	0,159 ± 0,009	0,172 ± 0,004	- 0,013 ± 0,030

¹ Equação de reta prevista pela exclusão do analito indicado na coluna precedente.

² Intervalo de confiança para a diferença entre a sensibilidade prevista e experimental com 95% de confiança e número de dados igual a 4.

O resultado da análise estatística do teste t mostrou que não há diferenças significativas entre os valores de sensibilidades experimentais e calculadas para os analitos.

Para continuar a investigação das diaminas com diferentes porcentagens de dissociação, pensou-se em analisá-las em valores de pH maiores. Como o capilar de PVA suporta apenas uma pequena faixa de pH do BGE sem que ocorra degradação, a alternativa é

migrar para o capilar de sílica. Porém, as diaminas apresentam extensa adsorção nesse tipo de capilar, inviabilizando a análise.

3.3.10 Cátions alcalinos em ácido acético

A série de cátions alcalinos compreende espécies positivas totalmente ionizadas e com cargas monovalentes. O BGE de ácido acético é o mesmo que foi utilizado para a análise das diaminas. O estudo dessas espécies se inicia com uma simulação pelo PeakMaster, onde o eletroferograma é visualizado na Figura 52. Ao tratar os dados obtidos da simulação e colocando as áreas dos picos em função das mobilidades dos analitos, obtêm-se a curva visualizada na Figura 53.

Figura 52. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos utilizando como BGE ácido acético 0,5 mol/L (pH 2,5). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 59,2 cm e 49,2 cm, respectivamente.

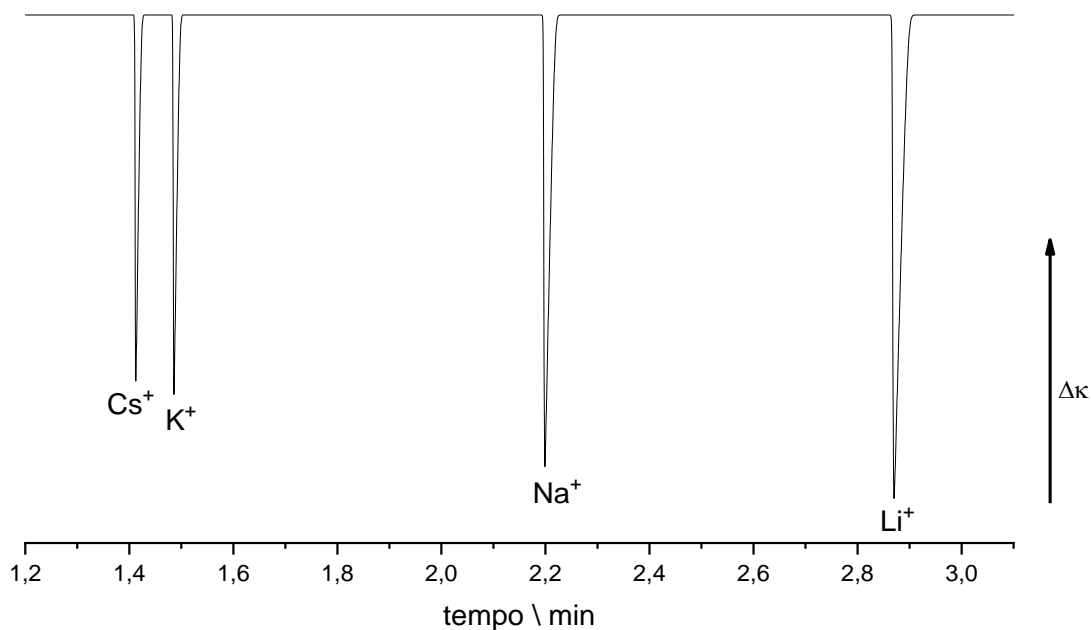
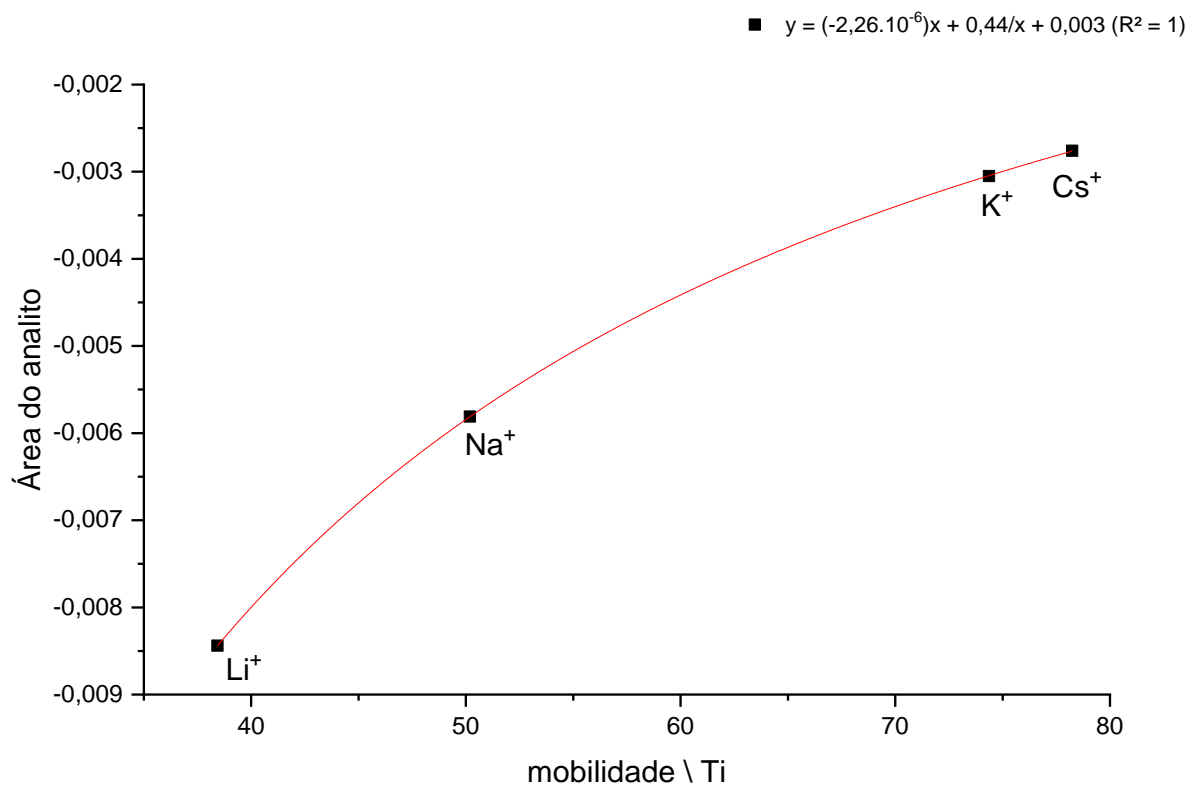


Figura 53. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5. Resultado obtido por simulação.



Como pode ser visto na Figura 53, o conjunto de pontos não apresentam comportamento linear. Ao ajustar os pontos à Equação 14, verifica-se que o conjunto de pontos se ajusta perfeitamente ao modelo matemático, confirmado pelo coeficiente de determinação próximo de 1,0. Esse resultado atesta novamente a ideia de que, mesmo em condições diferentes das propostas pela Equação 14, o modelo matemático também é válido. Logo, espera-se encontrar o mesmo perfil em análises reais. Nas Figuras 54, 55 e 56 encontram-se o eletroferograma obtido na análise, as curvas de calibração para as espécies e a curva indireta de sensibilidade em função das mobilidades, respectivamente.

Figura 54. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de cátions alcalinos (400 μM). O experimento foi realizado em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de PVA de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 59,2 cm e 49,2 cm, respectivamente.

