

4

Avaliação de técnicas eletroforéticas em capilar para a determinação de azaarenos básicos em querosene de aviação

4.1.

Eletroforese capilar

Eletroforese é a separação de moléculas carregadas baseada na sua migração diferencial sob a influência de um campo elétrico. Este conceito foi introduzido no início da década de 1930 por Tiselius, como um método para a separação de algumas proteínas presentes no soro humano. Arne Wilhelm Kaurin Tiselius recebeu o Prêmio Nobel em 1948 por seu trabalho pioneiro em eletroforese e, especialmente, por suas descobertas sobre a complexa natureza das proteínas presentes no sangue. Desde então, a eletroforese tem sido uma das técnicas mais empregadas para a separação de biomoléculas. No entanto, apenas a partir da década de 1980, com a implantação das técnicas de eletroforese em capilar e com a evolução e a automação que a técnica ganhou mais ampla aceitação como técnica analítica [55].

A eletroforese capilar (CE, do inglês “*capillary electrophoresis*”) é, portanto, uma técnica relativamente nova, que foi primeiro idealizada por HJERTÉN em 1967 [56]. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70 e a primeira análise desenvolvida com sucesso foi publicada por MIKKERS e seus colaboradores em 1979 [57], seguida de JORGENSON e LUKACSEM (1981) [58]. A partir desses trabalhos pioneiros, a eletroforese capilar vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores na área da química, bioquímica, ciência forense, laboratórios clínicos, indústrias farmacêuticas e etc., confirmando a importância e aceitação dessa potente ferramenta analítica [59].

Por definição, a eletroforese capilar é um método físico de análise baseado na migração, dentro de um capilar, de analitos carregados dissolvidos em uma solução de eletrólito sob a influência de um campo elétrico de corrente contínua [60]. A eletroforese capilar, na verdade, não é uma técnica isolada, ela deve ser encarada como uma família de técnicas fundamentadas no mesmo princípio de migração, mas com mecanismos de separação diferentes, entre elas pode-se destacar a eletroforese capilar em solução livre (*free solution capillary*

electrophoresis, FSCE, ou *capillary zone electrophoresis*, CZE, como ainda é comumente conhecida); e a cromatografia eletrocinética capilar micelar (*micellar electrokinetic capillary chromatography*, MECC).

4.1.1.

Princípios gerais

A velocidade de migração de um analito sob um campo elétrico de intensidade E é determinada por sua mobilidade eletroforética e a mobilidade eletroosmótica do eletrólito dentro do capilar. A mobilidade eletroforética de um soluto (μ_{ep}) depende de suas características (carga elétrica, tamanho e forma da molécula) e das características do eletrólito no qual a migração ocorre (tipo e força iônica do eletrólito, pH, viscosidade e a presença de aditivos). A velocidade eletroforética (v_{ep}) de um soluto, assumindo um formato esférico, é dada pela Equação 2 [60]:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left(\frac{V}{L} \right) \quad \text{Equação 2}$$

na qual q é a carga efetiva do soluto; η é a viscosidade da solução do eletrólito; r é o raio de Stokes do soluto; V é a diferença de potencial aplicada; e L é o comprimento total do capilar.

Quando um campo elétrico é aplicado através de um capilar cheio com um eletrólito, um fluxo de solvente, chamado de fluxo eletroosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*), é gerado dentro do capilar. A velocidade desse fluxo depende da mobilidade eletroosmótica (μ_{eo}) que depende, por sua vez, da densidade de carga na parede interna do capilar e das características do eletrólito. A velocidade eletroosmótica (v_{eo}) é dada pela Equação 3 [60]:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \left(\frac{\epsilon\zeta}{\eta} \right) \left(\frac{V}{L} \right) \quad \text{Equação 3}$$

onde ε é a constante dielétrica da solução do eletrólito; ζ é o potencial zeta da superfície do capilar; e os outros termos são os mesmos já definidos acima. A velocidade do soluto é dada pela Equação 4 [60].

$$V = V_{ep} + V_{eo}$$

Equação 4

Em termos práticos, o processo de separação por eletroforese capilar ocorre da seguinte maneira: um eletrodo positivo (anodo) e um negativo (catodo) são colocados cada um em uma solução contendo o eletrólito, na qual as extremidades do tubo capilar são mergulhadas. A diferença de potencial aplicada entre as extremidades do capilar provoca a migração dos íons (cátions e ânions) presentes na solução dentro do capilar, em direção aos eletrodos de carga oposta [61].

A mobilidade eletroforética do analito e a mobilidade eletroosmótica podem agir na mesma direção ou em direções opostas, dependendo da carga do soluto. Em eletroforese capilar normal, os ânions migrarão na direção oposta do EOF e suas velocidades serão menores que a velocidade eletroosmótica. Cátions migrarão na mesma direção do EOF e suas velocidades serão maiores que a velocidade eletroosmótica. Sob condições nas quais há uma alta velocidade eletroosmótica com relação à velocidade eletroforética dos solutos, cátions e ânions podem ser separados numa mesma análise [60]. O tempo (t) que o soluto leva para percorrer a distância (l), do ponto de injeção no capilar ao ponto de detecção (comprimento efetivo do capilar) é dado pela Equação 5

$$t = \frac{l}{V_{ep} + V_{eo}} = \frac{l(L)}{V(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

Equação 5

Dentre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares para a utilização em eletroforese capilar, a sílica fundida é o que tem apresentado maior sucesso. A presença de vários grupos silanol (SiOH) na superfície da sílica permite a ocorrência de um intenso EOF. Esses grupos SiOH, em contato com o meio aquoso, são ionizados, tornando a superfície do capilar negativamente

carregada (SiO^-), e surge, na camada de solução próxima à superfície do capilar, uma distribuição espacial de carga heterogênea, conhecida como dupla camada elétrica. Essa dupla camada é dividida em duas regiões, uma mais compacta, chamada de camada de Stern, formada por íons fortemente ligados à superfície do capilar, e outra que contém íons que se difundem para o seio da solução, afastando-se da superfície e formando a camada difusa da dupla camada elétrica [61]. Quando um campo elétrico é aplicado, no caso de a parede do capilar estar carregada negativamente, os cátions presentes na camada difusa irão migrar na direção do catodo, transportando consigo moléculas de água e induzindo um fluxo da solução como um todo, que é o fluxo eletroosmótico [62]. A Figura 19 mostra um esquema da dupla camada elétrica.

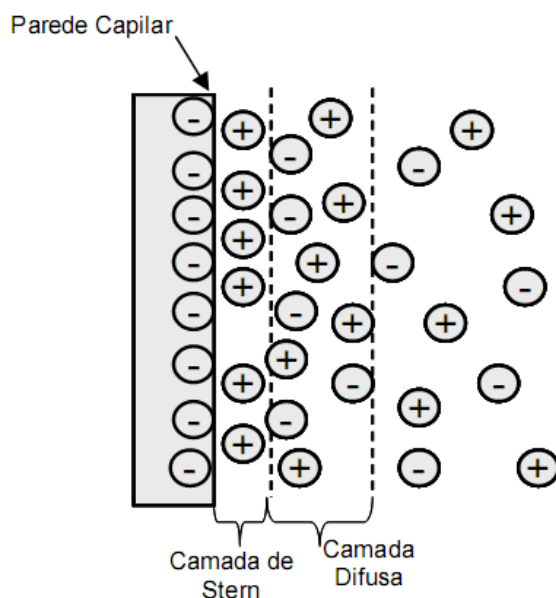


Figura 19 – Esquema da dupla camada elétrica no capilar [63].

Pode-se dizer, então, que a superfície interna de capilares de sílica fundida em pH acima de 3 tem carga negativa devido a presença dos grupos silanol. Conseqüentemente, o EOF se dá na direção do anodo para o catodo. O EOF deve permanecer constante durante as separações para garantir boa reprodutibilidade nas velocidades de migração dos solutos. Para algumas aplicações, pode ser necessário reduzir ou suprimir o EOF através de modificações na parede interna do capilar ou mudando a concentração, a composição ou o pH da solução do eletrólito [60].

Depois da introdução da amostra no capilar, cada íon de analito da amostra migra dentro do eletrólito de trabalho (BGE, do inglês *background electrolyte*) como uma zona independente de acordo com sua mobilidade eletroforética. A zona de dispersão, isto é, o espalhamento de cada banda de soluto resulta de diferentes fenômenos. Sob condições ideais, a única contribuição para o espalhamento da banda de soluto é a difusão molecular do soluto ao longo do capilar (difusão longitudinal) [60]. Nesse caso ideal, a eficiência da zona, expressa como o número de pratos teóricos (N) é dada pela Equação 6

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})(Vl)}{2DL} \quad \text{Equação 6}$$

na qual D é o coeficiente de difusão molecular do soluto no eletrólito.

Na prática, outros fenômenos, tais como a dissipação de calor, adsorção da amostra na parede do capilar, diferença de condutividade entre a amostra e o eletrólito, comprimento do plugue de injeção, tamanho da célula do detector, e reservatórios de tampão não nivelados, podem contribuir significativamente para a dispersão das bandas dos analitos [62]. A separação entre duas bandas (expresso pela resolução, R_s) pode ser obtida pela mobilidade eletroforética dos analitos, pela mobilidade eletroosmótica induzida no capilar, e pelo aumento da eficiência para a banda de cada analito [60], expressa em termos de número de pratos teóricos (N), de acordo com a Equação 7

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo})} \quad \text{Equação 7}$$

na qual μ_{epa} e μ_{epb} são as mobilidades eletroforéticas de dois analitos a serem separados e $\bar{\mu}_{ep}$ é a média destes dois valores.

4.1.2.

Eletroforese capilar de zona

A eletroforese capilar em solução livre ou eletroforese capilar de zona (CZE) é um dos modos de separação eletroforética mais usados, provavelmente devido à maior facilidade de sua implantação e da otimização das condições experimentais. Em CZE, o tubo capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes, para que o pH do eletrólito de trabalho se mantenha constante. A otimização da separação ocorre com a maximização das diferenças entre as mobilidades efetivas de cada analito e a minimização das causas de alargamento das bandas [60, 64].

Com base nos princípios gerais apresentados acima, podemos observar que a Equação 5, a Equação 6 e a Equação 7 indicam que a aplicação de diferenças de potencial elevadas é vantajosa, pois implica em um ganho de resolução e eficiência, assim como na diminuição do tempo de análise. Outra observação importante é que, em separações difíceis, a resolução de pares de solutos que eluem muito próximos pode ser melhorada pelo ajuste da magnitude do EOF. Quanto mais próximos forem os valores da mobilidade eletrosmótica e da mobilidade dos solutos, mas de sinais opostos, maior será o ganho de resolução alcançado (Equação 7). No entanto, essa mesma estratégia pode provocar perda de eficiência (Equação 6) e um aumento considerável do tempo da análise (Equação 5) [64].

Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito. Nesse caso, o termo mobilidade efetiva, que incorpora o produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado, é empregado [62]. Assim sendo, o controle do pH é aconselhável e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. Adicionalmente, a suscetibilidade do EOF a variações de pH requer que o tampão apresente constância no valor de pH (alta capacidade). Outras propriedades desejáveis para um sistema tampão incluem: baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise (no caso da detecção por absorciometria), e baixa mobilidade, para minimizar a geração de calor por efeito Joule. Além disso, a escolha do tampão está vinculada a considerações sobre a forma da banda. Na maioria dos casos, tampões contendo íons com mobilidades semelhantes à do soluto previnem distorções no perfil da banda e minimizam seu alargamento [64].

Em CZE é bastante comum o uso de eletrólitos de trabalho modificados com aditivos químicos. O uso desses aditivos é indicado em várias situações, tais como: alterar a mobilidade do soluto, modificar o EOF, facilitar a solubilização dos solutos na matriz da amostra e reduzir a interação de certos solutos com a parede do capilar (minimizar adsorção). Como exemplos de aditivos químicos importantes, podem ser citados os solventes orgânicos, que aumentam a solubilidade dos solutos orgânicos, diminuindo a interação soluto-capilar, além de serem modificadores do EOF, e os tensoativos catiônicos, que reverterem o fluxo eletroosmótico [61].

4.1.3.

Cromatografia eletrocinética capilar micelar

A principal limitação dos métodos eletroforéticos em solução livre é a impossibilidade de separar substâncias neutras, a menos que existam diferenças significativas entre as massas moleculares dos analitos [62]. Em geral, moléculas neutras migram no capilar por ação exclusiva do EOF, não havendo discriminação espacial ou temporal dos solutos na chegada ao detector [64]. TERABE *et al.* (1984) [65] desenvolveram uma versão modificada da eletroforese capilar, a cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC, do inglês *micellar electrokinetic capillary electrophoresis*). Em MECC, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionadas ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico em duas fases. O eletrólito é a fase que é transportada pelo EOF, enquanto as micelas são consideradas como uma fase pseudo-estacionária, que é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroosmose. A partição diferenciada de solutos neutros entre essas duas fases é responsável pela seletividade da separação [64] (Figura 20). Em outras palavras, a separação ocorre na solução do eletrólito que contem um surfactante numa concentração acima de sua concentração micelar crítica (cmc). As moléculas dos solutos são distribuídas entre o tampão aquoso e a fase pseudo-estacionária de acordo com os coeficientes de partição dos solutos [60]. A MECC pode ser considerada como uma técnica híbrida entre eletroforese e cromatografia, e pode ser usada para a separação de solutos neutros e solutos carregados, mantendo as mesmas eficiência e velocidade da CZE.

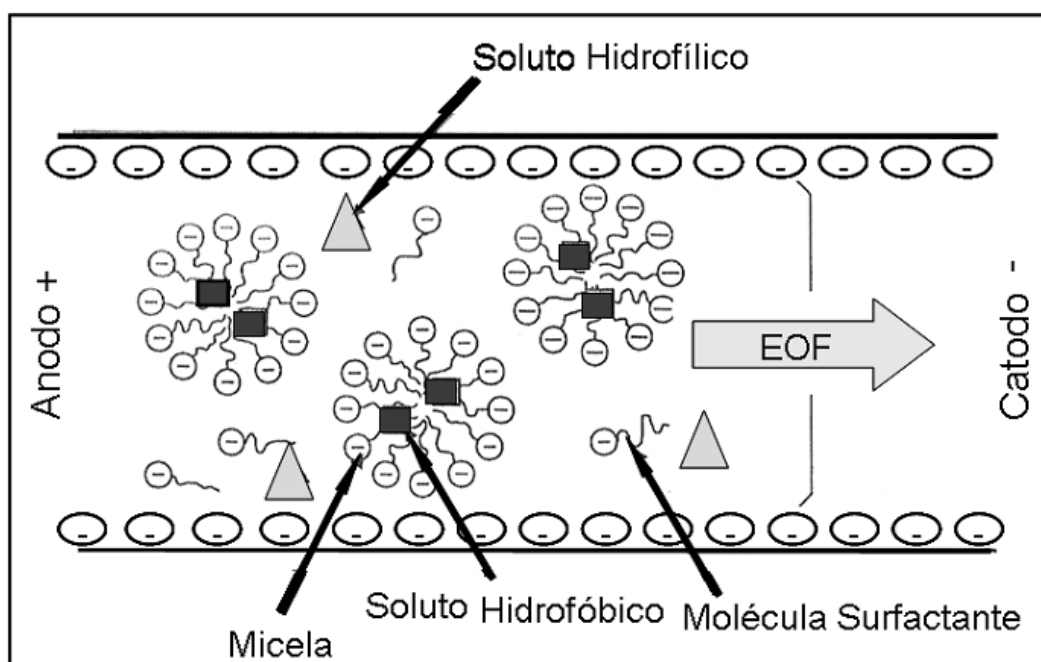


Figura 20 – Esquema representativo da separação por MECC usando micelas aniônicas [63].

Em pH neutro ou alcalino, um forte EOF é gerado e move o íons do tampão de separação na direção do catodo. Se um surfactante aniônico estiver sendo utilizado, a migração eletroforética das micelas aniônicas ocorre na direção do anodo. Como resultado, a velocidade total de migração das micelas é retardada quando comparada com o fluxo da maioria da solução e, no caso de solutos neutros, a velocidade de migração dos analitos dependerá somente do coeficiente de partição entre a micela e o tampão aquoso. No eletroferograma, os picos correspondentes aos solutos não-carregados estão sempre entre o pico do EOF e o pico da micela, e o tempo entre estes dois picos é chamado de janela de separação (Figura 21) [60]. O pico do EOF (t_{eo}) é determinado pela eluição de analitos que não interagem com as micelas e que passam todo o tempo da separação na fase aquosa, migrando com mobilidade eletrosmótica. Já o pico da micela (t_{mc}) é determinado pela eluição de analitos muito hidrofóbicos que interagem fortemente com as micelas e seus tempos de migração coincidem com o tempo de migração das micelas [63].

Para solutos eletricamente carregados, as velocidades de migração dependem tanto do coeficiente de partição do soluto entre a micela e o tampão aquoso quanto da mobilidade eletroforética do soluto na ausência de micelas.

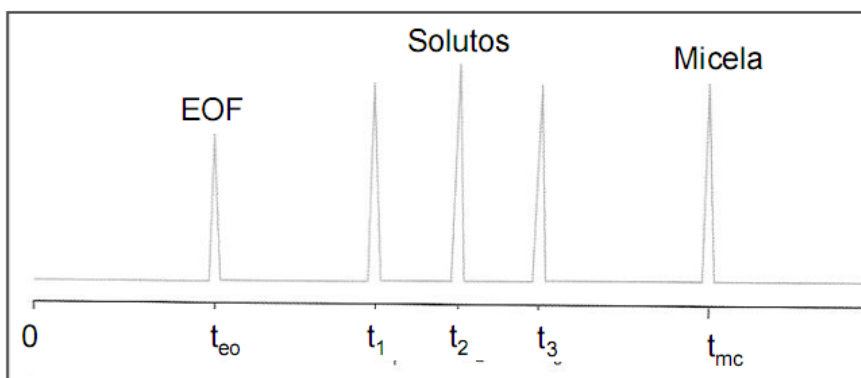


Figura 21 – Esquema da janela de separação em MECC [63].

Vários modificadores de fase móvel utilizados em HPLC podem ser aplicados em MECC. Entre eles, os mais utilizados são os solventes orgânicos, as ciclodextrinas, os reagentes formadores de pares iônicos e a uréia [66]. Neste trabalho foram adicionados ao eletrólito de trabalho apenas solvente orgânico (metanol) e uréia.

Solventes orgânicos miscíveis em água como metanol e acetonitrila são utilizados em MECC, pois reduzem os fatores de retenção dos analitos e alteram a seletividade da separação. Quando esses solventes são adicionados à solução do eletrólito de trabalho alteram a polaridade da fase aquosa, causando um aumento da atração do analito por esta fase. Além disso, a adição de solvente orgânico na solução micelar reduz a v_{eo} e, deste modo, estende a janela de separação, aumentando a resolução. Por outro lado, altas concentrações de solvente orgânico podem dividir a estrutura da micela, sendo recomendado que sua fração de volume não exceda a 20% [61].

A uréia é usada como aditivo para aumentar a solubilidade do analito, diminuir a retenção pela micela ou expandir a janela de separação. Uma concentração de uréia menor que 8 mol L^{-1} pode ser usada para aumentar a solubilidade das substâncias hidrofóbicas em tampões aquosos, pois a uréia é um agente que modifica a estrutura da água através da destruição das pontes de hidrogênio, o que tem um efeito de reduzir a viscosidade. Esse efeito permite uma melhora na resolução de muitos analitos hidrofóbicos que, de outra maneira, seriam completamente solubilizados pelo surfactante micelar [61].

4.1.4. Detecção

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar (CE, do inglês “*capillary electrophoresis*”) é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores. Na CE estão disponíveis detectores que são, basicamente, uma adaptação dos detectores utilizados nos equipamentos de HPLC para o formato capilar e correspondente tempo rápido de resposta. Tais detectores podem ser, por exemplo: de absorção no UV-Vis, de fluorescência, espectrometria de massas, amperometria e etc. A escolha do detector depende quase que exclusivamente das propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração contemplada [59].