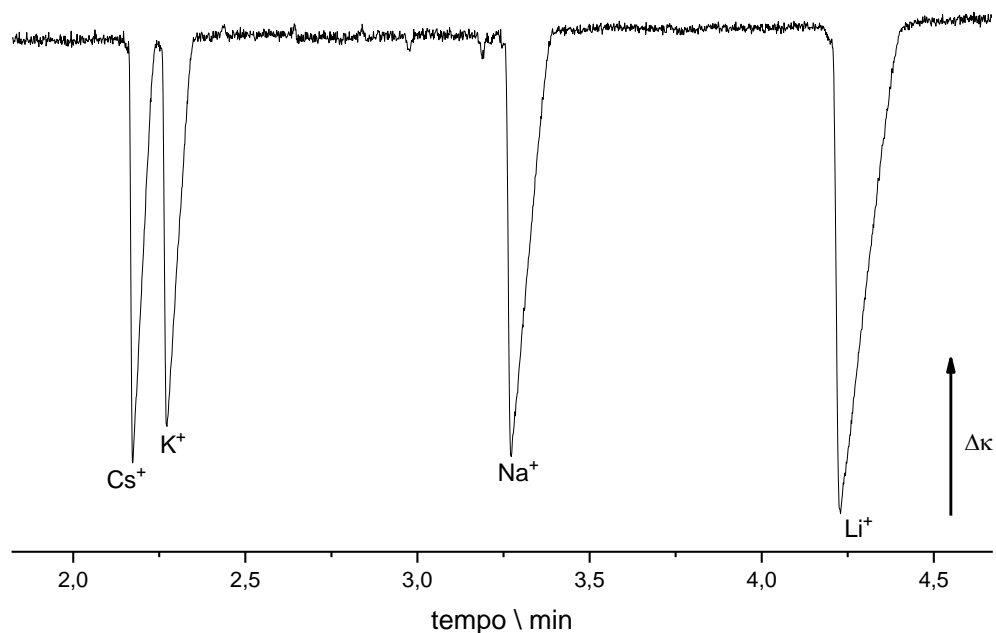


Figura 55. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5.

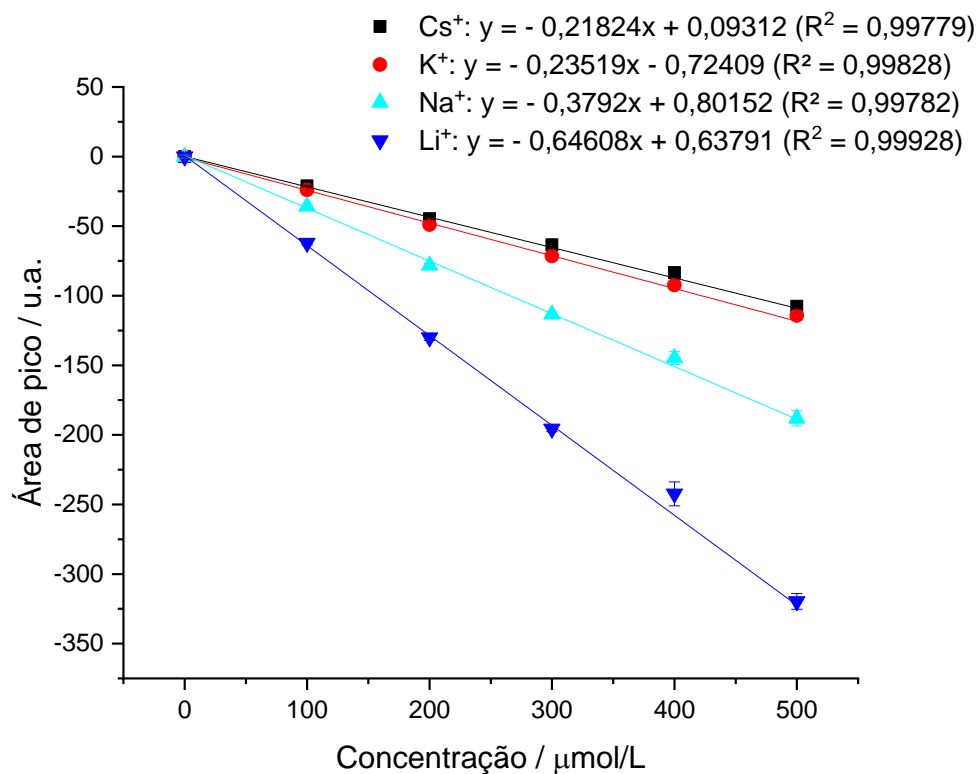
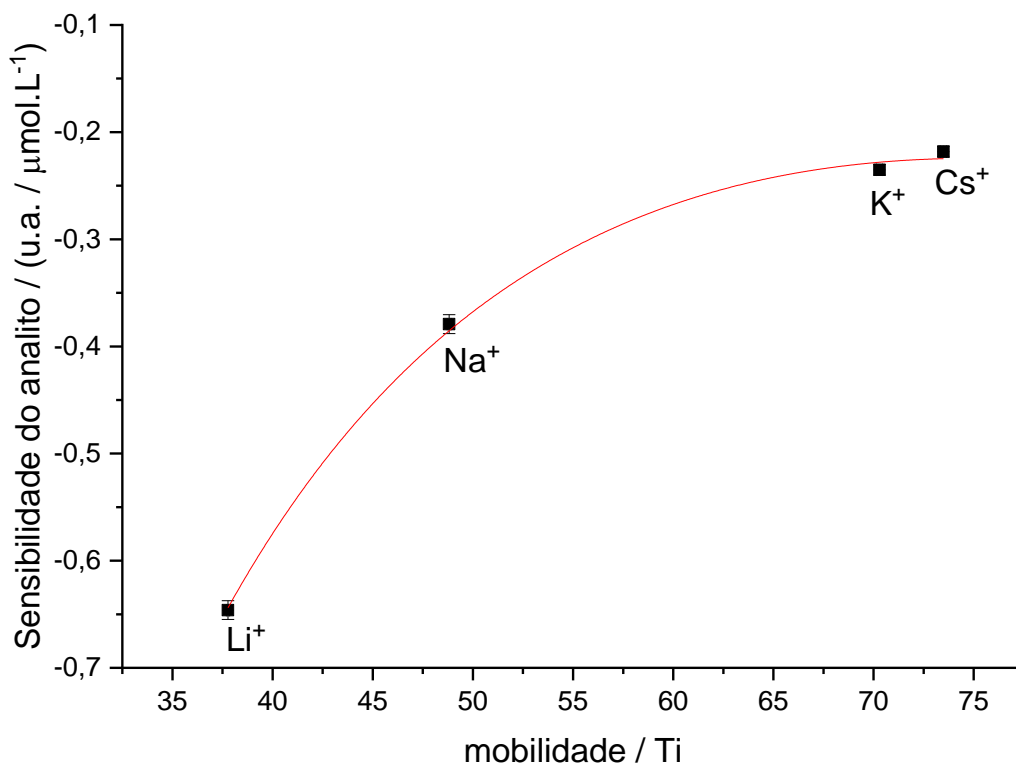


Figura 56. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.

$$\blacksquare \quad y = -0,0114x - 64,2/x + 1,48 \quad (R^2 = 0,99796)$$



Como pode ser visualizado na Figura 56, o perfil esperado é o mesmo obtido pela simulação, bem como o ajuste à Equação 14.

3.3.11 Cátions alcalinos em MES/Histidina

A investigação da série de cátions alcalinos em BGE de MES/Histidina 30 mmol/L se inicia com uma simulação pelo PeakMaster, visualizando o eletroferograma e a curva indireta nas Figuras 57 e 58.

Figura 57. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos utilizando como BGE MES/Histidina 30 mmol/L (pH 6,1). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 57,4 cm e 47,4 cm, respectivamente.

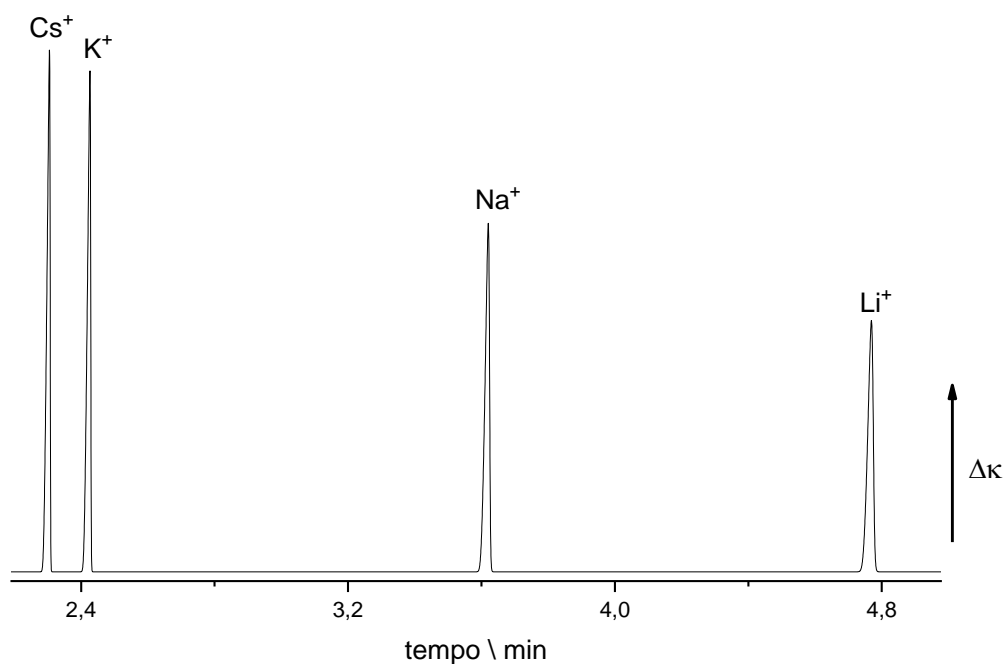
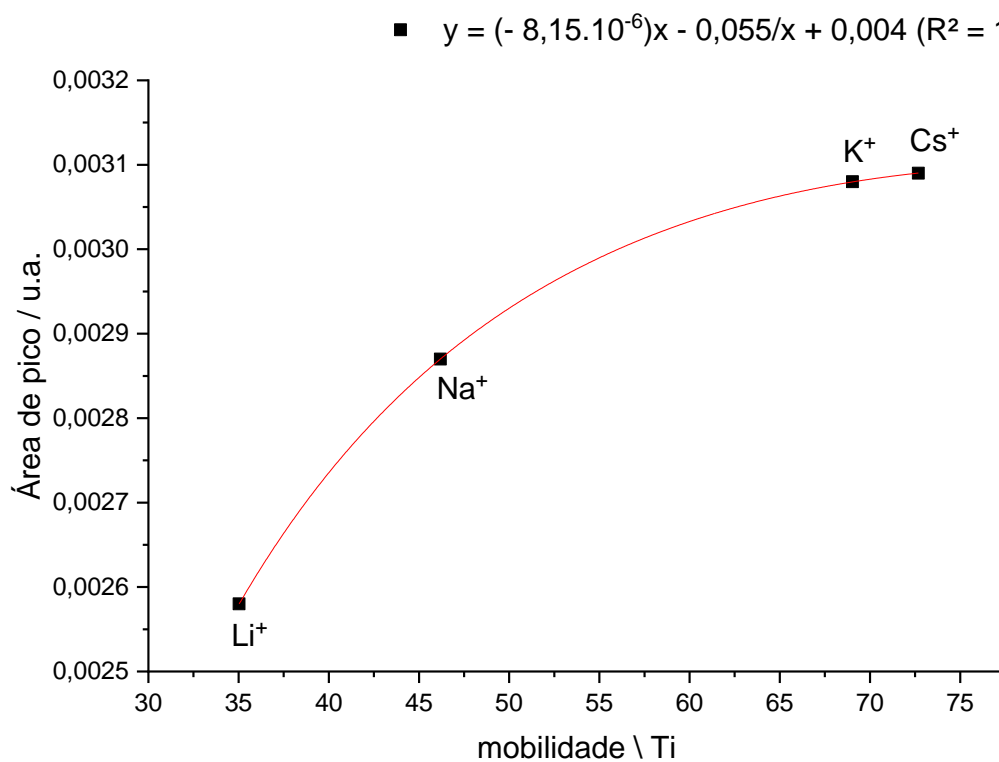
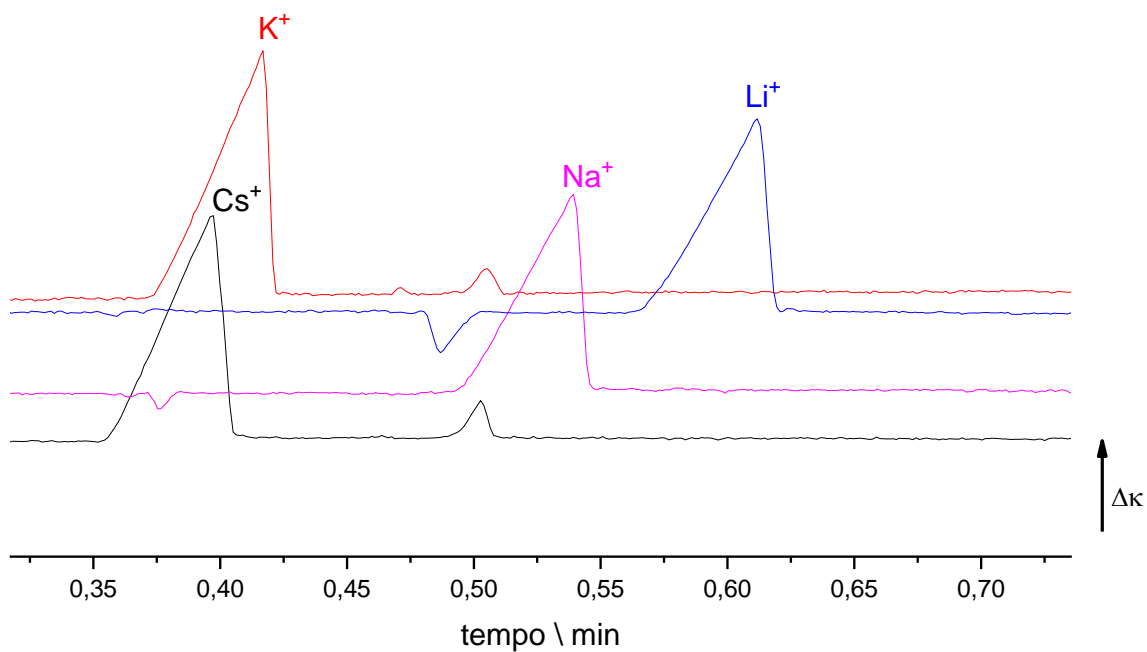


Figura 58. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos em MES/Histidina 30 mmol/L (pH 6,1). Resultado obtido por simulação.