Como em HPLC, a detecção espectrofotométrica de absorção na região do UV-Vis é a mais utilizada em CE. Com capilares de sílica fundida uma transparência satisfatória entre 190 e 900 é alcançada, sendo que a percentagem de transmitância desse material, nessa faixa, depende do comprimento de onda da radiação incidente. A alta eficiência observada em CE é decorrente, em parte, da detecção direta no capilar (onde é aberta a janela óptica) [59]. Desse modo, a detecção ocorre em um momento no qual a separação das espécies ainda está acontecendo, ao contrário da cromatografia em fase líquida, onde o processo de separação termina quando as espécies deixam a coluna cromatográfica. A largura da região de detecção deve ser pequena em relação à zona da amostra para garantir uma alta resolução e isto é compatível com as dimensões do capilar [63]. Por outro lado, no caso da sensibilidade, as dimensões do capilar impõem um fator limitante à Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon bc$, onde A é absorvância, ϵ é a absortividade molar do analito, b é o caminho óptico e c é a concentração molar do analito). No caso da EC, o caminho óptico é pequeno, pois corresponde ao diâmetro interno do capilar (em geral da ordem de dezenas de micrômetros), impondo limites à detectabilidade.

4.1.5.

Concentração da amostra no capilar

Nos últimos anos, o desenvolvimento de estratégias para pré-concentrar os analitos em linha ou aumentar a quantidade de amostra que pode ser inserida no capilar, sem afetar a eficiência da separação, tem recebido cada vez mais atenção [67-73]. Em eletroforese capilar em solução livre, as estratégias de pré-concentração são baseadas em fenômenos físico-químicos que envolvem a manipulação da velocidade eletroforética do analito (através da manipulação da composição da amostra) em relação à velocidade do eletrólito de corrida, e o aumento do volume injetado de amostra. Essas estratégias são conhecidas como *sample stacking* ou *stacking* e podem proporcionar melhorias de 10 a mais de 1000 vezes na resposta analítica [71, 74] sem a necessidade de qualquer alteração na instrumentação utilizada. As estratégias de *stacking* são variadas, porém, apenas o *stacking* mediado por força iônica será discutido neste trabalho.

A estratégia mais simples para pré-concentrar amostras em CZE é o *stacking* mediado por força iônica, também conhecido como modo de empilhamento normal (NSM, do inglês *normal stacking mode*), que foi apresentado pela primeira vez, em 1979, por MIKKERS *et al.* (1979) [75]. Nessa estratégia, um grande volume de amostra, preparada em solvente com condutividade elétrica menor que a do eletrólito de corrida, é introduzido hidrostáticamente no capilar (Figura 22A). Após a aplicação da diferença de potencial, esta região de baixa condutividade experimentará um campo elétrico (E) maior que a região do eletrólito de corrida, pois a resistividade na banda da amostra será maior que a resistividade no restante da coluna. Assim, os íons presentes na amostra movem-se mais rapidamente na região de baixa condutividade do que na região de alta condutividade. Quando os íons alcançam a interface entre a banda da amostra (campo elétrico local mais elevado) e a banda do eletrólito de corrida (campo elétrico local mais baixo), estes são desacelerados, causando uma contração da banda da amostra (Figura 22B) e produzindo uma região com concentração de analito maior que a original da solução de amostra. O EOF neste ponto é considerado zero [71]. Assim que o campo elétrico na região onde se encontra a zona da amostra se iguala ao do eletrólito de corrida, os analitos são separados segundo os princípios convencionais da eletroforese capilar (Figura 22C). O mecanismo de *stacking* ocorre tanto para as espécies carregadas positivamente quanto para as espécies carregadas negativamente. As espécies positivas concentram-se na frente da

zona da amostra, enquanto as espécies negativas se concentram na parte de trás [74].

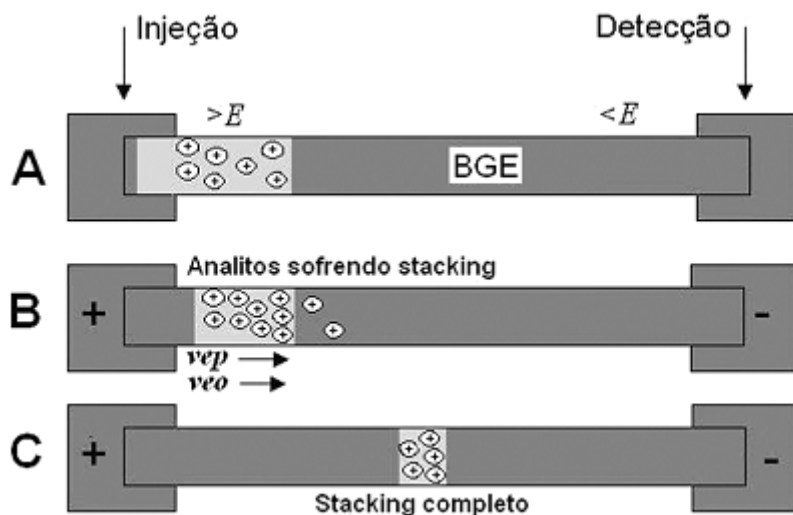


Figura 22 – Esquema representativo do *stacking* mediado por força iônica. E = campo elétrico; v_{ep} = velocidade eletroforética; v_{eo} = velocidade eletroosmótica; BGE = eletrólito de corrida [74].

Normalmente, em CZE, a amostra é preparada no próprio tampão de corrida e, neste caso, não há diferença de condutividade entre as duas regiões (banda da solução de amostra e tampão de corrida). Para que o *stacking* ocorra, a banda de amostra deve necessariamente ter uma condutividade menor que o tampão de corrida. Sendo assim, a amostra deve ser preparada ou numa solução de eletrólito que seja pelo menos 10 vezes menos concentrado que a solução do eletrólito de corrida ou diretamente em água. Pode-se ainda adicionar um solvente orgânico na amostra como, por exemplo, metanol ou acetonitrila [73, 74] de modo a se criar uma diferença de condutividade entre as duas soluções. Contudo, se ocorrerem grandes diferenças de concentração entre as duas soluções pode ocorrer alargamento das bandas pré-concentradas devido ao fluxo laminar. Porém, esta perturbação sobre o *stacking* é muito pequena devido à alta velocidade dos íons da amostra na banda de injeção [74].

4.2.

Procedimentos experimentais para as separações por eletroforese capilar

4.2.1.

Eletroforese capilar de zona - CZE

4.2.1.1.

Procedimentos gerais

As soluções-estoque dos analitos foram preparadas em etanol na concentração de 200 mg L^{-1} , e guardadas em geladeira. Os estudos em CZE foram realizados utilizando soluções de trabalho preparadas por meio da diluição das soluções-estoque em solução contendo 20% de acetonitrila e 1 mmol L^{-1} de H_3PO_4 . O eletrólito de corrida (BGE) foi preparado diariamente pela diluição de uma solução-estoque aquosa de ácido fosfórico ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) com adição de 25% v/v de metanol e pH ajustado a 2,65 com solução de $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$.

As separações foram conduzidas em capilar de sílica fundida de 56 cm de comprimento total (47,5 cm até o detector) e $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno. Os eletroferogramas foram obtidos com detecção fotométrica em comprimentos de onda variados, dependendo do analito (230, 250, 260 e 300 nm). A diferença de potencial aplicada durante as análises foi de +25 kV e a temperatura mantida constante em $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As injeções das amostras foram realizadas em modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 150 segundos.

Com a finalidade de aumentar o sinal analítico dos analitos foi utilizado um capilar de caminho óptico estendido: capilar de sílica fundida de 64,5 cm de comprimento total (56 cm até o detector), $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno e $150 \text{ }\mu\text{m}$ de caminho óptico. O diâmetro interno desse capilar é expandido três vezes no ponto da detecção, em forma de bulbo, como mostrado na Figura 23.

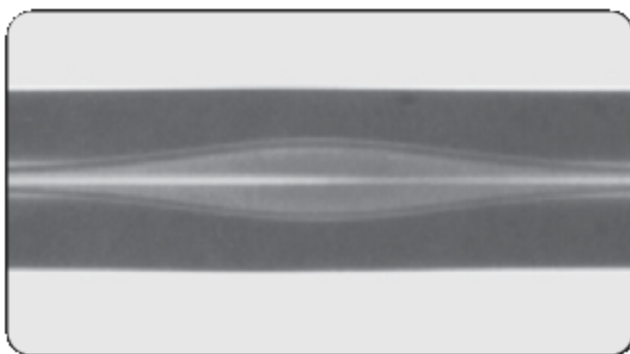


Figura 23 - Desenho de um capilar com caminho óptico estendido cinco vezes em relação ao seu diâmetro interno [76].

O capilar novo foi condicionado com NaOH 1 mol L⁻¹ por 30 min, com metanol por 10 min, com água (ultrapurificada) por 30 min e com o eletrólito de trabalho por mais 30 min. No início de cada dia de trabalho o capilar era condicionado com água por 5 min, seguida de metanol por 10 min, NaOH 1 mol L⁻¹ por 10 min e água por mais 5 min. Um pré-condicionamento mais simples era feito entre cada uma das corridas ao longo do dia de trabalho e consistia da passagem de NaOH 1 mol L⁻¹ por 2 min; metanol por 1 min; água por 1 min; e 3 min de eletrólito de corrida. Ao final de cada dia de trabalho, um procedimento de limpeza do capilar era realizado com a passagem, em sequência, de metanol (5 min), água (5 min) e solução de metanol:água 50:50 % v/v (5 min) para remover qualquer resíduo de amostra e deixar o capilar pronto para uma próxima utilização.

4.2.1.2. Curvas analíticas

A determinação quantitativa dos azaarenos básicos foi realizada através de curvas analíticas, na faixa de concentração de 1,0 a 100 µg L⁻¹, para A e 9MA, e de 5,0 a 500 µg L⁻¹, para 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA, utilizando as áreas dos picos como resposta analítica. As curvas analíticas foram construídas em seis níveis de concentração, com três injeções para cada nível. A identificação dos analitos foi baseada na comparação entre os espectros de absorção obtidos para as soluções-padrão de cada analito individualmente e os obtidos para as mesmas substâncias identificadas nas misturas e nas amostras de QAV fortificado, obtidos nas mesmas condições.

4.2.1.3.

Avaliação do procedimento de extração

A fim de verificar a conformidade das modificações feitas no procedimento de extração dos azaarenos básicos das amostras de QAV (descritas no item 2.1.2), uma amostra fortificada com quantidades conhecidas dos padrões dos analitos, assim como a mesma amostra não-fortificada, foi submetida ao procedimento de extração e foi analisada por CZE sob as mesmas condições da curva analítica. A amostra de QAV foi fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de A e 9MA e com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA. Os valores de recuperação foram calculados levando em consideração o fator de pré-concentração ($\text{FPC} = \text{volume final do extrato} / \text{volume de amostra usado para a extração}$).

O procedimento de extração descrito no item 2.1.2 para a análise cromatográfica dos extratos de QAV, cujo solvente final era metanol:amônia 96:4 v/v, já foi bem avaliado no capítulo sobre HPLC, tanto em termos de recuperação, quanto em termos de precisão. No entanto, para a análise por CZE, a remoção da amônia era necessária e mais uma etapa foi incluída no procedimento. As extrações foram realizadas com 10,00 mL de amostra para um volume final de extrato de 5,00 mL ($\text{FPC} = 2$). Para eliminar a presença de amônia, após a eluição dos analitos com metanol:amônia (9:1) para um tubo graduado, este solvente teve seu volume reduzido até 300 μL , aproximadamente, com um fluxo suave de nitrogênio. O volume foi completado a 1,0 mL com ACN (para corresponder a 20% de solvente orgânico na amostra), 25 μL de solução de H_3PO_4 $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ foi acrescentado (para concentração final de 1 mmol L^{-1}) e o frasco foi avolumado a 5,0 mL com água.

O mesmo procedimento de extração também foi realizado com a eluição dos analitos feita com ACN:amônia (9:1) para que o solvente final do extrato fosse exatamente igual ao das soluções-padrão utilizadas na curva analítica. Ambas as extrações, utilizando metanol:amônia ou ACN:amônia, foram feitas em triplicata e os extratos resultantes, assim como as soluções-padrão das curvas analíticas, foram analisados por CZE e por HPLC para a comparação dos resultados.

4.2.2.

Cromatografia eletrocinética capilar micelar - MECC

As soluções-estoque dos analitos foram preparadas em etanol na concentração de 200 mg L^{-1} , e guardadas em geladeira. Os estudos em MECC foram realizados utilizando soluções de trabalho preparadas por meio da diluição das soluções-estoque em solução contendo 40% de metanol:amônia (9:1) e 60% de água, para que o mesmo procedimento de extração utilizado nas separações por HPLC-FD, descrito no item 2.1.2, fosse utilizado. O eletrólito de corrida (BGE) foi preparado diariamente pela diluição de soluções-estoque aquosas de SDS ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e de ácido bórico ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$) com adição de 20% v/v de metanol e pH ajustado a 9,5 com solução de NaOH 1 mol L^{-1} .

As separações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total (51,5 cm até o detector) e $50 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno. Os eletroferogramas foram obtidos com detecção por absorção ajustada em 250 e 290 nm. A voltagem positiva, aplicada durante a corrida, foi de 25 kV e a temperatura mantida constante em $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As injeções das amostras no capilar foram realizadas pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por um intervalo de tempo de 10 a 40 segundos.

O capilar novo, antes da primeira utilização, foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} por 30 min, com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 10 min e com água (ultrapurificada) por mais 10 min. No início de cada dia de trabalho o capilar era condicionado com acetonitrila por 5 min, seguida de água por 5 min, NaOH 1 mol L^{-1} por 5 min e água por mais 5 min. Um pré-condicionamento mais simples era feito entre cada uma das corridas ao longo do dia de trabalho e consistia da passagem de água por 2 min; NaOH 1 mol L^{-1} por 2 min; novamente água por 1 min; e 5 min de eletrólito de corrida. Ao final de cada dia de trabalho, um procedimento de limpeza do capilar era realizado com a passagem, em sequência, de acetonitrila (5 min), água (5 min) e solução de acetonitrila: água 50:50 % v/v (5 min) para remover qualquer resíduo de amostra e deixar o capilar pronto para uma próxima utilização.

4.3.

Resultados e discussão

4.3.1.

Eletroforese capilar de zona

Quando os analitos que se deseja separar apresentam carga, a CZE é, em geral, a primeira opção dentro da família de técnicas fundamentadas no princípio de migração eletroforética. A CZE é um dos modos de separação eletroforética mais usados na prática por apresentar maior facilidade de implantação e de otimização das condições experimentais. Em CZE, o tubo capilar pode ser simplesmente preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes, para que o pH do eletrólito de trabalho mantenha-se constante. Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, como é o caso dos azaarenos em estudo, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito e, neste caso, o controle do pH é extremamente importante e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. Tal otimização ocorre com a maximização das diferenças entre as mobilidades efetivas de cada analito e a minimização das causas de alargamento das bandas.

4.3.1.1.

Estudos preliminares

Nos primeiros testes realizados com CZE para a separação dos seis azaarenos básicos de interesse, foi utilizado um capilar de sílica fundida de 56 cm de comprimento (47,5 cm de comprimento efetivo) e 50 μm de diâmetro interno e um eletrólito composto de 10 mmol L^{-1} de H_3PO_4 com pH ajustado a 3,0 com NaOH 1 mol L^{-1} . Soluções-padrão contendo 0,5 mg L^{-1} de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA, e 2,0 mg L^{-1} de DBA e 79DMBA foram injetadas por 30 s, a uma temperatura de 25 °C e com uma diferença de potencial aplicada de +25 kV. Três soluções foram preparadas, cada uma em um solvente diferente: (i) metanol:amônia (9:1)/água 40/60% v/v; (ii); metanol/água 40/60% v/v; e (iii) água. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 24.

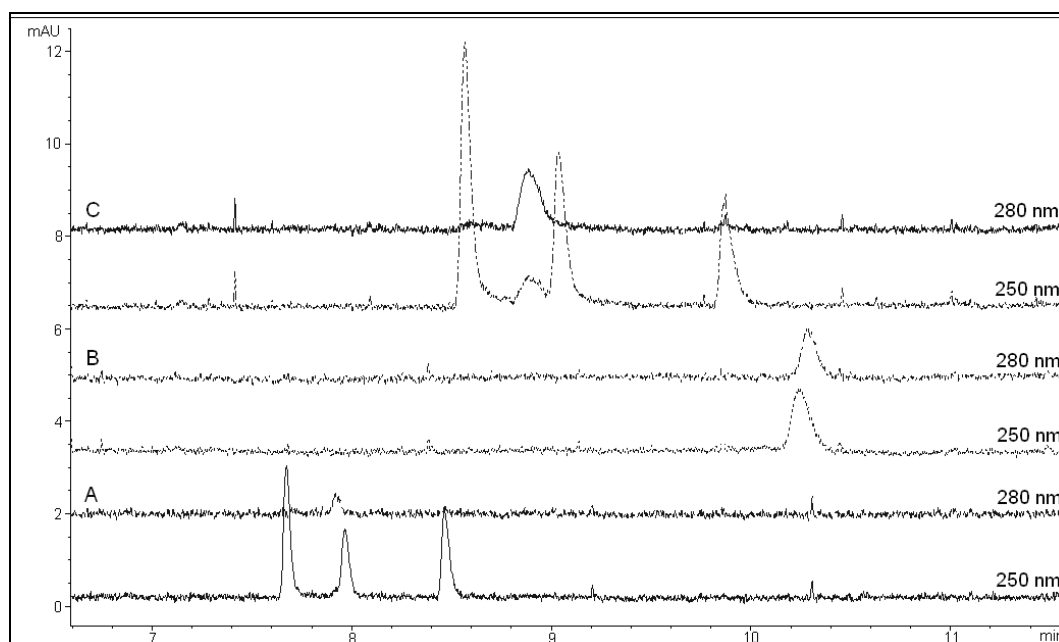


Figura 24 - Efeito do solvente da amostra sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 3,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C , 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 e 280 nm. Solução padrão: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e 79DMBA em: (A) água; (B) 40% metanol:amônia (9:1)/60% água; (C) 40% metanol/60% água.

O objetivo de usar o solvente contendo amônia foi o de aproveitar diretamente, sem modificações, o procedimento de extração utilizado para HPLC descrito no item 2.1.2. No entanto, pode-se verificar na Figura 24 que quando esse solvente foi utilizado, apenas dois picos apareceram no eletroferograma. Quando os resultados obtidos com os outros dois solventes, metanol:água (40:60) e água, são comparados, observa-se que ambos proporcionaram o surgimento de quatro picos, sendo que com metanol:água estes picos foram mais intensos.

Com o objetivo de identificar os picos e de verificar se os dois picos que faltavam estavam co-migrando com os outros ou, simplesmente, não tinham sido detectados, uma solução padrão em metanol:água (40:60) contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada um dos seis analitos foi comparada com outras seis soluções, cada uma contendo apenas cinco dos seis analitos. Essas soluções foram injetadas nas mesmas condições descritas acima e os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 25. Observa-se que a ordem de saída dos analitos foi A, 9MA, 78BQ e 9ATHA, sendo que 9MA e 78BQ saíram praticamente sobrepostas

nessas condições. No entanto, foi possível discriminar entre 9MA e 78BQ porque a 9MA não absorve em 280 nm e a 78BQ absorve mais em 280 que em 250 nm. Os eletroferogramas das soluções sem DBA e sem 79DMBA não foram apresentados na Figura 25, pois foram idênticos ao da solução contendo todos os analitos, indicando que estes analitos não foram detectados.

Um breve estudo sobre a influência do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 26. Nesse estudo, uma solução padrão contendo 2,0 mg L⁻¹ de cada analito em água, e uma faixa de pH de 2,3 (pH da solução do eletrólito sem ajuste) a 5,0 foi utilizada. As condições instrumentais de 25 kV, 25 °C e 30 s de tempo de injeção foram mantidas. Pode-se observar que o pico da 78BQ deslocou-se para a direita com o aumento do pH de 2,30 para 3,00 e que, para os valores de pH mais altos (4,10 e 5,00), apenas três picos foram observados. Embora não seja possível afirmar com certeza, os picos indicados com pontos de interrogação nos interferogramas apresentados na Figura 26 indicam a possibilidade de estes pequenos sinais serem equivalentes aos analitos 79DMBA e DBA. O pH 2,30 foi escolhido para a realização dos experimentos seguintes, pois, nas condições testadas até este momento, foi o que proporcionou melhor resolução num menor tempo de análise.