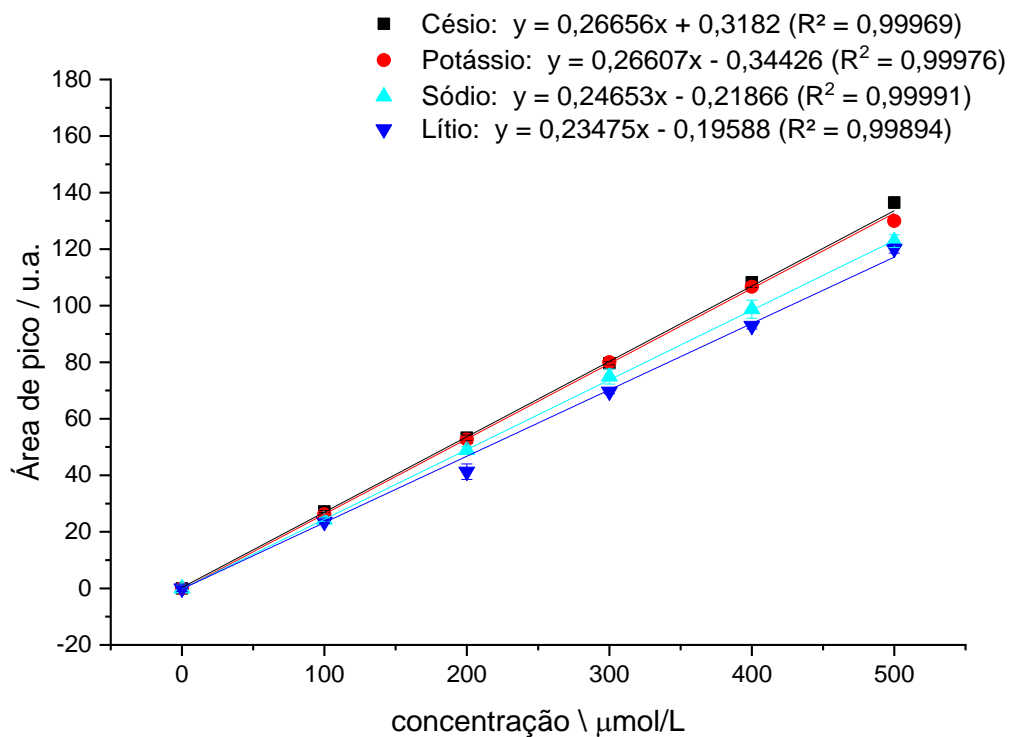
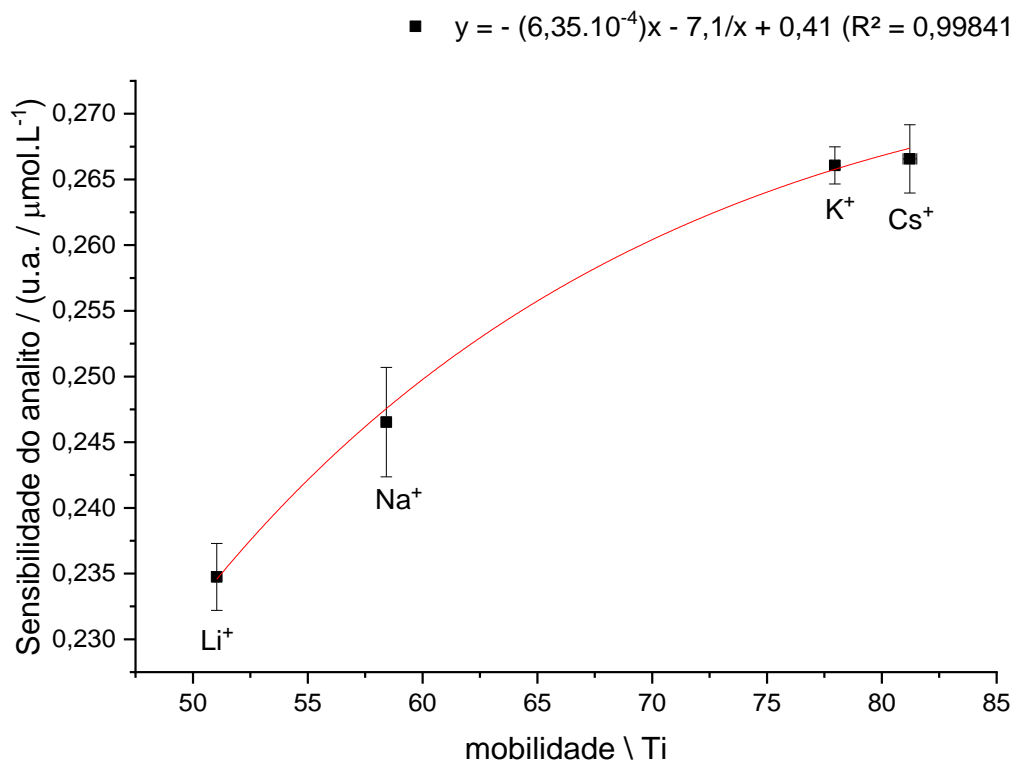


Assim como foi exposto no experimento anterior, cátions alcalinos não seguem o comportamento linear, utilizando o ajuste pela Equação 14. Nas Figuras 59, 60 e 61 encontram-se o eletroferograma, as curvas de calibração e a curva indireta de sensibilidade em função das mobilidades, respectivamente.

Figura 59. Eletroferograma obtido no primeiro detector de cátions alcalinos (500 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em MES/Histidina 30 mmol/L de pH 6,1 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 57,4 cm e 10 cm, respectivamente.



6,1.

Figura 60. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos em MES/Histidina 30 mmol/L, de pH**Figura 61.** Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos em MES/Histidina 30 mmol/L, pH 6,1.

A fim de reduzir o tempo de análise optou-se por realizar as análises utilizando a detecção no primeiro detector, sendo necessário injetar os analitos separadamente. Como pode ser visualizado na Figura 61, o perfil esperado é o mesmo obtido pela simulação, obedecendo ao ajuste hiperbólico (Equação 14).

3.3.12 Cátions alcalinos em ácido fórmico

A investigação da série de cátions alcalinos em BGE de ácido fórmico 50 mmol/L se inicia com uma simulação pelo PeakMaster, visualizando o eletroferograma e a curva indireta nas Figuras 62 e 63.

Figura 62. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos utilizando como BGE ácido fórmico 50 mmol/L (pH 2,5). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 51,7 cm e 41,7 cm, respectivamente.

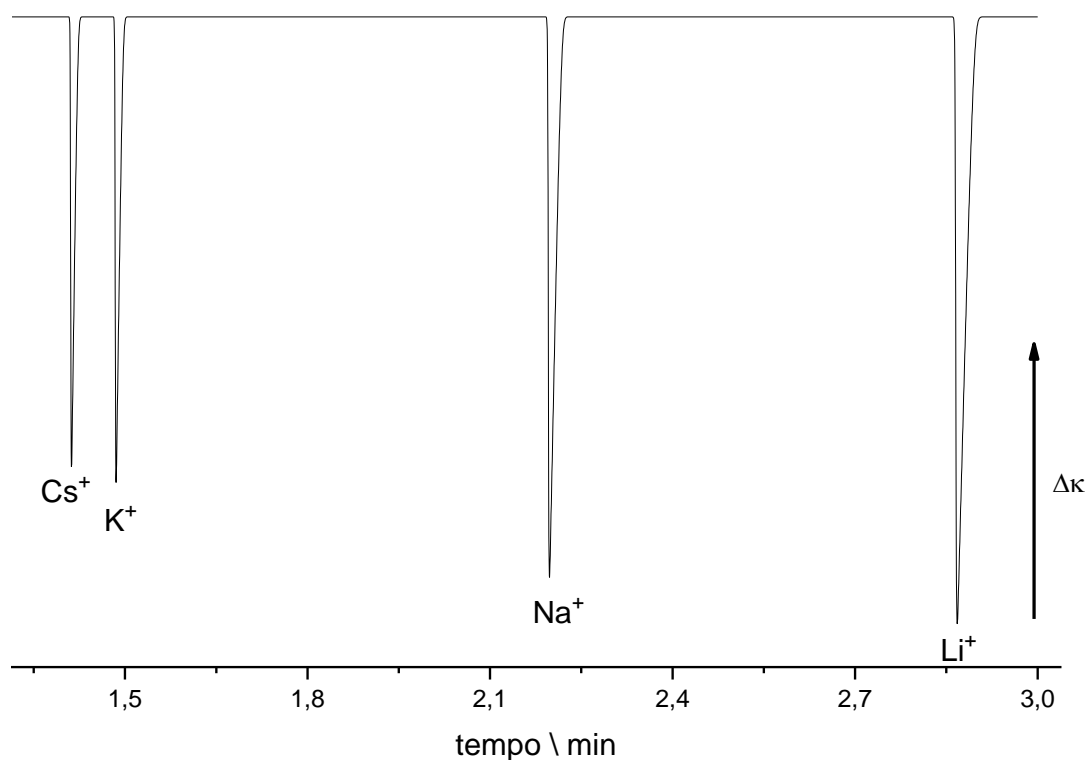
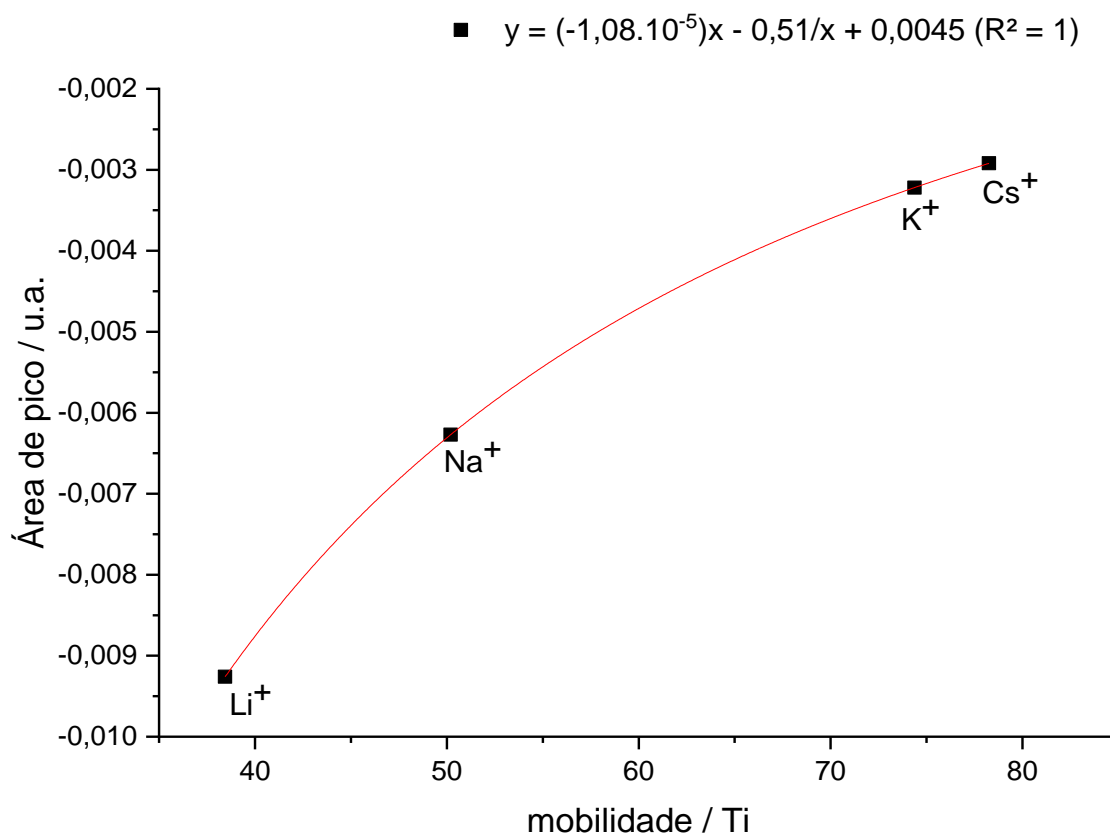