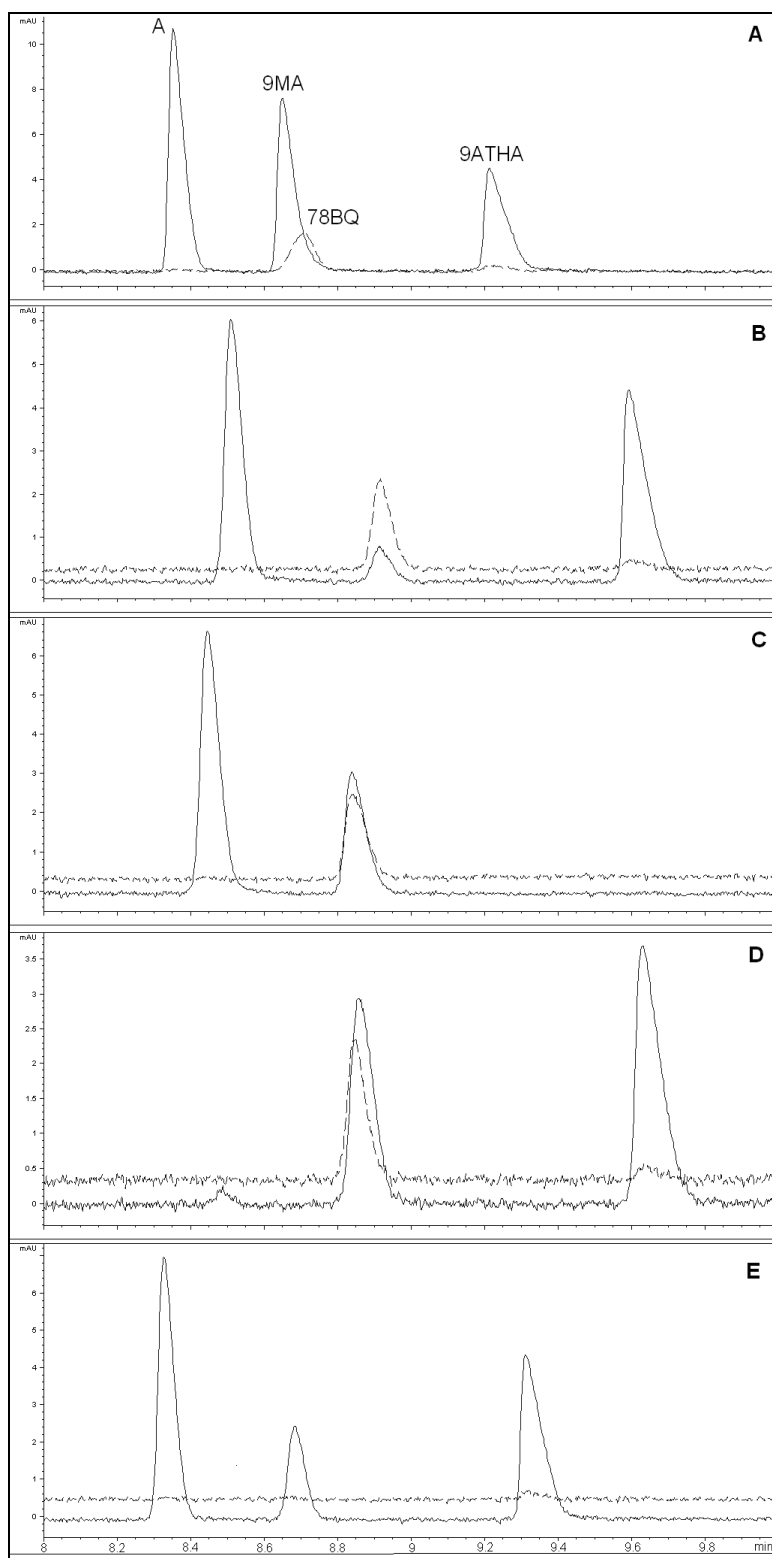


Figura 25 - Separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 3,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 (—) e 280 (---) nm. (A) Solução padrão em metanol:água (40:60) contendo 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA. (B) Mesma solução sem 9MA. (C) Mesma solução sem 9ATHA. (D) Mesma solução sem A. (E) Mesma solução sem 78BQ.

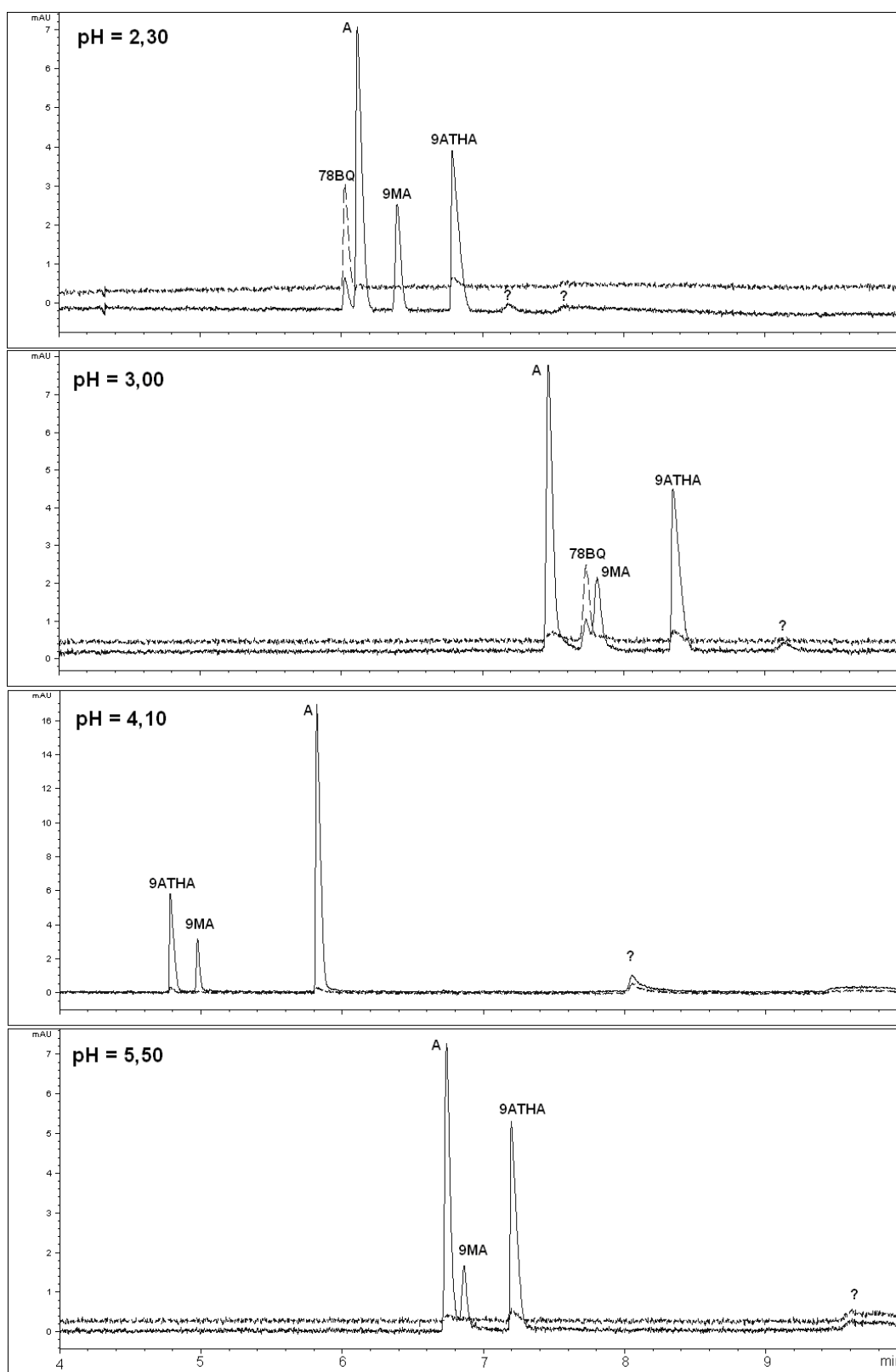


Figura 26 – Efeito do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 (—) e 280 (---) nm. Solução padrão: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA em água.

Para avaliar a sensibilidade para os analitos 79DMBA e DBA, optou-se por aumentar o tempo de injeção. Quando injeções foram feitas com 60 e 100 s (Figura 27) houve um aumento, ainda que discreto, dos dois últimos picos já observados com 10 s de injeção (Figura 26, pH 2,30). Além disso, foi observado que esses dois picos apresentaram-se bastante deformados para qualquer tempo de injeção testado. Tal deformação pode ser plenamente explicada, pois, como nessa condição de trabalho há uma grande diferença de concentração entre a banda da amostra (solução em água) e a banda do eletrólito (10 mmol L⁻¹ de tampão fosfato), pode ocorrer alargamento das bandas devido ao fluxo laminar.

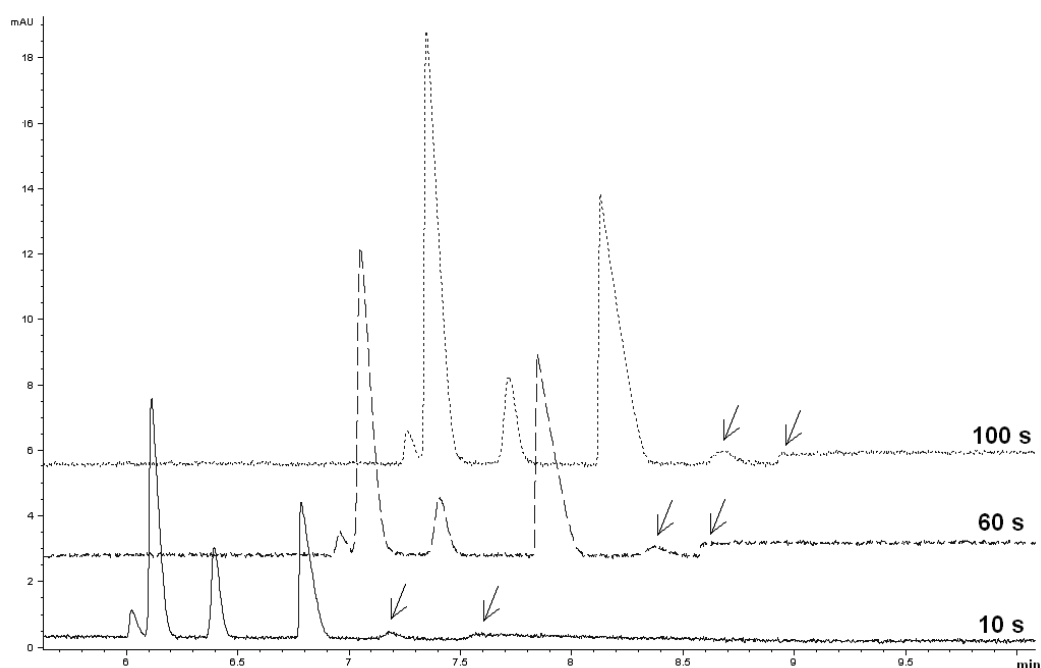


Figura 27 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH sem ajuste (2,3). Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 nm. Solução padrão: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA em água.

Soluções mais concentradas de DBA (10 mg L⁻¹) foram preparadas, em diferentes solventes (tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, etanol, etanol:água (40:60), metanol:água (40:60) e água), e injetadas por 30 s, usando o mesmo eletrólito (tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH sem ajuste), 25 kV e 25 °C, e os resultados

obtidos estão apresentados na Figura 28. Para a solução preparada em água não foi detectado nenhum sinal para a DBA, provavelmente devido à baixa solubilidade deste analito neste solvente. Já para as soluções preparadas com os outros solventes, a DBA foi detectada com intensidades diferentes. Com propósito de comparação, duas soluções de 79DMBA 10 mg L^{-1} , uma em água e outra em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , também foram preparadas e injetadas nas mesmas condições. A comparação entre os sinais da DBA e da 79DMBA pode ser observada na Figura 29.

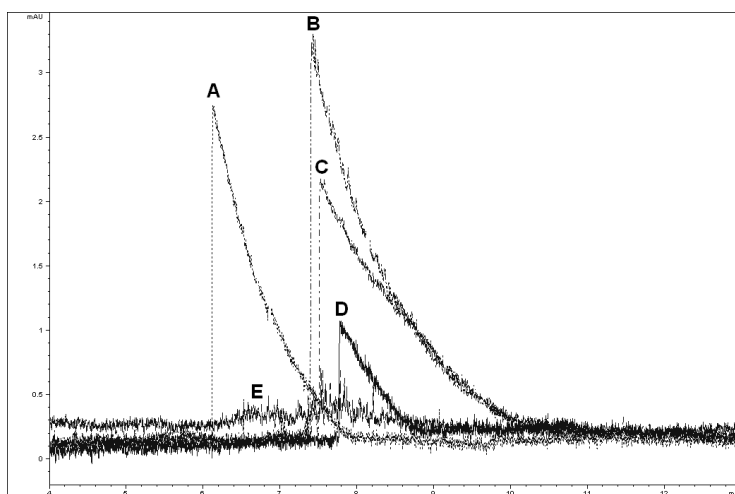


Figura 28 - Efeito do solvente da amostra sobre o sinal da DBA, usando tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 2,3. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C , 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção a 290 nm. Solução padrão contendo $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA em diferentes solventes: (A) tampão fosfato 10 mmol L^{-1} ; (B) etanol; (C) etanol:água (40:60); (D) metanol:água (40:60); (E) água.

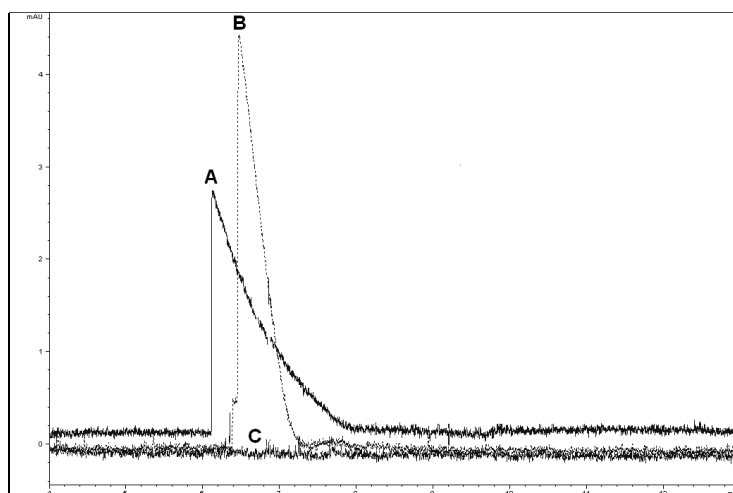


Figura 29 – Comparação entre os sinais da DBA e 79DMBA, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 2,3. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 280 (....) e 290 (—) nm. Solução padrão: 10,0 mg L⁻¹ de DBA (A) e 79DMBA (B) em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, e de 79DMBA em água (C).

Para avaliar o comportamento dos outros analitos em solução preparada com o eletrólito de corrida, uma mistura contendo 2,0 mg L⁻¹ de cada um dos analitos em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ foi preparada e injetada por 10 s (Figura 30A). Um eletroferograma com perfil semelhante ao da solução preparada em água foi observado, com exceção do surgimento de mais um pico devido, provavelmente, à sobreposição da DBA e da 79DMBA. A mesma solução, diluída dez vezes com água (0,2 mg L⁻¹ de cada analito em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹), foi preparada e injetada por 100 s e o mesmo perfil foi observado no eletroferograma (Figura 30B). Uma comparação entre a Figura 27 e a Figura 30 mostra que o preparo da solução padrão em tampão fosfato 1 ou 10 mmol L⁻¹ possibilitou a detecção dos analitos DBA e 79DMBA, quando as soluções foram injetadas por 100 e 10 s, respectivamente. Por outro lado, quando a solução da amostra preparada no eletrólito de trabalho (tampão fosfato 10 mmol L⁻¹) foi injetada por 100 s, a separação dos analitos não foi possível, indicando que o uso de uma solução de amostra com condutividade menor que a do eletrólito de trabalho (tampão fosfato 1 mmol L⁻¹) era necessária para possibilitar a pré-concentração dos analitos no capilar.

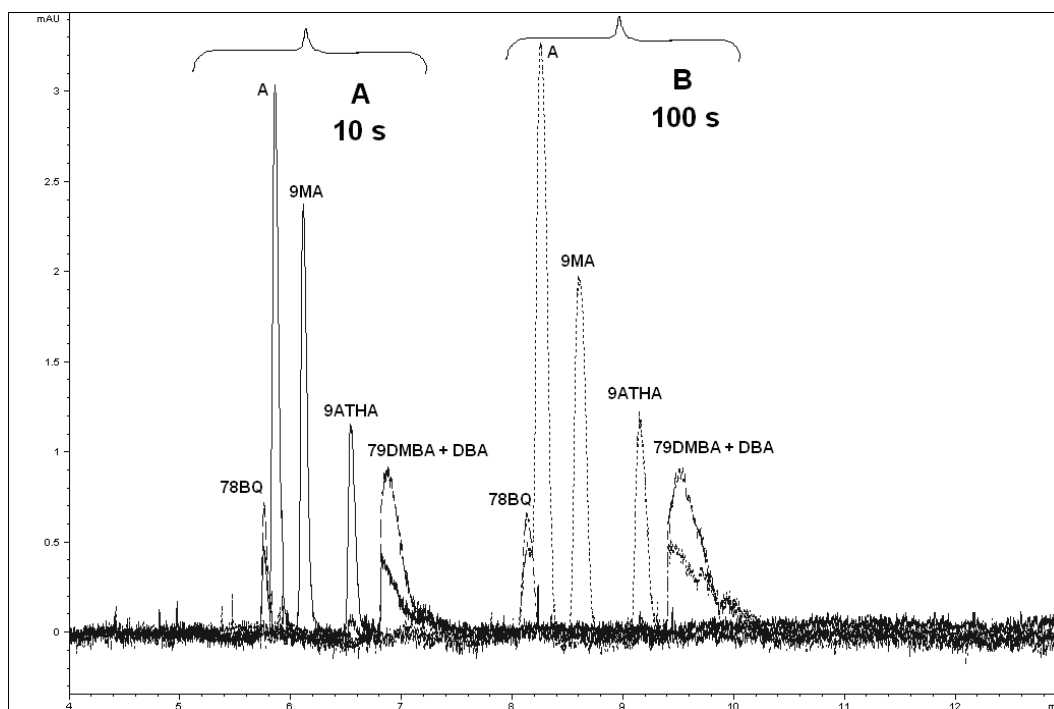


Figura 30 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH sem ajuste. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 e 290 nm. Solução padrão: (A) 2,0 mg L⁻¹ de cada analito em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹; (B) 0,2 mg L⁻¹ da cada analito em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹.

Para avaliar se estaria ocorrendo pré-concentração do tipo *stacking*, experimentos foram realizados de modo a comparar os efeitos dos diferentes solventes da amostra sobre a separação dos analitos, usando o mesmo tempo de injeção de 100 s (Figura 31). Verificou-se que, quando a solução dos analitos foi preparada no eletrólito diluído dez vezes, ao invés de ser preparada diretamente do eletrólito de trabalho, o sinal observado (altura do pico) foi 3,2 vezes maior (Figura 31C e Figura 31B, respectivamente). Caso as condutividades das bandas da amostra e do eletrólito de trabalho, dentro do capilar, permanecessem constantes durante a aplicação da diferença de potencial, o esperado seria que o aumento do sinal observado com o *stacking* fosse à mesma proporção da diferença da condutividade entre as duas bandas [71], que no caso foi de seis vezes. No entanto, nos casos reais, o fator de pré-concentração observado quando se aplica o *stacking* é sempre menor que o esperado teoricamente, pois quando a diferença de potencial é aplicada, as duas bandas tendem a misturar-se na interface entre ambas e seus valores de condutividade variam, de modo a diminuir a diferença entre eles [71].