Figura 63. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos em ácido fórmico 50 mmol/L (pH 2,5). Resultado obtido por simulação.



Como pode ser visualizado na Figura 63, o comportamento é similar aos experimentos com outros BGEs. Nas Figuras 64, 65 e 66 encontram-se o eletroferograma, as curvas de calibração para as espécies e a curva indireta de sensibilidade em função das mobilidades, respectivamente.

Figura 64. Eletroferograma obtido no segundo detector da mistura de padrões de cátions alcalinos (400 $\mu\text{mol/L}$). O experimento foi realizado em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5 a +30 kV com tempo de injeção igual a 5s em pressão de 25 kPa. Coluna capilar de sílica de 50 μm d.i. Comprimento total da coluna e distância até detector: 51,7 cm e 41,7 cm, respectivamente.

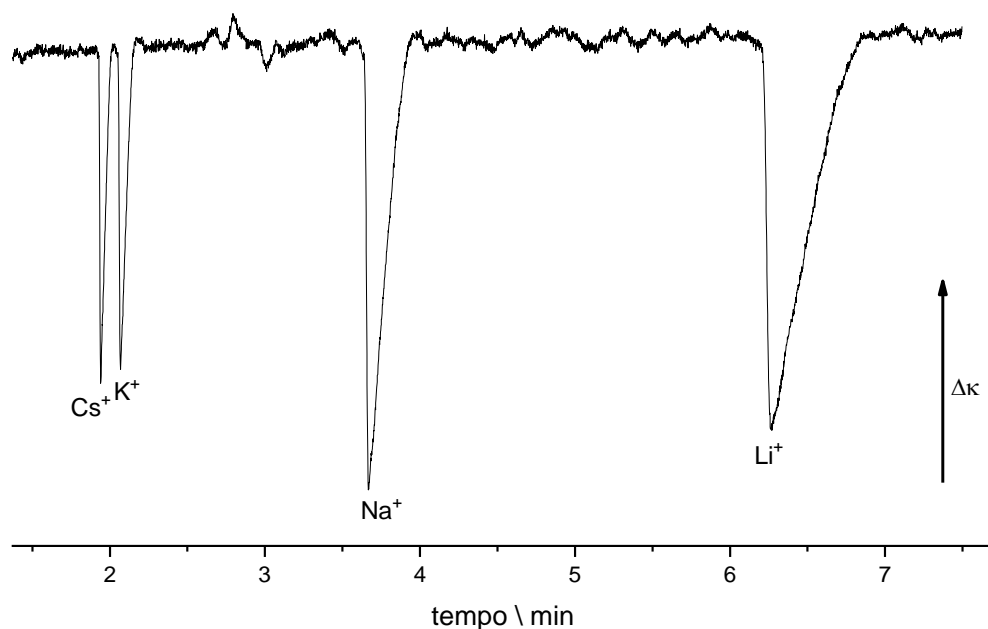


Figura 65. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos em ácido fórmico 50 mmol/L, de pH 2,5.

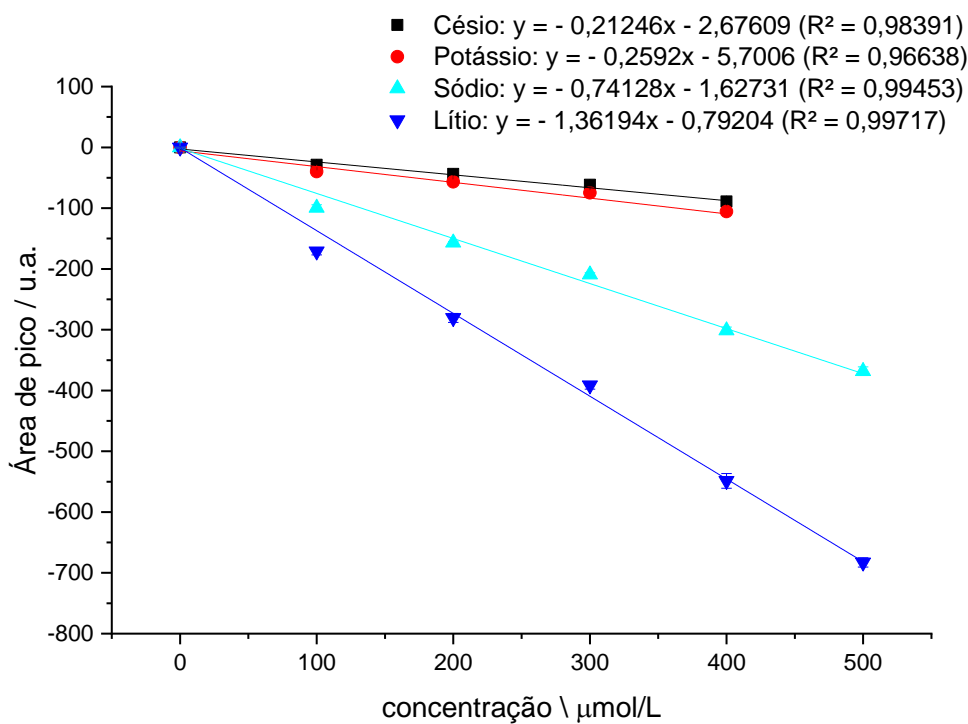
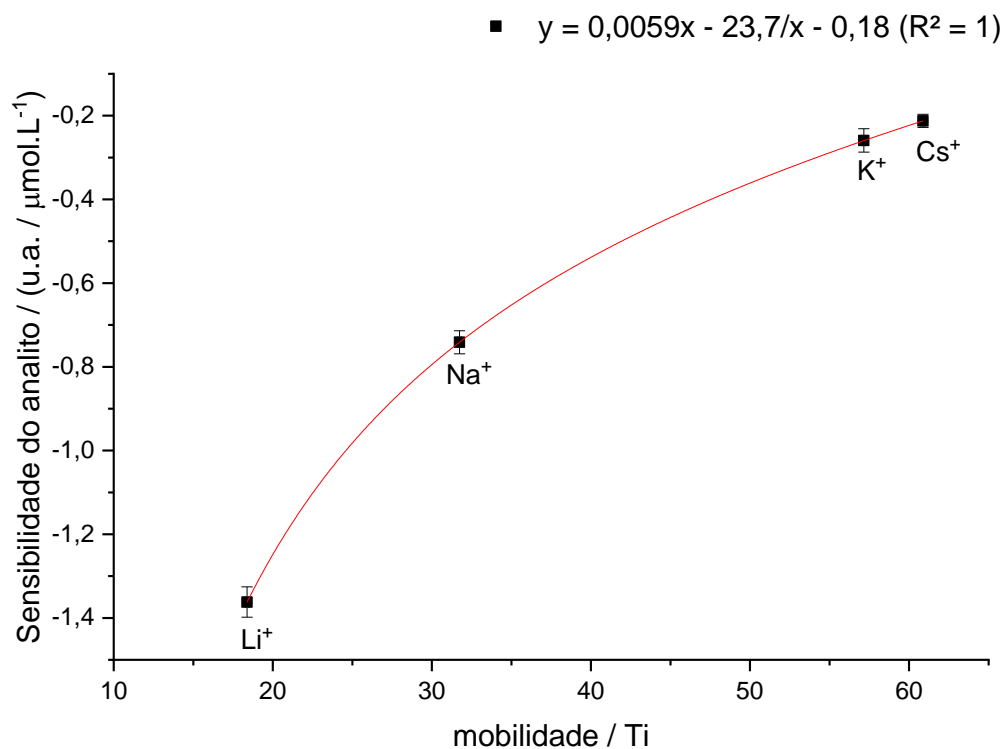


Figura 66. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos em ácido fórmico 50 mmol/L, pH 2,5.

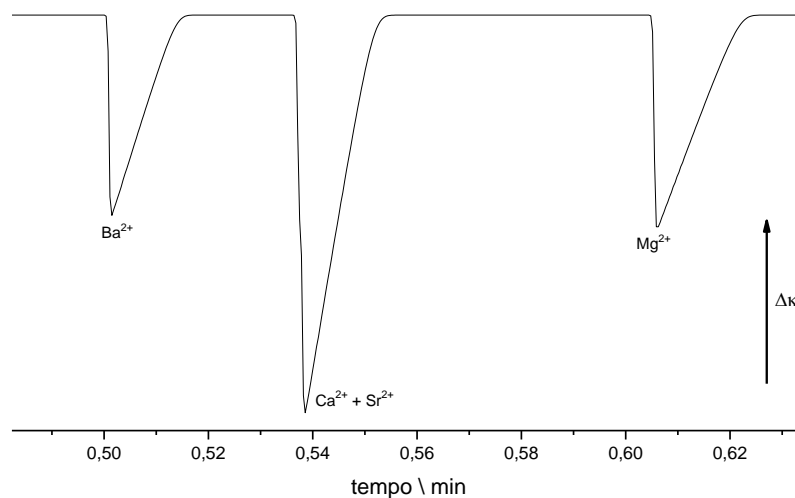


Para a construção das curvas de calibração de céσιο e potássio utilizou-se a faixa de concentração de 0 a 400 $\mu\text{mol/L}$. Como pode ser observado na Figura 66, o conjunto de pontos ajusta-se à Equação 14, sendo o perfil esperado para as espécies neste BGE é idêntico ao observado em simulação pelo PeakMaster.

3.3.13 Cátions alcalinos terrosos em ácido acético

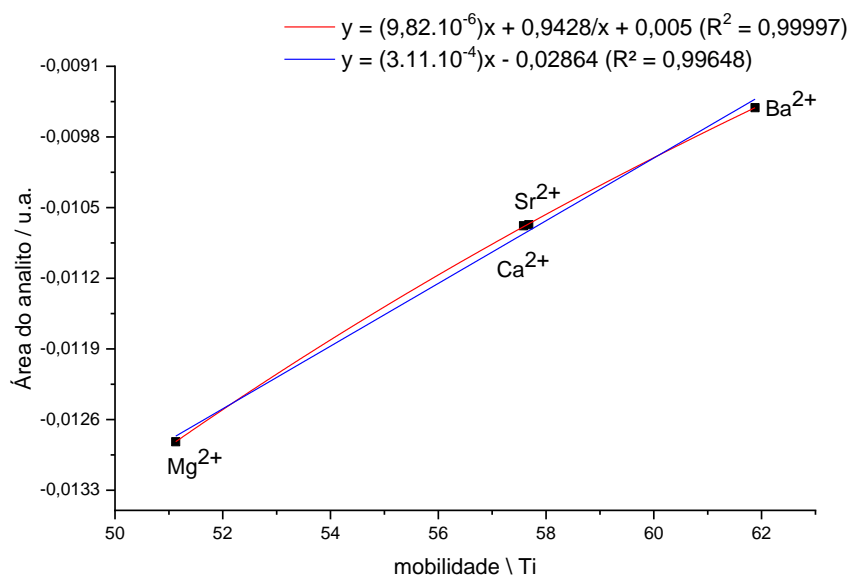
A série de cátions alcalinos terrosos compreende espécies positivas totalmente ionizadas e com cargas divalentes. O BGE de ácido acético é o mesmo que foi utilizado para a análise das diaminas e de cátions alcalinos. O estudo dessas espécies se inicia com uma simulação pelo PeakMaster, sendo o eletroferograma visualizado na Figura 67.

Figura 67. Eletroferograma obtido por meio da simulação da série de cátions alcalinos terrosos utilizando como BGE ácido acético 0,5 mol/L (pH 2,5). Potencial: +30 kV. Comprimento total da coluna e distância até detector: 61 cm e 10 cm, respectivamente.



Como pode ser visto na Figura 67, estrôncio e cálcio apresentam mobilidades muito próximas, representadas pela sobreposição dos picos. Ao tratar os dados obtidos da simulação e colocar as áreas dos picos em função das mobilidades dos analitos, obtêm-se a curva visualizada na Figura 68.

Figura 68. Área de pico em função da mobilidade de cátions para os cátions alcalinos terrosos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5. Resultado obtido por simulação.



O conjunto de pontos apresentado pela Figura 68 foi ajustado tanto pelo modelo linear quanto pela Equação 14 (modelo hiperbólico), sendo o último apresentando maior valor de coeficiente de determinação (R^2). Espera-se encontrar perfil semelhante nas análises reais. Nas Figuras 69 e 70 encontram-se as curvas de calibração para as espécies e a curva indireta de sensibilidade em função das mobilidades.

Figura 69. Curvas analíticas de calibração para cátions alcalinos terrosos em ácido acético 0,5 mol/L, de pH 2,5.