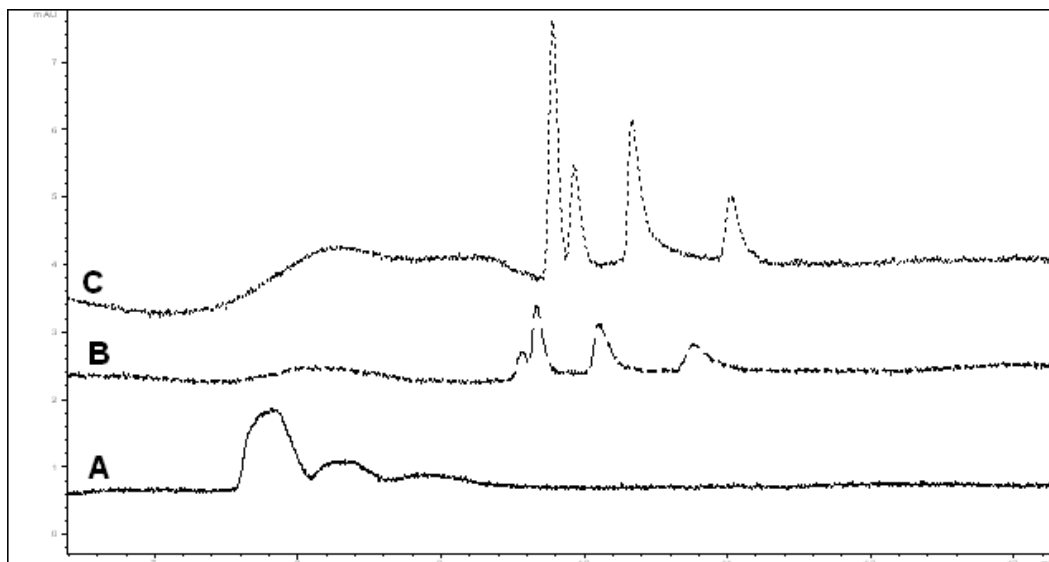


Figura 31 - Efeito do solvente da amostra sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH 2,3. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C , 100 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 230 nm. Solução padrão $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA em: (A) tampão fosfato 10 mmol L^{-1} ; (B) água; (C) tampão fosfato 1 mmol L^{-1} .

Em seguida, a concentração do eletrólito (tampão fosfato) foi avaliada. Um tempo de injeção de 100 s foi utilizado e os resultados estão apresentados na Figura 32. Observou-se que este parâmetro influenciava muito a eficiência da separação: quanto maior a concentração do eletrólito, mais estreitos eram os picos e, conseqüentemente, melhor era a resolução. Os dois primeiros picos (78BQ e A), antes parcialmente sobrepostos, foram completamente separados com 50 mmol L^{-1} de tampão fosfato como eletrólito. Além disso, foi observado que quanto maior a diferença de condutividade entre o eletrólito de trabalho e a solução da amostra, mais estreitos os picos, indicando, mais uma vez, que houve pré-concentração do tipo *stacking*, conforme esperado teoricamente (item 4.1.5).

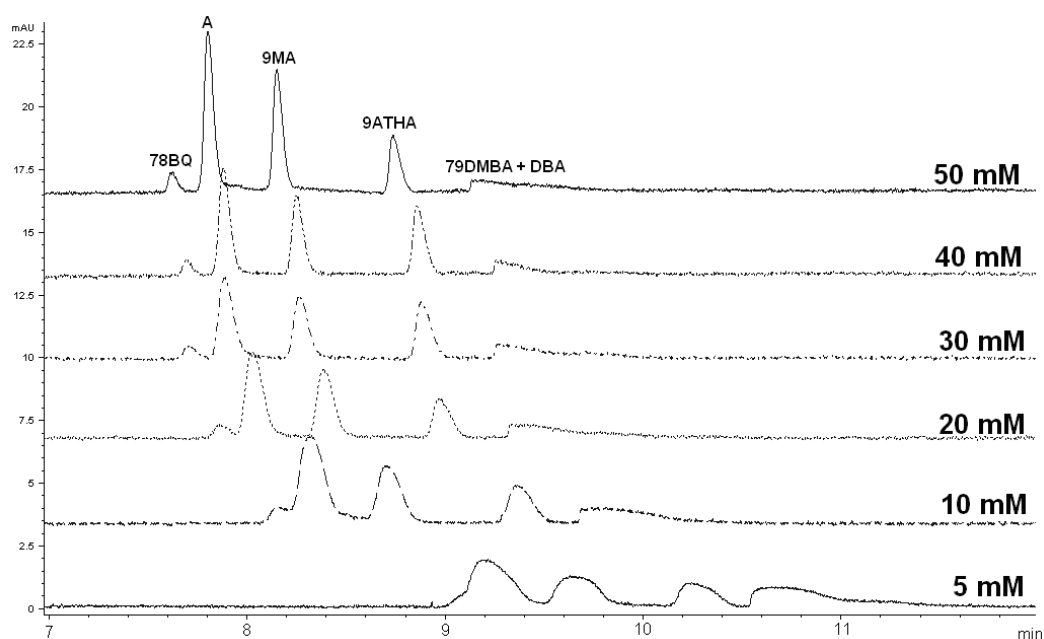


Figura 32 - Efeito da concentração do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato (5 a 50 mmol L⁻¹), pH sem ajuste. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 100 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ contendo 0,2 mg L⁻¹ da cada analito.

Em CZE é bastante comum o uso de eletrólitos com aditivos químicos. A presença de solventes orgânicos como aditivos ao eletrólito aumenta a solubilidade dos solutos orgânicos, diminuindo a interação soluto-capilar, e modifica a magnitude do EOF. A adição de metanol ao eletrólito foi testada e o resultado obtido está apresentado na Figura 33. Observou-se que quanto maior o teor de metanol no eletrólito, maior a separação entre os picos da DBA e da 79DMBA e, pela primeira vez até este momento, obteve-se um eletroferograma com os seis picos correspondentes aos seis analitos sendo separados.

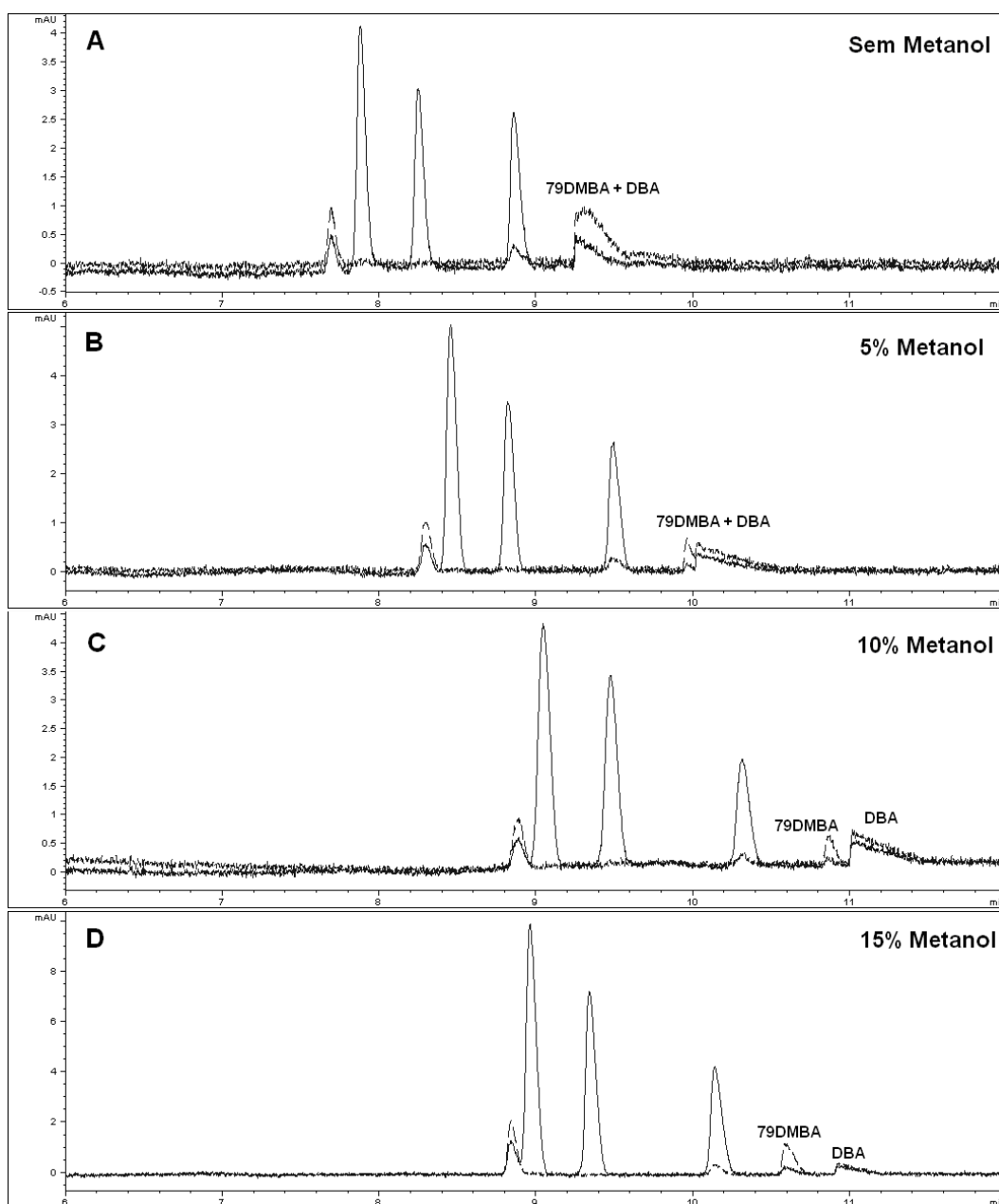


Figura 33 - Efeito da adição de metanol ao eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 30 mmol L⁻¹, pH sem ajuste. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 100 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 (—) e 290 (---) nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ contendo 0,2 mg L⁻¹ da cada analito.

Com a resolução dos seis picos, a identificação dos analitos no eletroferograma foi realizada através dos espectros de absorção obtidos com o detector utilizado para as análises eletroforéticas (detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos). Um espectro foi obtido para cada pico no eletroferograma da mistura contendo todos os seis analitos (Figura 33C), e estes

espectros foram comparados com os espectros obtidos para as soluções das substâncias puras, nas mesmas condições. A ordem de saída dos analitos foi determinada como: 78BQ, A, 9MA, 9ATHA, 79DMBA e DBA; e os espectros de absorção estão apresentados nas figuras que vão da Figura 34 à Figura 39. Os comprimentos de onda de máxima absorção, selecionados para a detecção dos analitos, foram: 78BQ = 230 nm; A e 9MA = 260 nm; 9ATHA = 250 nm; 79DMBA e DBA = 300 nm.

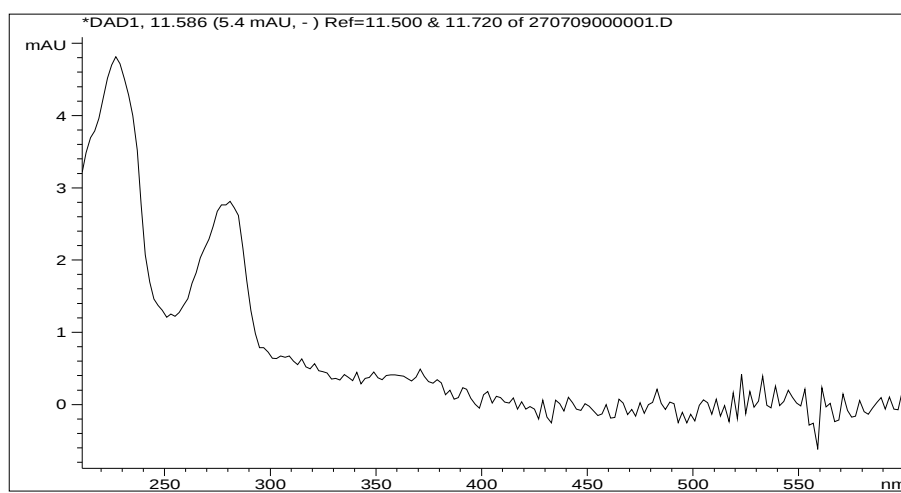


Figura 34 - Espectro de absorção da 78BQ (1º pico no eletroferograma). $\lambda_{\text{máx}} = 230$ nm.

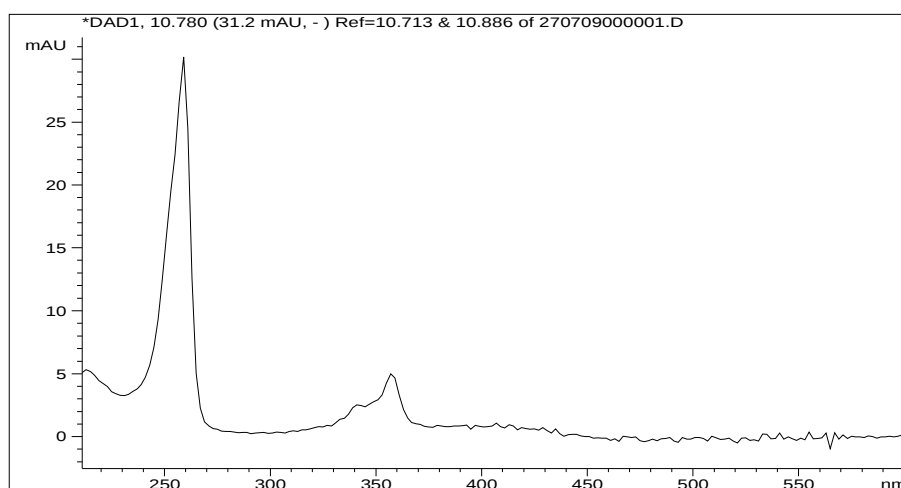


Figura 35 - Espectro de absorção da ACRIDINA (2º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 260$ nm.

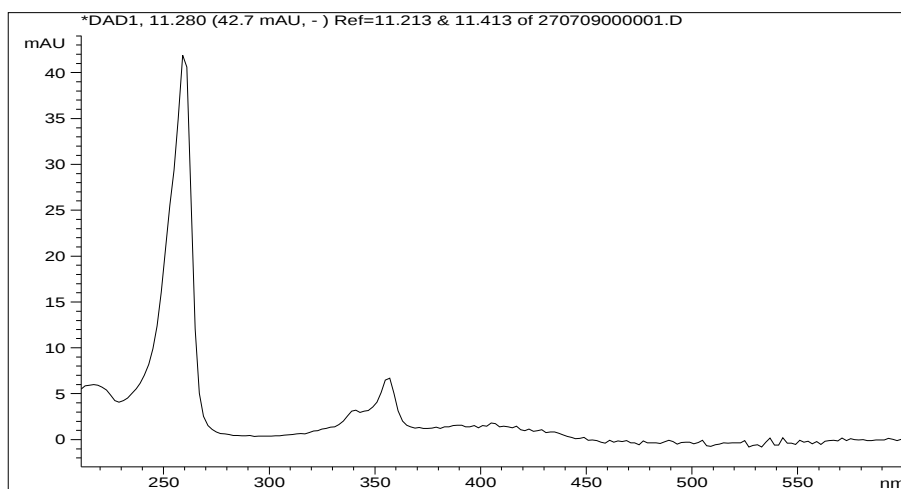


Figura 36 - Espectro de absorção da 9MA (3º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 260$ nm.

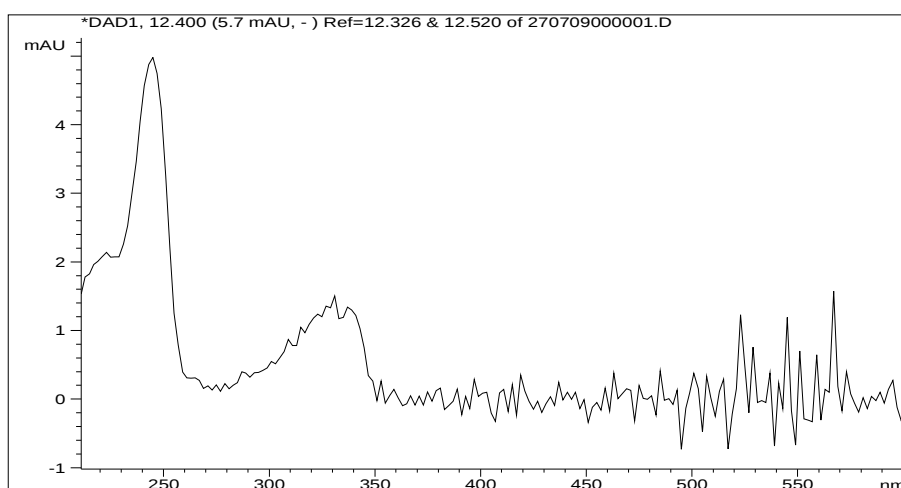


Figura 37 - Espectro de absorção da 9ATHA (4º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm.

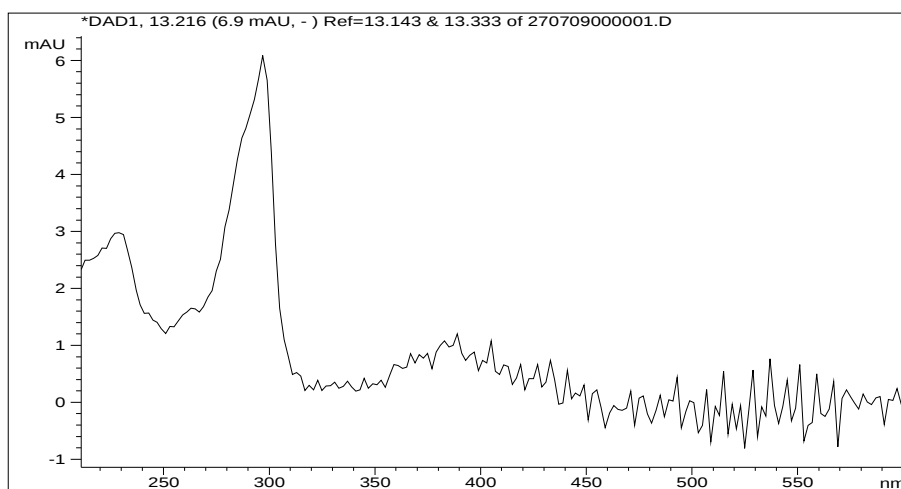


Figura 38 - Espectro de absorção da 79DMBA (5º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 300$ nm.

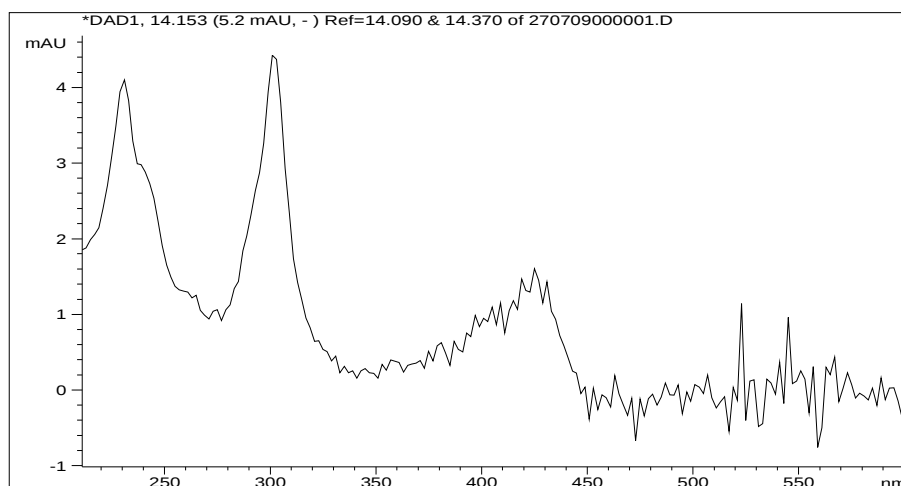


Figura 39 - Espectro de absorção da DBA (6º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 300 \text{ nm}$.

A partir dos resultados apresentados na Figura 33, alguns experimentos de otimização envolvendo temperatura e diferença de potencial aplicada, e outros envolvendo a composição do eletrólito (concentração do tampão fosfato, concentração de metanol e pH) foram realizados sem sucesso. Nesses experimentos, as soluções contendo os analitos eram preparadas em tampão fosfato 1 mmol L^{-1} . Resultados não conclusivos foram obtidos devido ao surgimento de um problema intermitente que pode ser observado no eletroferograma apresentado na Figura 40B. Essa figura mostra que o eletroferograma obtido com a detecção em 290 nm tornou-se um pouco distorcido, além de apresentar picos largos para a A e a 9MA. A presença de picos largos sugere que havia alguma interação entre os analitos e a parede do capilar, o que não pode ser considerado exatamente uma surpresa, devido à natureza dos analitos (catiônicos e hidrofóbicos) [77, 78]. Como os solventes orgânicos são usados como aditivos aos eletrólitos de trabalho porque, entre outras coisas, aumentam a solubilidade dos solutos orgânicos, diminuindo a interação soluto-capilar, uma maneira de tentar solucionar o problema apresentado na Figura 40B seria aumentar a concentração de metanol no eletrólito de trabalho e na própria amostra, para tentar melhorar a resolução. Além disso, outros solventes orgânicos poderiam ser testados para esse fim. Para tanto, maiores teores de metanol ou acetonitrila foram adicionados ao eletrólito de trabalho e ao solvente da amostra, como apresentado no texto a seguir.

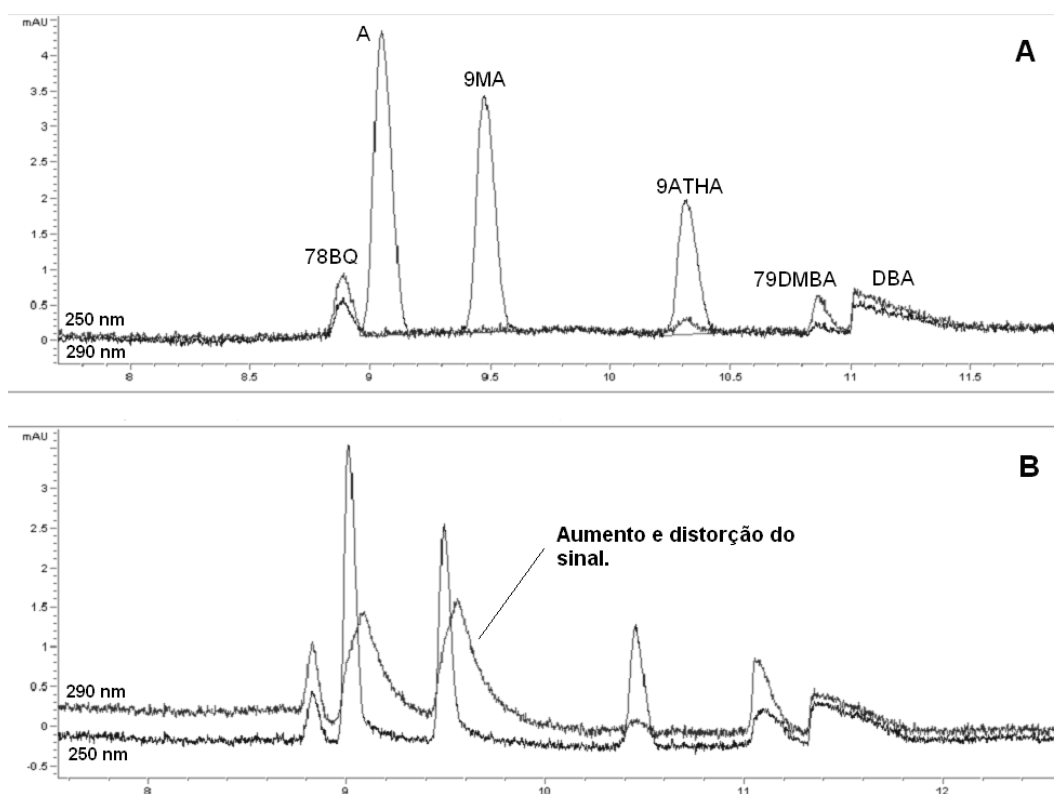


Figura 40 - Separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 30 mmol L^{-1} , contendo 10% de metanol, pH sem ajuste. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C , 100 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 e 290 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L^{-1} contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ da cada analito. (A) Eletroferograma sem problema. (B) Eletroferograma com problema.

Para evitar o alargamento dos picos observado, novos testes foram realizados para a separação dos seis analitos de interesse. Foram utilizados eletrólitos compostos de 50 mmol L^{-1} de H_3PO_4 e 15 ou 20% de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila), sem ajuste de pH. Uma mistura contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A e 9MA, e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA, em solução contendo 1 mmol L^{-1} de H_3PO_4 e a mesma quantidade de solvente orgânico presente na composição do eletrólito de trabalho, foi injetada por 10 s, a uma temperatura de 25°C e com uma diferença de potencial aplicada de +25 kV (Figura 41A). Com a utilização de 20% de ACN no tampão e na amostra, além de uma melhor resolução ter sido obtida para os seis analitos, a intensidade dos dois últimos picos (79DMBA e DBA) tornou-se maior, indicando que a ACN foi mais eficiente em solubilizar estes analitos, diminuindo a adsorção dos mesmos à parede do capilar. Além disso, a presença de ACN na amostra, e não no

eletrólito, pode ter outras vantagens adicionais importantes, como a de permitir que volumes maiores de amostra (em alguns casos metade do volume capilar) sejam injetados [73, 78]. Como a própria ACN tem baixa condutividade, a sua presença na amostra pode beneficiar o mecanismo de *stacking* devido à geração de campo elétrico elevado na banda da amostra dentro do capilar.

A partir do resultado apresentado na Figura 41D, com a utilização de 20% de ACN na composição do eletrólito de trabalho e 20% de ACN na composição da amostra, o problema apresentado na Figura 40B não foi mais observado.

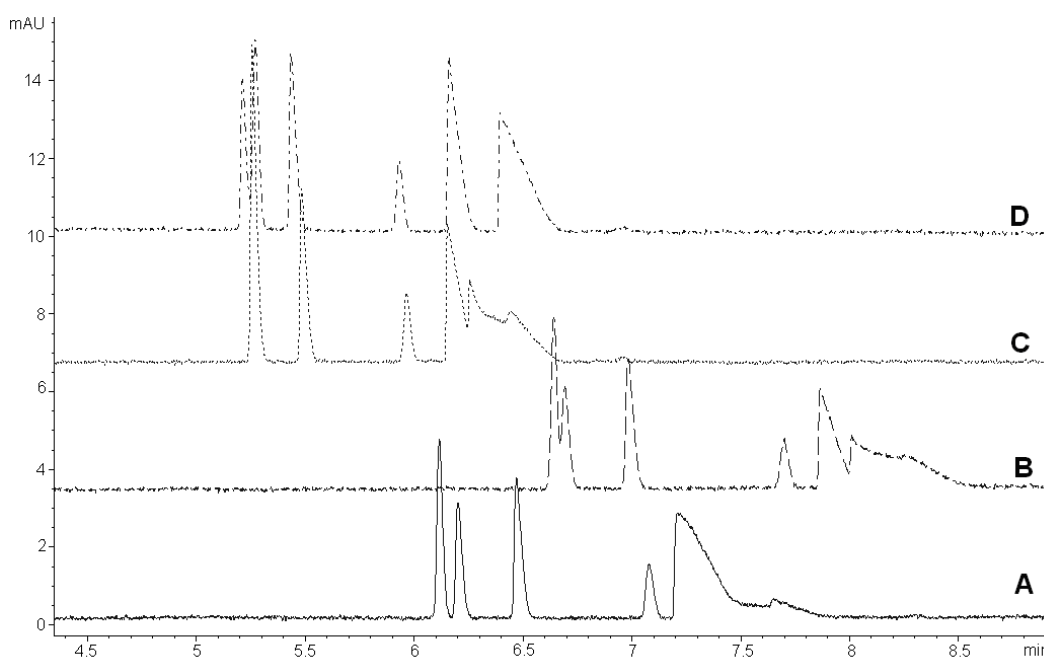


Figura 41 - Efeito do solvente orgânico no eletrólito e na solução da amostra sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH sem ajuste. Solvente orgânico presente no eletrólito e na amostra: (A) 15% de metanol; (B) 20% de metanol; (C) 15% de ACN; e (D) 20% de ACN. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 230 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ acrescido do solvente orgânico: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA.

4.3.1.2.

Estudos com capilar de caminho estendido

Um capilar de sílica fundida de caminho óptico estendido, de 64,5 cm de comprimento total (56 cm até o detector), 50 μm de diâmetro interno e 150 μm de caminho óptico (três vezes maior que o do capilar tradicional), passou a ser utilizado com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método. Com isso, esperava-se que as áreas dos picos dos analitos aumentassem três vezes com relação às áreas obtidas com o capilar tradicional, o que foi observado para todos os analitos (Figura 42).

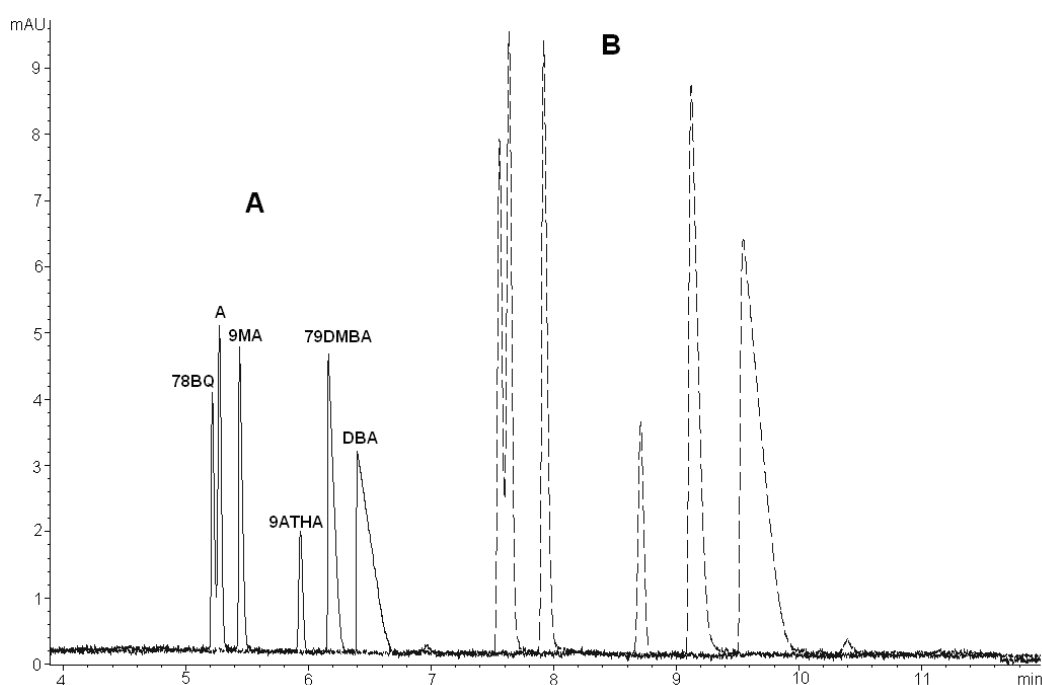


Figura 42- Efeito do uso do capilar de caminho óptico estendido sobre a detecção dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L^{-1} , contendo 20% ACN, pH sem ajuste. Condições instrumentais: 25 kV, 25 $^{\circ}\text{C}$, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 230 nm. Solução padrão: 2,0 mg L^{-1} de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L^{-1} de DBA e 79DMBA em 1 mmol L^{-1} H_3PO_4 , contendo 20% ACN. (A) Capilar normal. (B) Capilar de caminho óptico estendido (50 μm de diâmetro interno e 150 μm de caminho óptico).

Um estudo adicional envolvendo o efeito da variação do pH do eletrólito e da sua concentração foi realizado. Os resultados estão apresentados na Figura 43 e na Figura 44, respectivamente. Quando a concentração do eletrólito foi

ajustada para 50 ou para 100 mmol L⁻¹ não se observou praticamente nenhuma diferença sobre a resolução dos picos e sobre o tempo de análise, indicando que esta seria uma faixa de trabalho bastante robusta. A mesma robustez não foi constatada para o pH que mesmo uma pequena de variação (0,68 unidade de pH) provocou mudanças tanto na resolução quanto no tempo de análise. Essa influência foi marcante principalmente sobre o pico da 78BQ, que se deslocou para a direita com o aumento do pH, indicando que o ajuste do pH era um parâmetro crucial para a reprodutibilidade do método. O eletrólito contendo 50 mmol L⁻¹ de tampão fosfato, 20% de ACN e pH 2,65 foi selecionado para o prosseguimento das análises pois foi o que proporcionou melhor resolução e, neste caso, a ordem de saída dos analitos passou a ser: A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA.

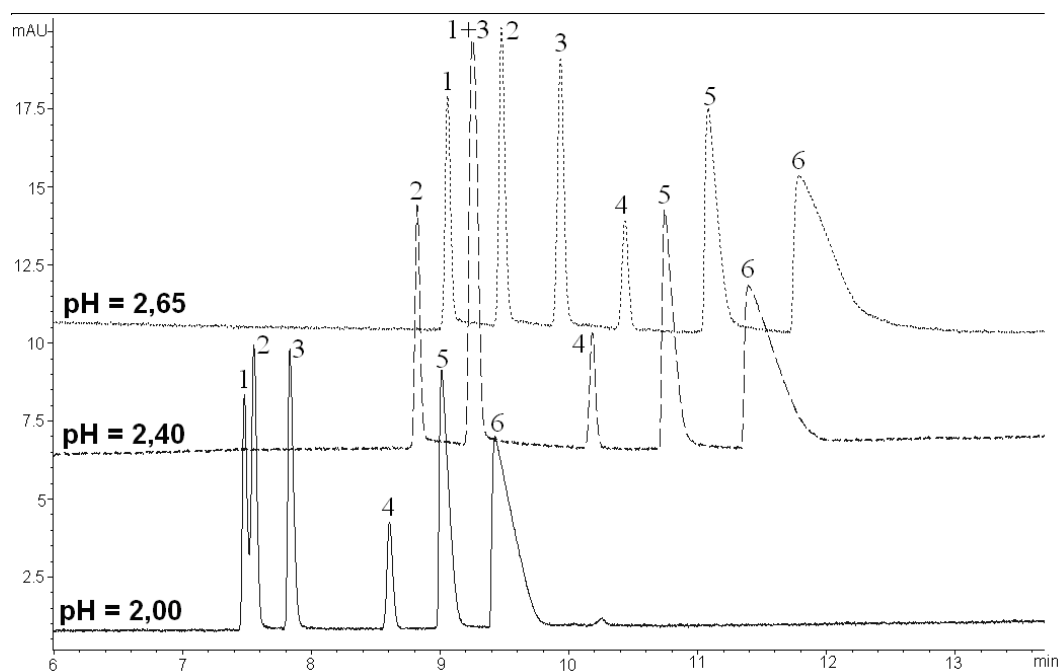


Figura 43 - Efeito do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, contendo 20% ACN. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 230 nm. Solução padrão: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹, contendo 20% ACN. 1: A; 2: 78BQ; 3: 9MA; 4: 9ATHA; 5: 79DMBA; 6: DBA.

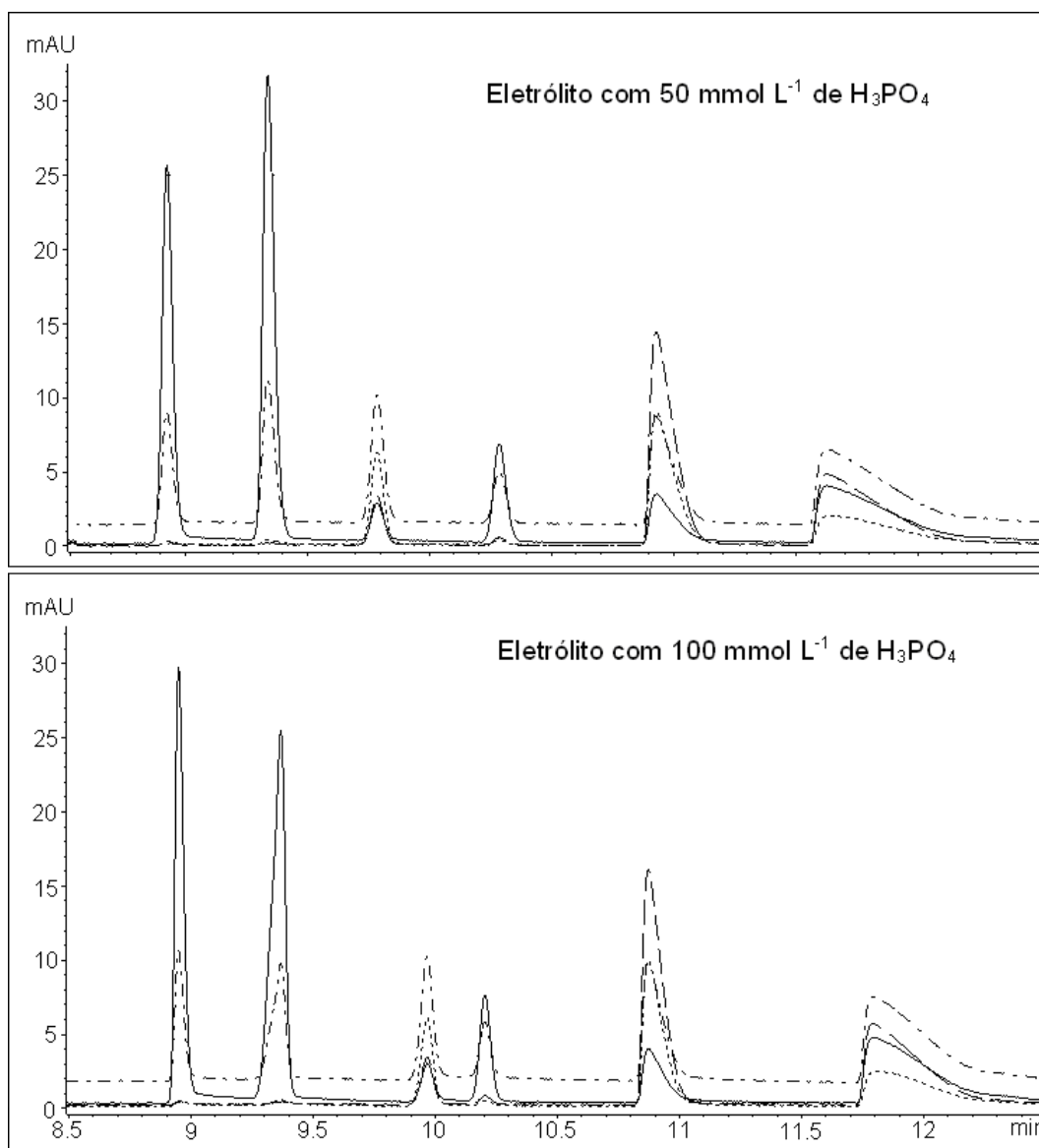


Figura 44 - Efeito da concentração do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 ou 100 mmol L⁻¹, contendo 20% ACN, pH 2,65. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 230, 250, 260 e 290 nm. Solução padrão: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹, contendo 20% ACN.

Para tentar diminuir ainda mais o alargamento dos dois últimos picos, eletrólitos com maiores teores de ACN foram testados (Figura 45). No entanto, foi observado que, apesar de ter havido um estreitamento dos dois últimos picos (79DMBA e DBA) com o aumento da concentração de ACN no eletrólito, o pico

da 78BQ deslocou-se para a direita, prejudicando a resolução no eletroferograma.