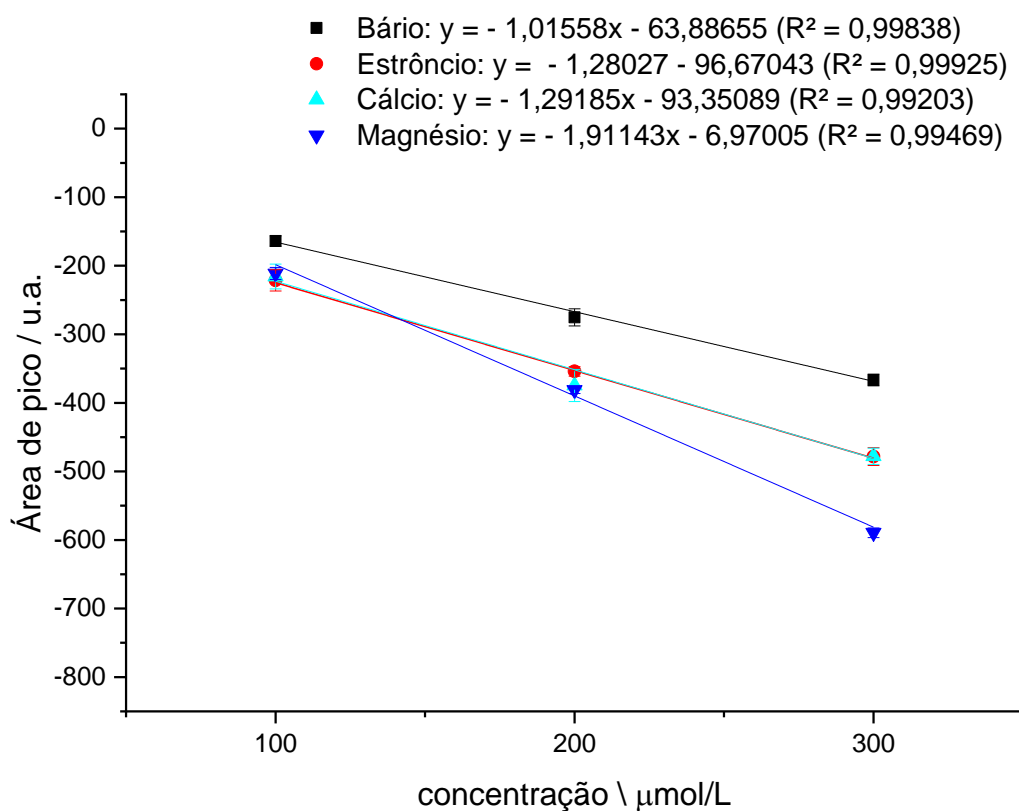
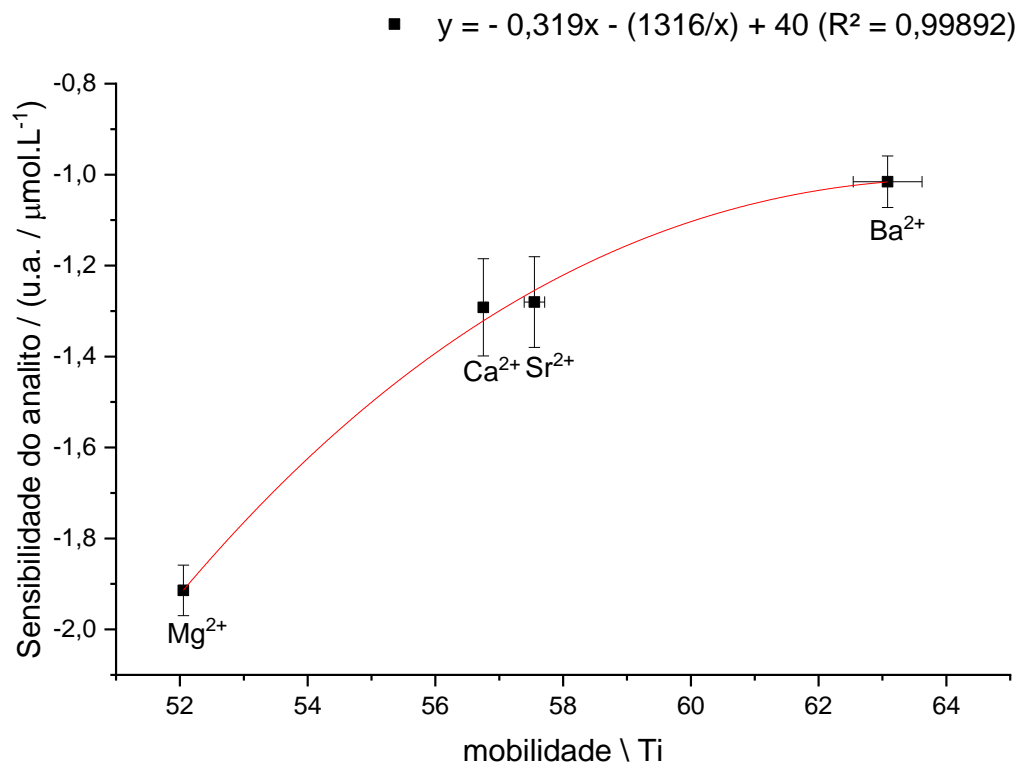


Figura 70. Curva analítica de calibração indireta de sensibilidade do analito em função da mobilidade das espécies utilizadas. Cátions alcalinos terrosos em ácido acético 0,5 mol/L, pH 2,5.



Para a construção das curvas de calibração, excluíram-se os pontos 0, 400 e 500 $\mu\text{mol/L}$, pois estavam fora da faixa linear de concentração.

Para a curva de calibração indireta, apresentada na Figura 69, verifica-se que o perfil obtido experimentalmente é diferente do simulado: a disposição dos pontos é diferente do que foi apresentado na Figura 68, sendo melhor ajustado pela Equação 14 (modelo hiperbólico), além da diferença entre as mobilidades de estrôncio e cálcio serem maiores. Sendo assim, este é mais um caso pode ser ajustado adequadamente à Equação 14 mesmo com condições distintas (analitos duplamente carregados e BGE parcialmente ionizado).

4. Conclusões e Perspectivas

Os resultados experimentais sobre os analitos monocarregados corroboram tanto o modelo matemático analítico, quanto as simulações. Sendo uma função suave em ampla faixa de mobilidade, a sensibilidade varia de forma linear para um pequeno intervalo. Assim, utilizando ao menos duas espécies com mobilidades próximas, é possível obter por interpolação a calibração de um C^4D .

Embora não tenha sido obtida uma formulação analítica para outras combinações de carga efetiva para analitos e íons do BGE, as simulações numéricas sugerem comportamento similar àquele das espécies monocarregadas. Mais uma vez, os resultados experimentais também corroboram o modelo matemático.

A adoção do modelo linear utilizando-se apenas duas espécies calibrantes padece de duas limitações: (1) a região efetivamente linear nas imediações da mobilidade do analito depende do BGE escolhido e da mobilidade do analito, não podendo, assim, ser generalizada a priori uma margem de mobilidade; (2) se uma das espécies calibrantes apresentar alguma anomalia, a interpolação ficará comprometida. Neste último caso, podemos considerar o que foi observado para as diaminas analisadas em MES/histidina.

Desta forma duas recomendações gerais deveriam ser adotadas durante o desenvolvimento de um método para calibração indireta: (1) não apenas duas, mas três ou mais candidatos a calibrante deveriam ser utilizados para se averiguar a linearidade de comportamento e prevenir o impacto que seria causado por uma espécie cuja mobilidade apresente comportamento anômalo; (2) embora a equação 14 seja válida para espécies monocarregadas, os resultados obtidos sugerem que este modelo, que inclui uma contribuição hiperbólica da mobilidade, seja válido para outras condições e poderia, portanto, ser utilizado mesmo quando o comportamento linear não seja observado. Obviamente, se após esta etapa

de etapa do desenvolvimento do método for observado que o modelo linear com dois calibrantes seja adequado, seria possível adotá-lo como prática diária de análise.

Uma limitação de ordem prática para aplicação da calibração indireta é a seleção de espécies candidatas. Uma estratégia global consistiria inicialmente em se determinar experimentalmente – ou calcular – a carga efetiva do analito e se obter sua mobilidade. De posse destas informações, seria possível recorrer a um banco de dados com informações sobre os candidatos. Porém, este banco de dados não existe de forma efetiva, o que acaba por demandar um longo processo de busca e testes. Além disso, vale lembrar que outras qualidades dos candidatos devem ser consideradas, como estabilidade química, grau de pureza, preço e disponibilidade.

Assim, como perspectivas para este trabalho, visualizamos a criação de bancos de dados de calibrantes e o desenvolvimento de espécies padrão projetadas. Neste último caso, vislumbramos a possibilidade da utilização de síntese de peptídeos com unidades monoméricas adequadas para se atingir tamanho e carga similares aos do analito.

Também como perspectiva há a avaliação de outras estratégias de detecção. Tomando-se por base que a banda que contém o analito durante a separação eletroforética é formada por um processo competitivo de migração das diversas espécies contidas na amostra e no BGE, é possível que a variação da concentração de uma das espécies do BGE possa ser utilizada em um procedimento análogo ao proposto neste estudo. Isto poderia ser aplicado, por exemplo, à detecção espectrofotométrica indireta.

Referências Bibliográficas

BRITO-NETO, J. G., *et al.* Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.

ChemAxon. **Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions**. Hungria, 1998. Disponível em: <https://chemicalize.com/>. Acesso em: 15 Mai. 2018.

COLOMBARA, R., *et al.* Determinação Simultânea de Ânions por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.

COLTRO, W. K. T. **Detecção condutométrica sem contato: uma nova ferramenta para monitoramento de interações biomoleculares em micro sistemas analíticos**. 2008. 248 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

DANIEL, D., *et al.* Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1416, n. p. 121-128, 2015.

DIBENEDETTO, A., *et al.* On the existence of the elusive monomethyl ester of carbonic acid [CH₃OC(O)OH] at 300 K: H-1- and C-13 NMR measurements and DFT calculations. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 908-913, 2006.