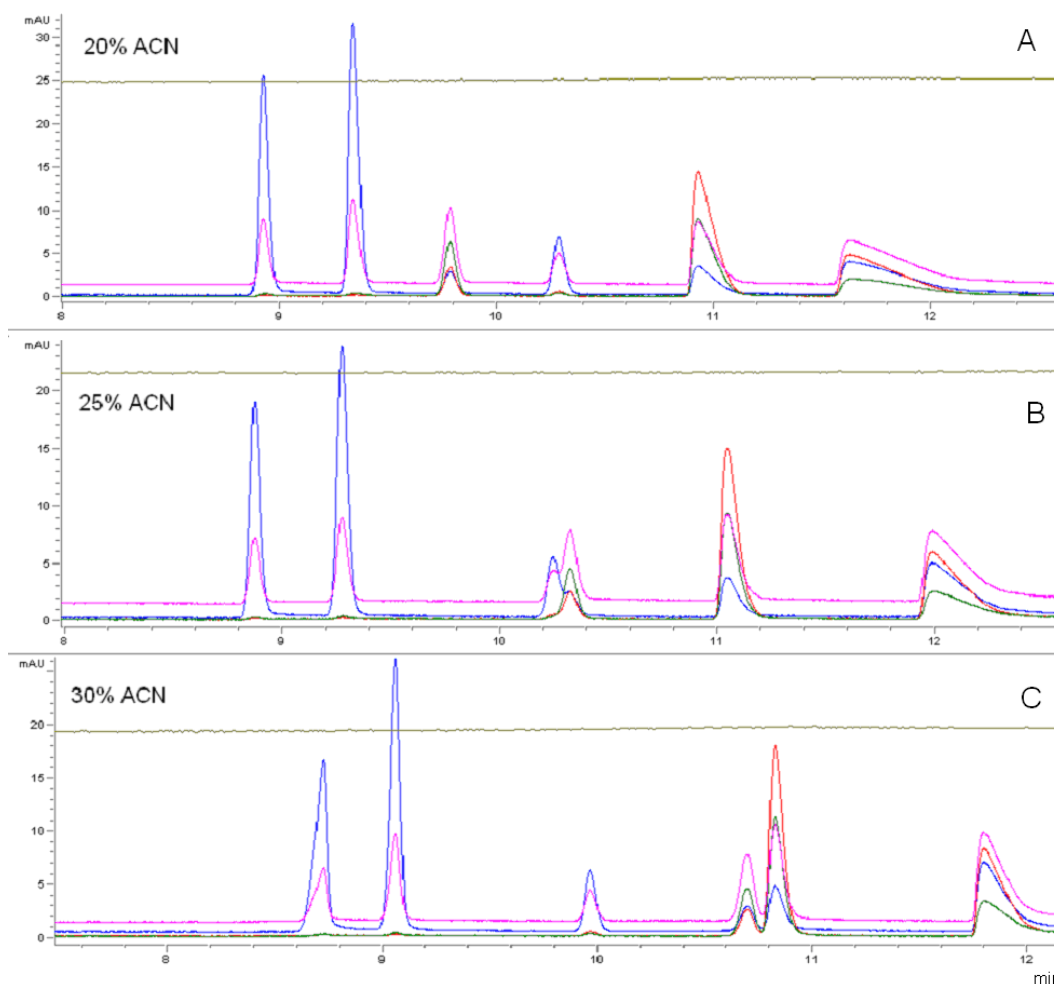


Figura 45 - Efeito da concentração de ACN no eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH 2,65. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 220, 250, 280 e 290 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ e 20% de ACN: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA.

Nas condições da Figura 45A, novos experimentos foram realizados para avaliar se seria possível aumentar o tempo de injeção, visando melhorar a sensibilidade do método. Uma solução diluída dez vezes (0,2 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 0,4 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA) foi injetada por 50, 100, 150 e 200 s, e os resultados estão apresentados na Figura 46. Verificou-se ser

possível a injeção da amostra por até 150 s, ou seja, também nessas condições foi possível realizar a pré-concentração do tipo *stacking*. No entanto, um pouco de perda da resolução, principalmente entre os picos da 9MA e da 78BQ, foi observado.

Como já era sabido que um aumento do teor de solvente orgânico no eletrólito poderia promover o estreitamento dos picos, além de deslocar o pico da 78BQ para a direita, optou-se por testar o eletrólito contendo 25% de ACN com os tempos de injeção de 100 e 150 s, visando melhorar a resolução. Resultados satisfatórios foram obtidos (Figura 47) e as condições de trabalho selecionadas para as próximas etapas, que incluem a construção das curvas analíticas e a análise de amostras de QAV, estão apresentadas na Tabela 9.

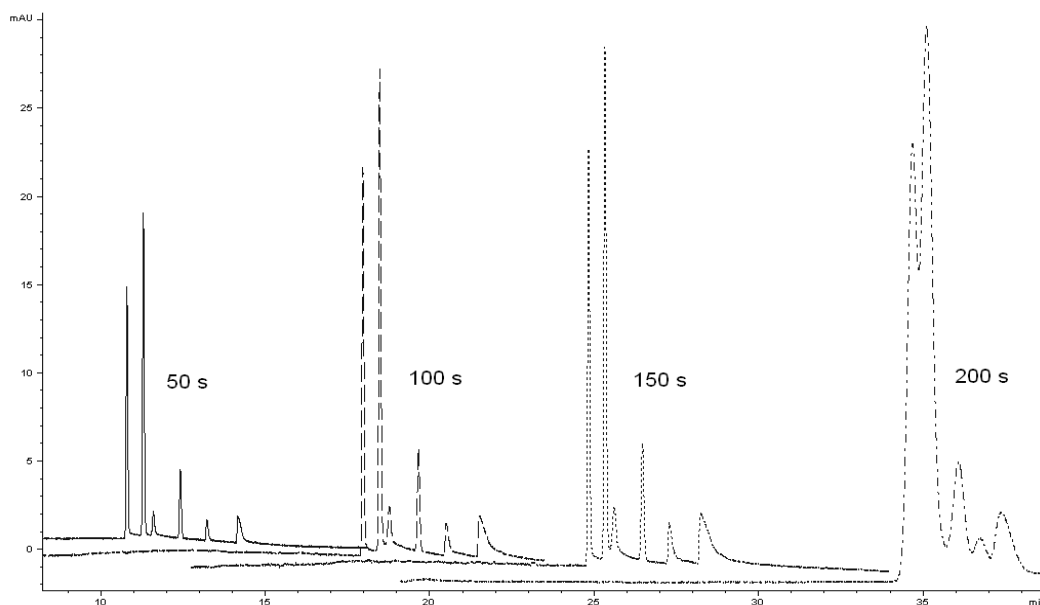


Figura 46 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ com 20% ACN e pH 2,65. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ e 20% de ACN: 0,2 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 0,4 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA.

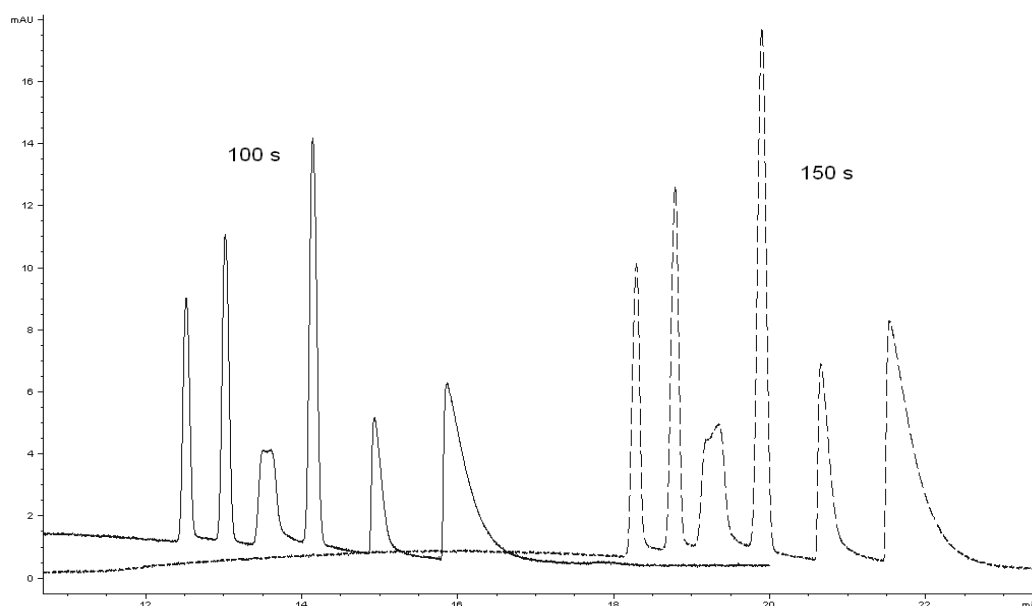


Figura 47 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ com 25% ACN e pH 2,65. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ e 20% de ACN: 0,2 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 0,4 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA.

Tabela 9 – Resumo das condições de trabalho selecionadas.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO SELECIONADA
Tampão	50 mmol L ⁻¹ de fosfato
Modificador orgânico	25 % de ACN
pH	2,65
Diferença de potencial aplicada	25 kV
Temperatura	25 °C
Pressão da injeção	50 mbar
Tempo de injeção	150 s
Comprimento efetivo do capilar	56 cm
Diâmetro interno do capilar	50 µm
Caminho óptico	150 µm
Solvente da amostra	1 mmol L ⁻¹ de fosfato, 20% de ACN
Tempo de análise	20 min

4.3.1.3.**Parâmetros analíticos de mérito**

Sob as condições de trabalho apresentadas na Tabela 9, a separação completa dos azaarenos A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA, foi obtida com os tempos de migração (t_M) para todas as substâncias menores que 20 min. A repetitividade para os valores de t_M e de área foi calculada a partir dos resultados de seis determinações consecutivas realizadas com a solução padrão contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de A e 9MA e $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA, correspondente ao meio da curva analítica. Os resultados de repetitividade foram expressos como os desvios-padrão relativos (DPR) desses dados. Os valores de DPR para os t_M foram menores que 2,5% para todos os analitos. Já para os valores de área, os valores de DPR foram menores que 12% para todos os analitos, com exceção da DBA que apresentou DPR igual a 23% (Tabela 10).

Tabela 10 – Repetitividade do método CZE para a análise dos azaarenos básicos.

	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	%RSD ^a	
		t_M	área
A	50	1,7	12
9MA	50	1,6	12
78BQ	250	1,5	3,2
9ATHA	250	1,6	2,7
79DMBA	250	1,9	9,5
DBA	250	2,4	23

^a Valores de repetitividade expressos como desvios-padrão relativos de seis determinações consecutivas.

Para a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, curvas analíticas foram construídas de modo que cada ponto das curvas fosse o resultado de três medições. As curvas analíticas (Figura 48, Figura 50, Figura 52, Figura 54, Figura 56 e Figura 58) foram construídas a partir das áreas dos picos em função da concentração de analito na solução injetada e a melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada pelo método dos mínimos quadrados com a ajuda do programa Microsoft® Office Excel 2003. O comportamento homocedástico foi confirmado através dos gráficos dos resíduos (Figura 49, Figura 51, Figura 53, Figura 55, Figura 57 e Figura 59), que apontam para a aleatoriedade dos resíduos ao longo da melhor reta. O comportamento linear na faixa de trabalho

estudada foi indicado pelos valores dos coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99 (0,9968 a 0,9997), apresentados na Tabela 11, valores estes comparáveis aos obtidos com o método HPLC-FD (0,9963 a 0,9985). Os erros associados aos interceptos b foram maiores que os próprios valores estimados para b , indicando que b não tem significado estatístico e as equações devem ser expressas como $y = ax$.

A detectabilidade do método foi avaliada pelas estimativas dos limites de detecção (LOD) e dos limites de quantificação (LOQ). Os LOD e os LOQ foram determinados como a concentração do analito que resultou em uma área do pico igual a três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez medições da solução de menor concentração na curva analítica (menor concentração que pôde ser detectada), de acordo com a literatura [52, 54]. Os valores de LOD ficaram entre 0,68 e 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os de LOQ entre 1,0 a 7,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondendo à mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos para o método HPLC-FD: LOD entre 0,26 e 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ entre 0,88 e 14,4 $\mu\text{g L}^{-1}$.

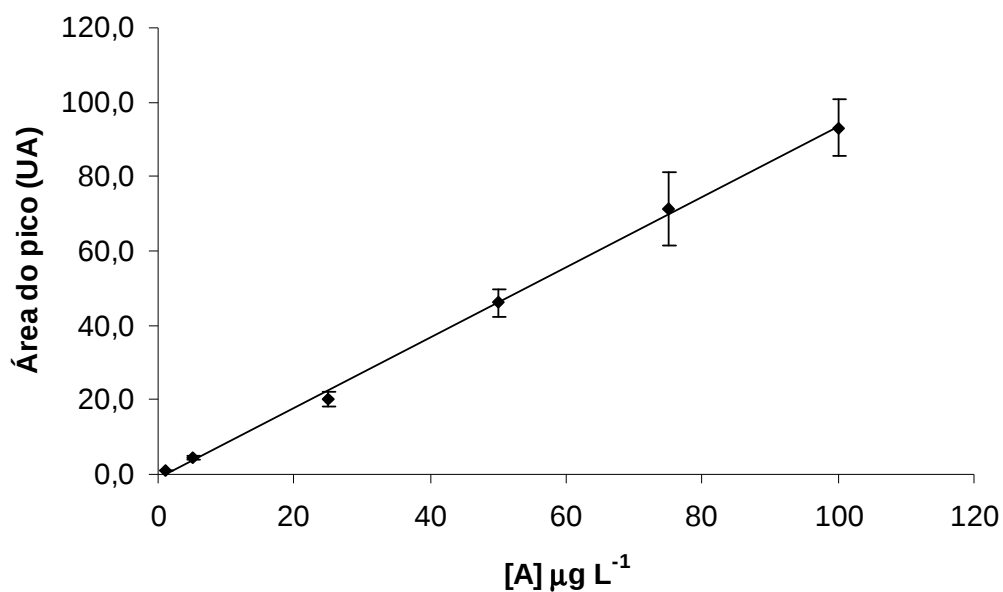


Figura 48 - Curva analítica da acridina (A) para determinações por CZE.

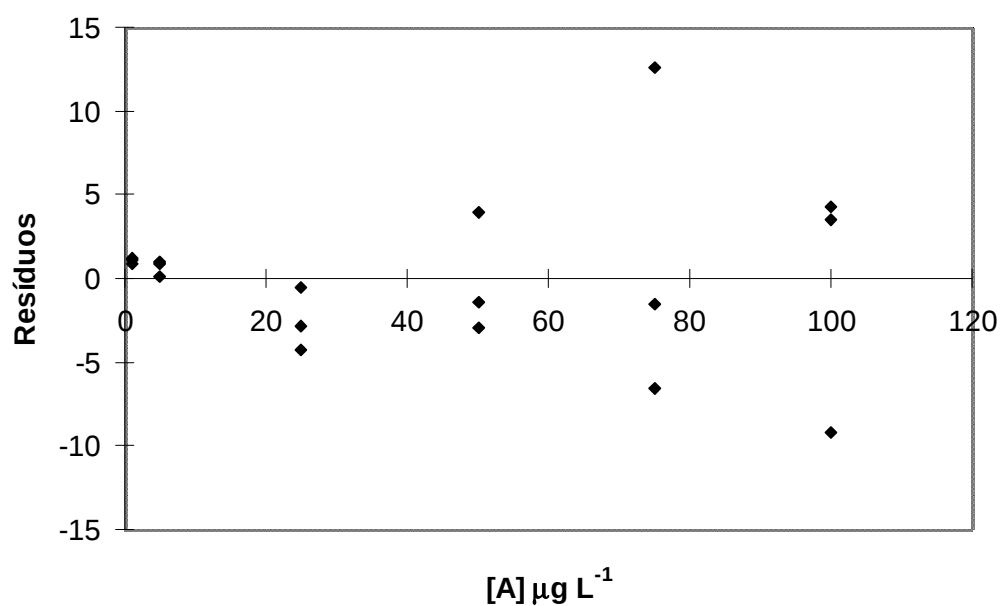


Figura 49 - Gráfico de resíduos para a quantificação de acridina (A) por CZE.

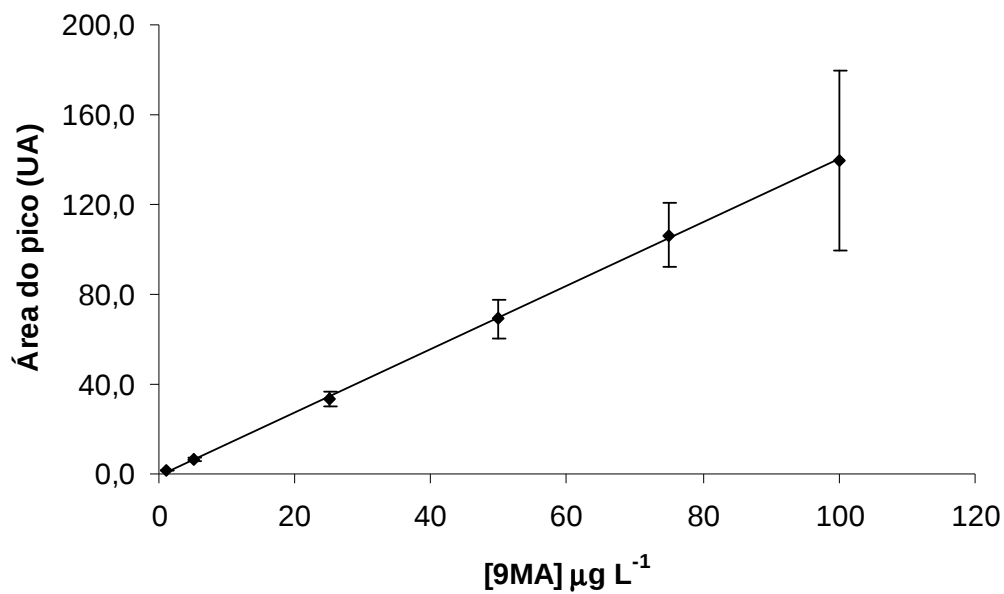


Figura 50 - Curva analítica da 9-metilacridina (9MA) para determinações por CZE.

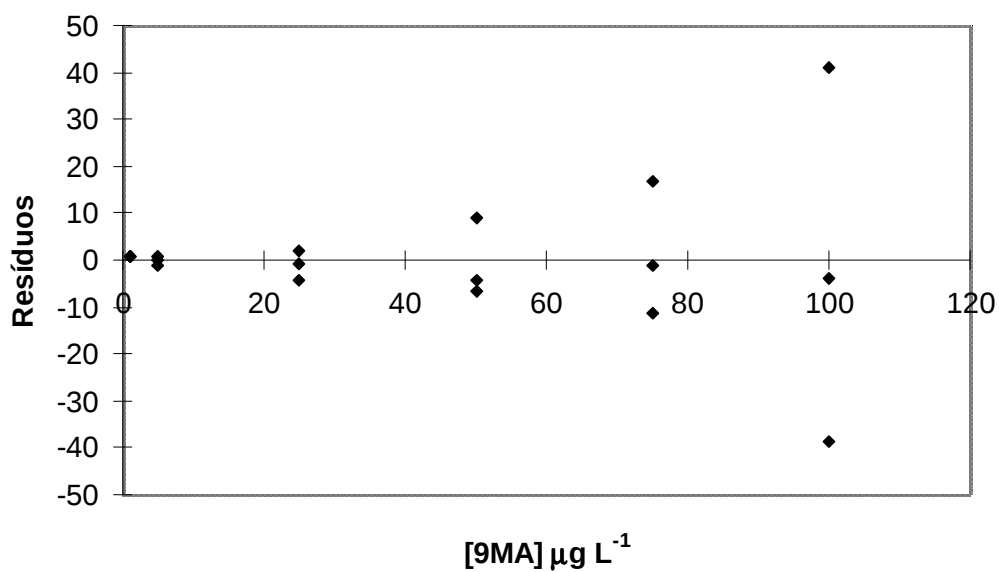


Figura 51 - Gráfico de resíduos para a quantificação de 9-metilacridina (9MA) por CZE.