FRACASSI DA SILVA, J. A.; DO LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, 1998.

FRANCISCO, K.; DO LAGO, C. L. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **Electrophoresis**, v. 30, n. 19, p. 3458-3464, 2009.

FRANCISCO, K.; DO LAGO, C. L. A capillary electrophoresis system with dual capacitively coupled contactless conductivity detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 37, n. 12, p. 1718-1724, 2016.

GAS, B., *et al.* Prediction and understanding system peaks in capillary zone electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 10, p. 1435-1445, 2007.

HARRIS, D. C. Estatística. In: **Análise Química Quantitativa**. Tradução: Oswaldo Esteves Barcia e Júlio Carlos Afonso. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora SA, 2012. cap. 4, p. 72-80.

HJERTÉN, S. Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, v. 9, n. 2, p. 122-143, 147-219, 1967.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação Simultânea de Cátions por Eletroforese Capilar: Fundamentos e Aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1298-1302, 1981.

KHALEDI, M. G. **High Capillary Electrophoresis Technology**. Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications. vol. 146. Estados Unidos: Dekker, 1993. 1047 p.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary Electrophoresis: Principles and Practice**. 1 ed. Berlim, Alemanha: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1993. 375 p.

LUCY, C. A.; WU, Q. Characteristics and Calibration of Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 36, n. p. 33-36, 1998.

OHLWEILER, O. A. Condutometria. In: **Fundamentos de Análise Instrumental**. Tradução. 1. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1981. cap. 13, p. 327-345.

OLIVEIRA, M. A. L., *et al.* Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 821-824, 2003.

Group of Electromigration Separation Process. **PeakMaster**. Praga, 2000. Disponível em: <http://web.natur.cuni.cz/gas/peakmaster.html>. Acesso em: 22 Mar. 2017.

ROSSI, M. R., *et al.* Monoalkyl carbonates in carbonated alcoholic beverages. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 352-357, 2012.

SAITO, R. M., *et al.* Ionic mobility of the solvated proton and acid–base titration in a four-compartment capillary electrophoresis system. **Analytical Methods**, v. 2, n. 2, p. 164-170, 2010.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TISELIUS, A. **The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins**. 1930. 107 p. Tese (Doutorado) - Uppsala University, Uppsala, Sweden, 1930.

U. KATZMAYR, M., *et al.* **Optimization of conductivity detection of low-molecular-mass anions in capillary zone electrophoresis.** vol. 850. 1999. 355-362 p.

VANDAVEER, W. R., *et al.* Recent Developments in Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 21-22, p. 3528-3549, 2004.

VIDAL, D. T. R. **Investigação por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato sobre a formação e as propriedades de monoalquil carbonatos em meio aquoso.** 2011. 164 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

VIDAL, D. T. R., *et al.* Investigating the formation and the properties of monoalkyl carbonates in aqueous medium using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 32, n. 8, p. 850-856, 2011.

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: Michele Alves Santana

E-mail: michele.santana1270@gmail.com

Data de Nascimento: São Paulo, 03 de maio de 1992.

Formação acadêmica/titulação

2017 – 2020: Mestrado em Química (Química Analítica)

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

Título: Sistematização da Estratégia de Calibração Indireta para Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica

2017 – atual: Graduação em Bacharelado em Química com ênfase em Química

Ambiental e Licenciatura em Química

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

2011 – 2016: Graduação em Farmácia-Bioquímica

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.

Título: Determinação de sulfonamidas e seus produtos de degradação empregando Eletroforese Capilar acoplada a Espectrometria de Massas

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago.

2010 - interrompida: Graduação em Farmácia

Centro Universitário São Camilo, CUSC, São Paulo, Brasil.

Ano de interrupção: 2011

2007 – 2009: Ensino Médio

Escola Estadual Rui Bloem. São Paulo, Brasil.

Formação Complementar

1º semestre de 2019: Monitora na disciplina de Química Analítica II para o curso de Química. (Carga horária: 144h).

2º semestre de 2018: Monitora na disciplina de Química Analítica II para o curso de Química. (Carga horária: 144h).

1º semestre de 2018: Monitora na disciplina de Química Analítica Instrumental para Oceanografia. (Carga horária: 144h).

Março de 2014: Interpretação de Espectros de Massas. (Carga horária: 8h). Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil.

2008 – 2009: Gestão de Pequenas Empresas. (Carga horária: 800h). Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

Atuação Profissional

1. Universidade de São Paulo – USP

2017 – 2020: Vínculo: Bolsista. Enquadramento Funcional: Aluno de pós-graduação/Bolsista CNPq. Carga horária: 40h.

Atividades:

02/2019 – 06/2019: Monitora na disciplina de Química Analítica II para o curso de Química. Estágio voluntário.

08/2018 – 12/2018: Monitora na disciplina de Química Analítica II para o curso de Química. Estagiária do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE - USP).

02/2018 – 06/2018: Monitora na disciplina de Química Analítica Instrumental para Oceanografia. Estagiária do Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE - USP).

2015 – 2016: Vínculo: Bolsista PIBIC. Enquadramento Funcional: Estagiária de Iniciação Científica. Carga horária: 20h.

2015 – 2015: Vínculo: Bolsista. Enquadramento Funcional: Monitoria Pró-aluno da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Carga horária: 25h.

2012 – 2014: Vínculo: Bolsista FAPESP. Enquadramento Funcional: Estagiária de Iniciação Científica. Carga horária: 20h. Regime: Dedicção exclusiva.

2. Hexag Medicina

2015 – 2017: Vínculo: Outros. Enquadramento Funcional: Monitor de Química. Carga horária: 8h.

2017 – atual: Vínculo: Celetista. Enquadramento Funcional: Monitor de Química. Carga horária: 6h.

3. Hospital do Servidor Público Municipal, HSPM/SP

2015 – 2015: Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário de Farmácia Hospitalar, Carga horária: 25h.

Produção bibliográfica

Vidal, Denis Tadeu Rajh; Santana, Michele Alves; Hotta, Guilherme Minoru; Godoi, Marla Narciso; Eberlin, Marcos Nogueira; do Lago, Claudimir Lucio. **Probing the formation of monoalkyl carbonates and pyrocarbonates in water with electrospray ionization mass spectrometry.** *RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences*, v. 3, p. 18886-18893, 2013.

Apresentações de Trabalho

Santana, Michele Alves; do Lago, Claudimir Lucio. *Calibração Indireta em Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica*. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Outras produções bibliográficas

Daniel, Daniela; Santana, Michele Alves; do Lago, Claudimir; dos Santos, Vagner Bezerra. *Determination of Sulfonamides in Commercial Veterinary Formulations by CE-MS/MS*. 2016. (Application note).

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 25th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. *Indirect Calibration in Capillary Electrophoresis with Conductivity Detection*. 2019. (Congresso).

2. 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica. *Calibração Indireta em Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica*. 2018. (Congresso).

3. 24º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP (Siicusp). *Desenvolvimento de método analítico para análise de sulfonamidas por CE-MS*. 2016. (Simpósio).

4. Workshop em Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos: Atualização e Tendências. 2013. (Encontro).

5. II Workshop Internacional de Eletroforese Capilar e Tecnologia de Microchip. 2012. (Encontro).

Resumos publicados em anais de congressos

1. LAGO, C.L.; Vidal, D.T.R.; dos Santos, V.B.; FRANCISCO, K. J.; NICOLAI, L. G.; SANTANA, M.A.; Daniel, D. *Capillary electrophoresis applied to the study of hemiesters of carbonic acid*. In: 21st International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques (ITP) and 20th Latin-America Symposium on Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis (LACE), Natal/RN. **Book of Abstracts**.

2. dos Santos, V.B.; Vidal, D.T.R.; SANTANA, M.A.; Daniel, D.; LAGO, C.L. *A simple approach to compensate the suction caused by ESI source on the capillary for electrophoresis*. In: 5º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, Campinas/SP. Livro de Resumos, 2013.

3. Daniel, D.; Vidal, D.T.R.; dos Santos, V.B.; SANTANA, M.A.; LAGO, C.L. *Determination of halosulfuron methyl in sugar cane by capillary electrophoresis mass spectrometry*. In: 5º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, Campinas/SP. Livro de Resumos, 2013.