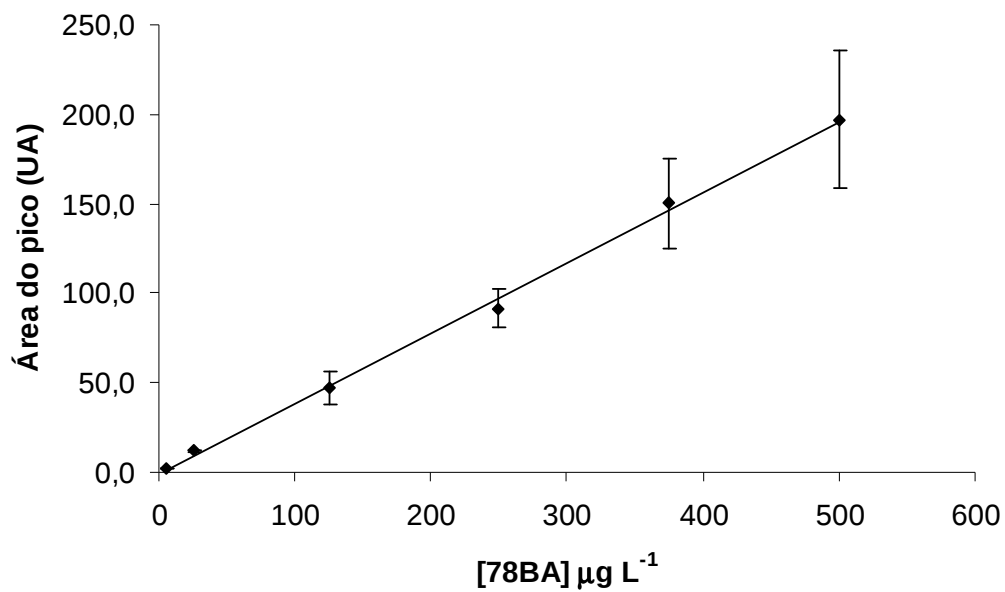


Figura 52 - Curva analítica da 7,8-benzoquinolina para determinações por CZE.

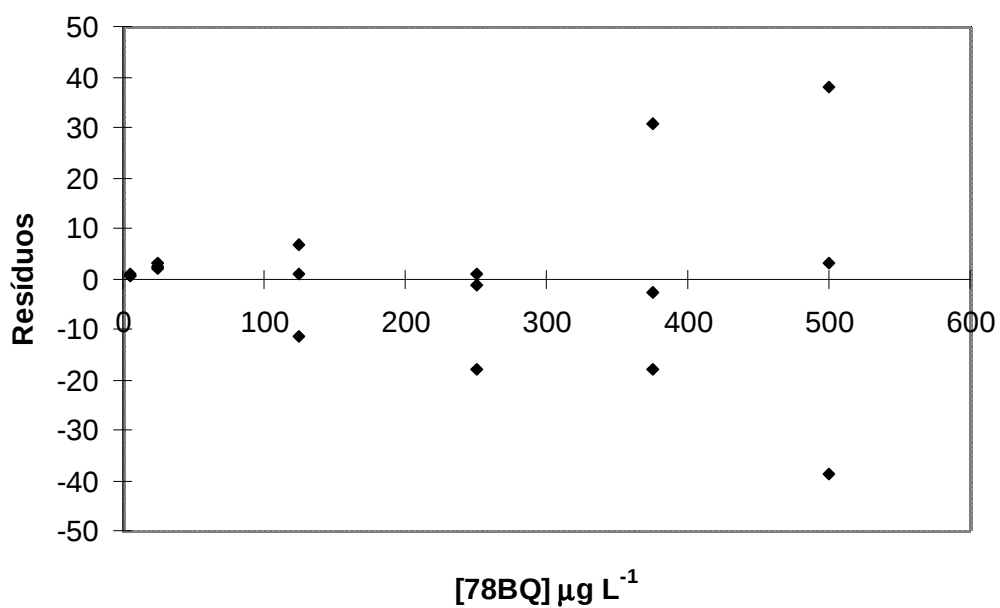


Figura 53 - Gráfico de resíduos para a quantificação de 7,8-benzoquinolina (78BQ) por CZE.

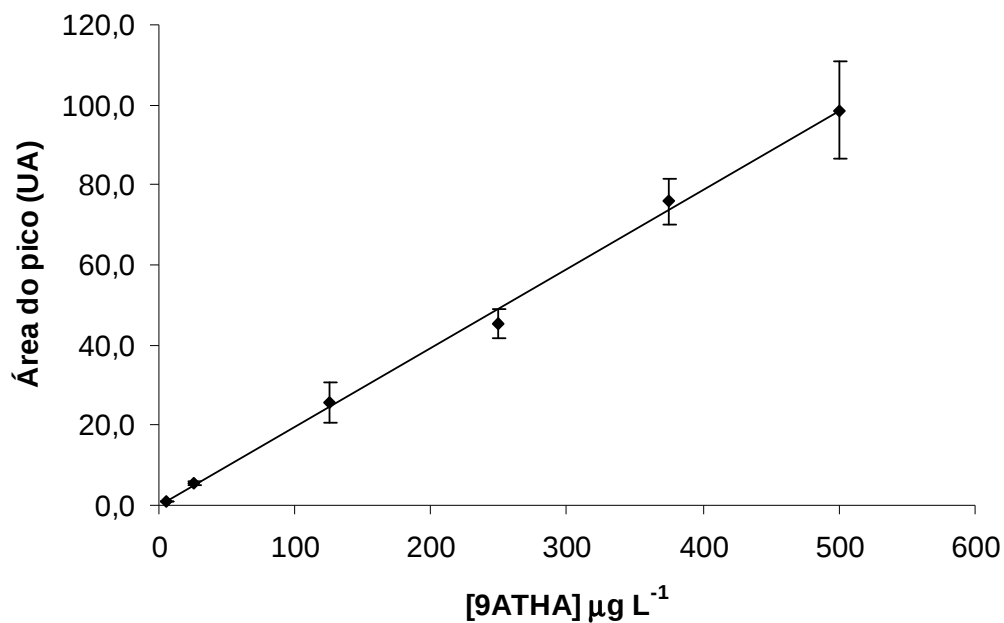


Figura 54 - Curva analítica da 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (9ATHA) para determinações por CZE.

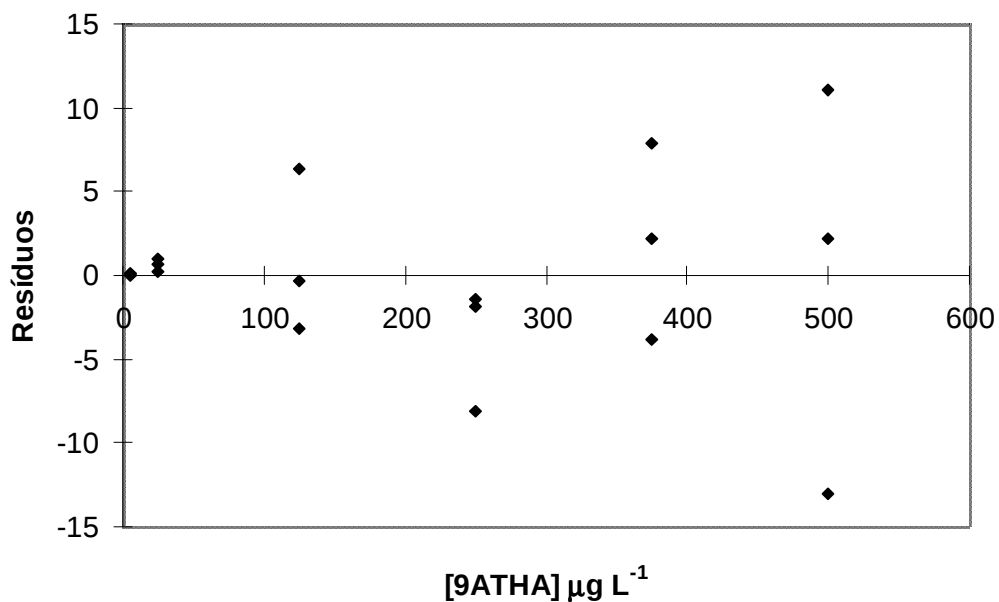


Figura 55 - Gráfico de resíduos para a quantificação de 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina (9ATHA) por CZE.

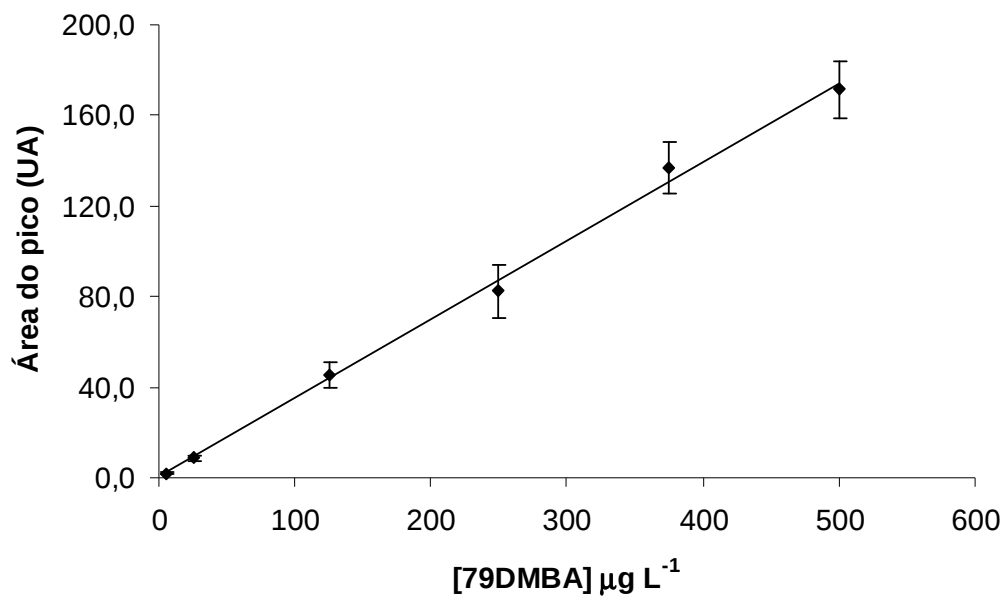


Figura 56 - Curva analítica da 7,9-dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA) para determinações por CZE.

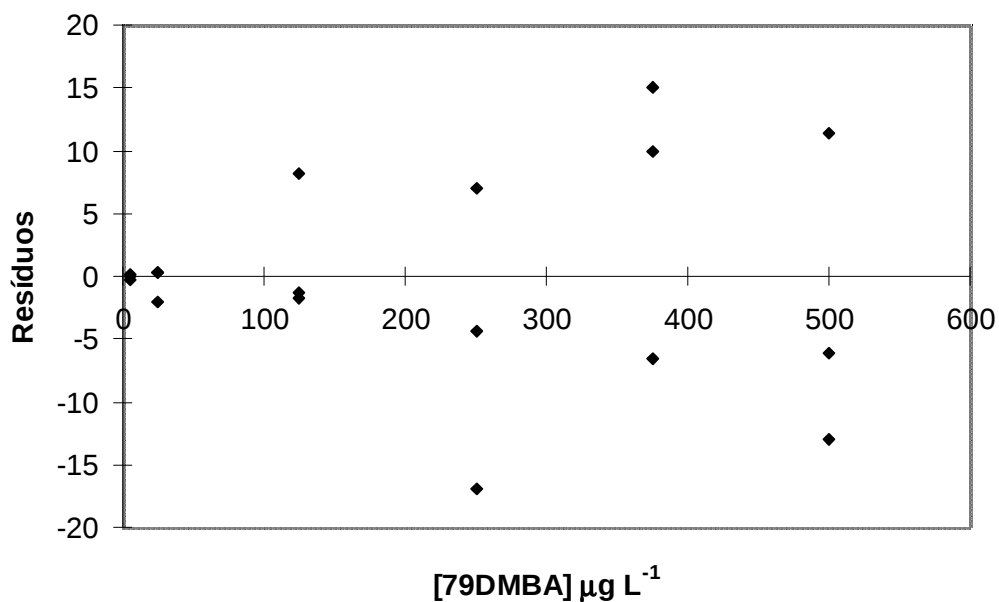


Figura 57 - Gráfico de resíduos para a quantificação de 7,9-dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA) por CZE.

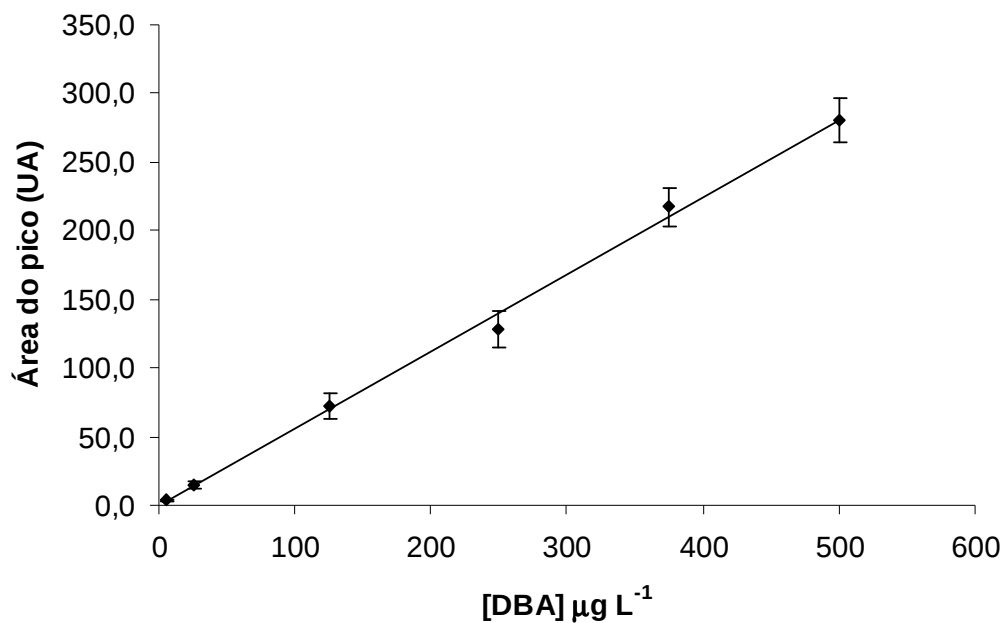


Figura 58 - Curva analítica da dibenzo[a,j]acridina (DBA) para determinações por CZE.

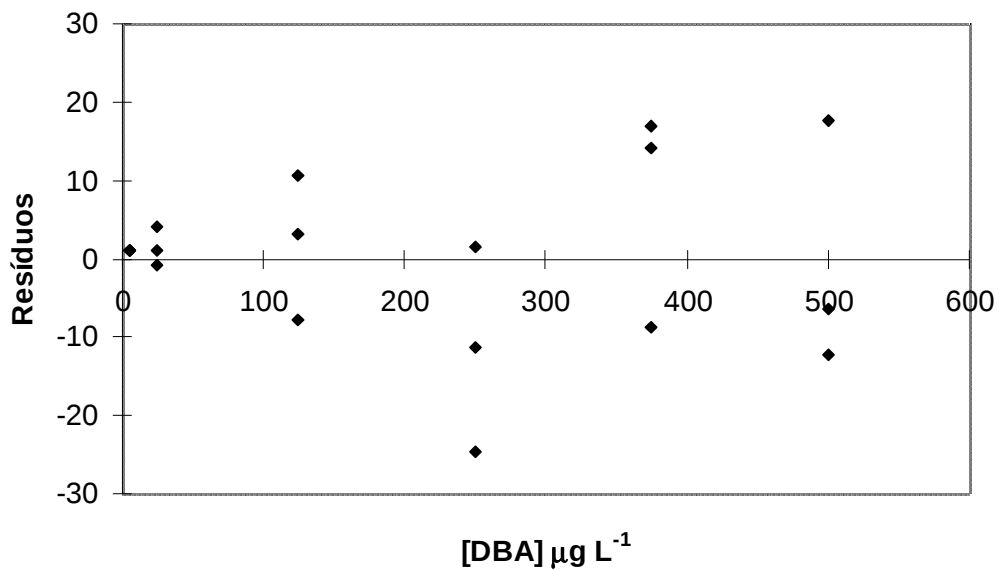


Figura 59 - Gráfico de resíduos para a quantificação de dibenzo[a,j]acridina (DBA) por CZE.

Tabela 11 - Resultados de validação para o método CZE.

	Equação da curva analítica, $y = ax + b$ ^a		r^2	LOD	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	a	b			
A	$0,9443 \pm 0,0317$	$-0,9266 \pm 1,7726$	0,9986	1,5	2,8
9MA	$1,4082 \pm 0,0996$	$-0,6854 \pm 5,5740$	0,9997	0,68	1,0
78BQ	$0,3933 \pm 0,0225$	$-0,5251 \pm 6,2838$	0,9981	3,2	7,7
9ATHA	$0,1969 \pm 0,0073$	$0,0216 \pm 2,0388$	0,9971	0,77	2,8
79DMBA	$0,3473 \pm 0,0110$	$0,2909 \pm 3,0634$	0,9975	0,89	4,9
DBA	$0,5621 \pm 0,0146$	$-0,5352 \pm 4,0910$	0,9968	1,3	2,1

^a y = área do pico do analito; x = concentração de analito, $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.3.1.4.

Análise das amostras de QAV

Num primeiro momento, com o objetivo de avaliar a recuperação obtida com o procedimento de extração modificado, realizado com a eluição dos analitos do cartucho PRS feita com ACN:amônia (9:1) (item 4.2.1.3), uma amostra de QAV fortificada com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de 79DMBA e DBA foi submetida a este procedimento de extração e analisada por CZE. Uma solução padrão contendo os seis azaarenos básicos, na mesma concentração esperada para 100% de recuperação no extrato ($2,0$ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, para um FPC = 5), também foi submetida ao procedimento de extração e analisada por CZE, e foi usada como referência para o cálculo dos valores de recuperação. Os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 60, onde pode ser observado que não houve interferência da matriz do QAV sobre os picos dos analitos no eletroferograma do extrato para o nível de fortificação avaliado. No entanto, os valores de recuperação obtidos nesse primeiro teste (A = 63%; 9MA = 73%; 78BQ = 56%; 9ATHA = 71%; 79DMBA = 65% e DBA = 23%) foram relativamente baixos, indicando que, ou houve perdas durante o procedimento de extração, ou o solvente ACN:amônia (9:1) não foi um bom eluente para os analitos.

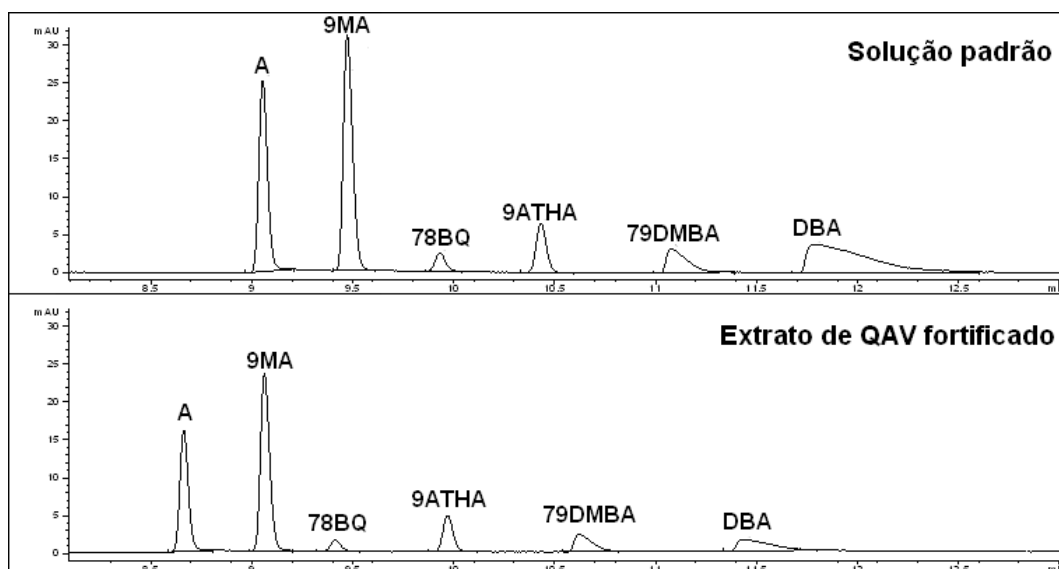


Figura 60 – Avaliação do procedimento de extração realizado com eluição dos analitos com ACN:amônia (9:1). Análise por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ com 25% ACN e pH 2,65. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ e 20% de ACN contendo 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA. Extrato de QAV fortificado com 0,4 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 0,8 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA, em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ e 20% de ACN.

O método CZE em estudo foi aplicado para a determinação dos seis azaarenos básicos em uma amostra de QAV. Para avaliar a exatidão, uma alíquota dessa amostra foi fortificada com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de A e 9MA e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA e submetida ao procedimento de extração antes da análise pelo método CZE. O mesmo procedimento de extração, descrito no item 2.1.2 com as modificações apresentadas no item 4.2.1.3, foi realizado com a eluição dos analitos feita com metanol:amônia (9:1) e com ACN:amônia (9:1), com fator de pré-concentração igual a dois. Ambas as extrações, utilizando metanol:amônia ou ACN:amônia, foram feitas em triplicata e os extratos resultantes, assim como as soluções-padrão das curvas analíticas, foram analisados por CZE, nas condições apresentadas na Tabela 9 (Figura 61), e pelo método HPLC-FD apresentado no capítulo 3 [79] para a comparação dos resultados. Para verificar se toda a amônia utilizada no procedimento de extração era eliminada dos extratos obtidos, os valores de pH dos extratos e das soluções-padrão foram medidos e todos ficaram próximos de 3,3. O método HPLC-FD foi utilizado como método de referência e os valores de recuperação obtidos pelos dois métodos estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Recuperação dos azaarenos básicos em amostra de QAV fortificada.

	Fortificação $\mu\text{g L}^{-1}$	Método HPLC-FD				Método CZE			
		MeOH:NH ₃		ACN:NH ₃		MeOH:NH ₃		ACN:NH ₃	
		Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
		%	%	%	%	%	%	%	%
A	10	107	1	82	14	61	5	41	44
9MA	10	101	2	80	10	74	13	51	44
78BQ	50	99	3	84	16	122	4	97	19
9ATHA	50	88	7	57	18	92	5	61	8
DBA	50	95	4	78	7	74	2	62	15
79DMBA	50	77	1	72	14	76	4	63	16

Cada valor de recuperação (Rec) e desvio padrão relativo (RSD) é a média de três ensaios independentes. Esses valores foram calculados levando em consideração o fator de pré-concentração do procedimento de extração (FPC = 2). MeOH = metanol.

Para avaliar o efeito do solvente e do método de análise utilizados sobre os valores de recuperação dos azaarenos, uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores, com nível de confiança de 95% e $n = 3$, foi realizada. O objetivo foi o de comparar o efeito dos diferentes tratamentos (Tabela 13) sobre as médias obtidas para os valores de recuperação.

Tabela 13 – Diferentes tratamentos para avaliar o efeito sobre a recuperação dos azaarenos.

Tratamento	Solvente	Método
1	MeOH:NH ₃	HPLC-FD
2	MeOH:NH ₃	CZE
3	ACN:NH ₃	HPLC-FD
4	ACN:NH ₃	CZE

Os valores de F calculados para todos os analitos, quando se considerou o efeito do solvente utilizado na extração (metanol:amônia ou ACN:amônia), foram todos maiores que o $F_{\text{crítico}}$, ou seja, as médias dos valores de recuperação para os dois casos foram consideradas estatisticamente diferentes. Como pode ser observado na Tabela 12, os valores de recuperação obtidos para o procedimento de extração realizado com a eluição dos analitos com metanol:amônia (9:1) foram sempre maiores que os obtidos com ACN:amônia (9:1), determinados tanto pelo método CZE quanto pelo método de referência (HPLC-FD), indicando que o solvente metanol:amônia foi mais eficiente na eluição dos azaarenos básicos do cartucho PRS que o solvente ACN:amônia.

Para o caso onde a origem da variação era o método de análise, apenas para o analito 9ATHA as médias foram consideradas iguais ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$), indicando que a exatidão do método CZE não foi satisfatória, quando o método HPLC-FD foi usado como referência. Além disso, não houve efeito de interação entre os dois fatores avaliados, pois todos os valores de $F_{\text{calculado}}$ para este caso foram menores que o $F_{\text{crítico}}$.

Os resultados obtidos até o momento indicam, com perspectivas bastante positivas, que é possível aplicar CZE com pré-concentração em linha para a determinação dos azaarenos básicos em QAV. Entretanto, um estudo mais detalhado no sentido de otimizar os parâmetros da análise para melhorar a resolução e a sensibilidade e diminuir o tempo de análise ainda se faz necessário. Além disso, o procedimento de extração dos analitos da amostra de QAV deve ser ajustado para, além de proporcionar bons resultados de recuperação, ser compatível com o método de análise desenvolvido.

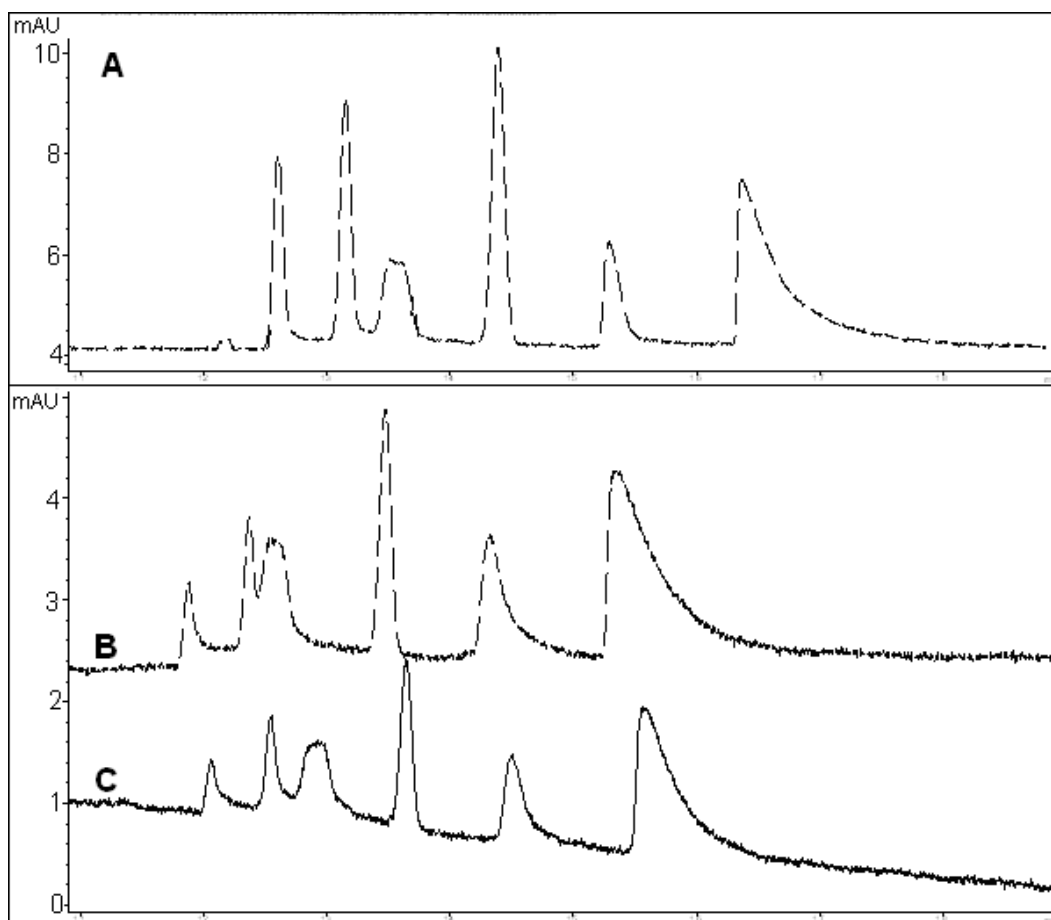


Figura 61 – Avaliação do efeito do procedimento de extração sobre a análise por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ com 25% ACN e pH 2,65. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 150 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 nm. (A) Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ e 20% de ACN contendo 50 µg L⁻¹ de A e 9MA e 250 µg L⁻¹ de 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA. (B) Extrato de QAV fortificado com 10 µg L⁻¹ de A e 9MA e 50 µg L⁻¹ de 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA, eluído com metanol:amônia. (C) Extrato de QAV fortificado com 10 µg L⁻¹ de A e 9MA e 50 µg L⁻¹ de 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA, eluído com ACN:amônia.

4.3.2. Estudos preliminares em MECC

Estudos preliminares para separação dos azaarenos básicos por MECC foram realizados. Uma avaliação dos parâmetros considerados importantes, relativos à constituição do eletrólito de trabalho (BGE) e aos parâmetros instrumentais, foi realizada. No caso do BGE, foram avaliados a concentração e o pH do tampão borato, a concentração do surfactante usado como fase pseudo-estacionária (no caso o SDS) e a quantidade de uréia usada como modificador.

Os parâmetros instrumentais avaliados foram a temperatura e a diferença de potencial aplicada. Diferentes tempos de injeção também foram avaliados.

Nos primeiros testes realizados com MECC para a separação dos seis analitos em estudo neste trabalho, foi utilizado um eletrólito composto de 20 mmol L⁻¹ de H₃BO₃, 40 mmol L⁻¹ de SDS e 20% Metanol, em volume, com o pH ajustado a 9,0. Uma mistura contendo 2,0 mg L⁻¹ de A e 9MA, 4,0 mg L⁻¹ de 78BQ e 9ATHA, e 8,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA foi injetada por 10 s, a uma temperatura de 25 °C e com uma diferença de potencial aplicada de +25 kV. Nessas condições, apenas cinco picos foram observados no eletroferograma. Alguns estudos foram realizados com o objetivo de melhorar a separação entre os picos, variando os teores de ácido bórico, de metanol e de SDS no eletrólito e o seu pH. Apesar dessas variações, sempre cinco picos ou, em alguns casos, menos de cinco picos, eram observados. Na tentativa de alcançar a resolução dos seis analitos, foi adicionada uréia ao eletrólito, nas concentrações de 1, 2 ou 3 mol L⁻¹, e os resultados estão apresentados na Figura 62.

Como pode ser observado na Figura 62A, o aumento da concentração de uréia adicionada ao eletrólito melhora a separação dos analitos, mas também aumenta o tempo de análise. Com 3 mol L⁻¹ de uréia no eletrólito obteve-se a separação completa dos analitos e o tempo de análise foi de, aproximadamente, 45 min. Na Figura 62B é mostrado, de maneira mais evidente, que o último pico observado no eletroferograma obtido com o eletrólito sem uréia era, na verdade, a sobreposição entre dois picos. Essa figura mostra a reposta obtida com a detecção em 290 nm, pois os dois últimos analitos eluídos, a 79DMBA e a DBA, absorvem mais neste comprimento de onda.

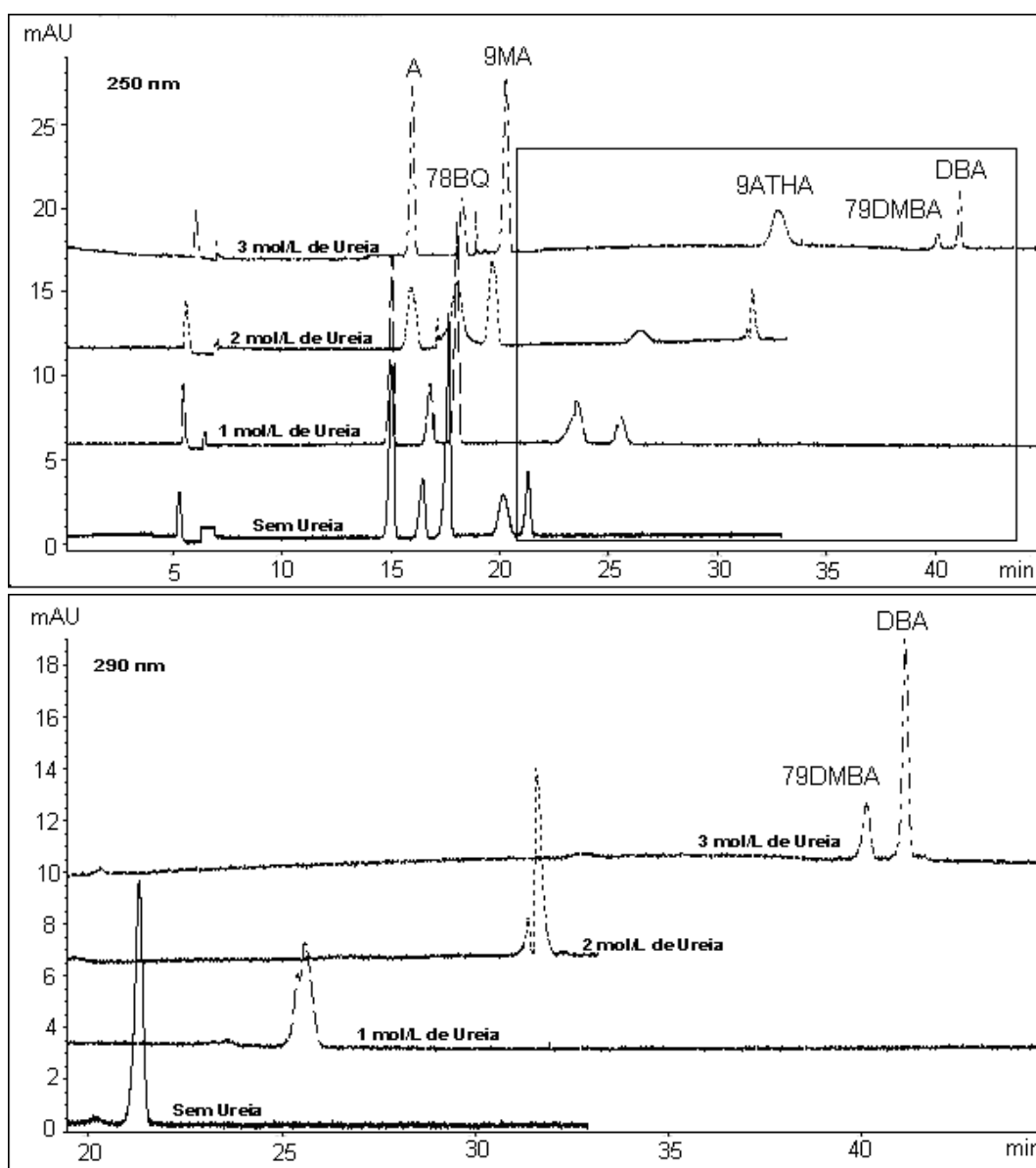


Figura 62 - Efeito da concentração de uréia no eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS e 20% de metanol, pH 9,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. (A): eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção. (B): região destacada em A com $\lambda = 290 \text{ nm}$ para a detecção.

Com base na melhor resolução, escolheu-se trabalhar com 3 mol L^{-1} de uréia no eletrólito. Um teste envolvendo variação de pH e de concentração de SDS no eletrólito foi realizado, sendo este apresentado na Figura 63. Pode-se observar que o aumento do pH diminuiu o tempo de análise, mas prejudicou a

resolução, e o aumento do teor de SDS fez o tempo de análise aumentar ainda mais. Outros testes preliminares indicaram que a diminuição do valor do pH do eletrólito também causou o aumento do tempo de análise. Dentre as condições testadas, a que resultou num melhor compromisso entre resolução e tempo de análise foi o eletrólito contendo 40 mmol L⁻¹ de SDS e pH 9,0.

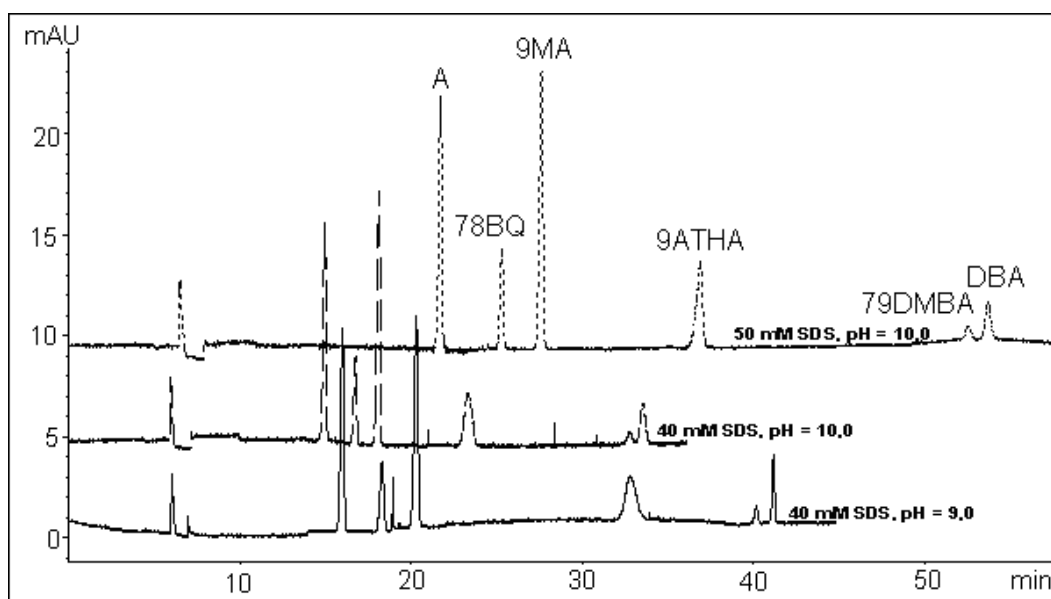


Figura 63 - Efeito do pH e da concentração de SDS no eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L⁻¹ contendo 40 ou 50 mmol L⁻¹ de SDS, 20% de metanol e 3 mol L⁻¹ de uréia, pH 9,0 ou 10,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250$ nm para a detecção.

Na etapa seguinte, um teste variando a concentração do eletrólito (ácido bórico) foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 64. Observou-se que este parâmetro influenciava muito o tempo de análise, quanto maior a concentração de H₃BO₃ maior o tempo de análise. Porém, muito pouca resolução entre os dois últimos picos foi obtida. Mais uma vez, visando um melhor compromisso entre resolução e tempo de análise, optou-se por manter a concentração de ácido bórico em 20 mmol L⁻¹.

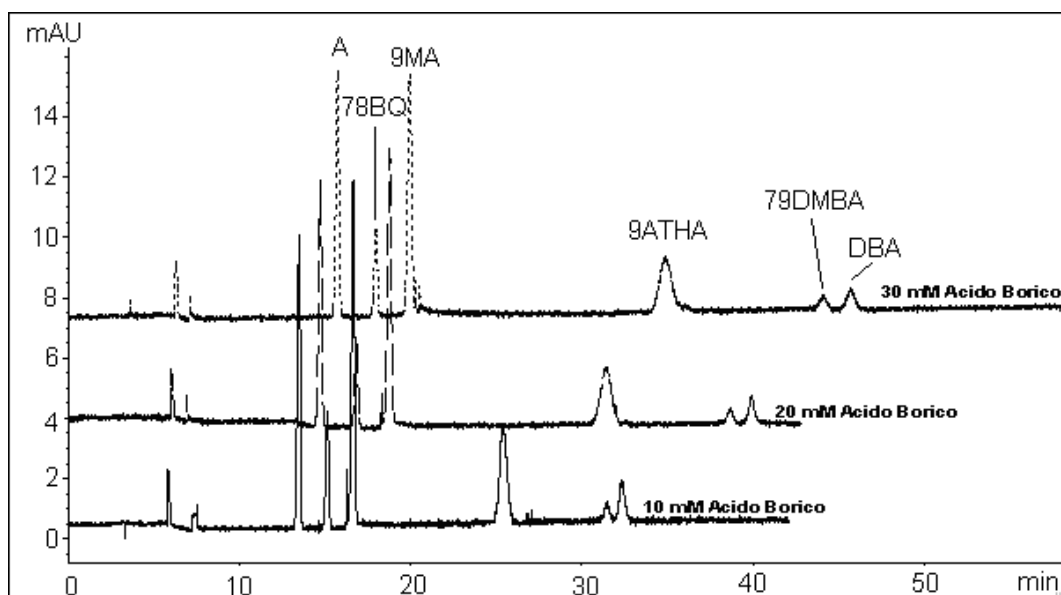


Figura 64 - Efeito da concentração de H_3BO_3 no eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 10, 20 ou 30 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 3 mol L^{-1} de uréia, pH 9,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção.

Para avaliar se seria possível aumentar o tempo de injeção, visando melhorar a sensibilidade do método, uma solução diluída quatro vezes para a 79DMBA, analito de menor sensibilidade, e dez vezes para os outros analitos, foi injetada usando tempos maiores: 10, 20, 30 e 40 s. Picos bem resolvidos e sem distorção só foram observados com injeção de até 30 s (Figura 65).

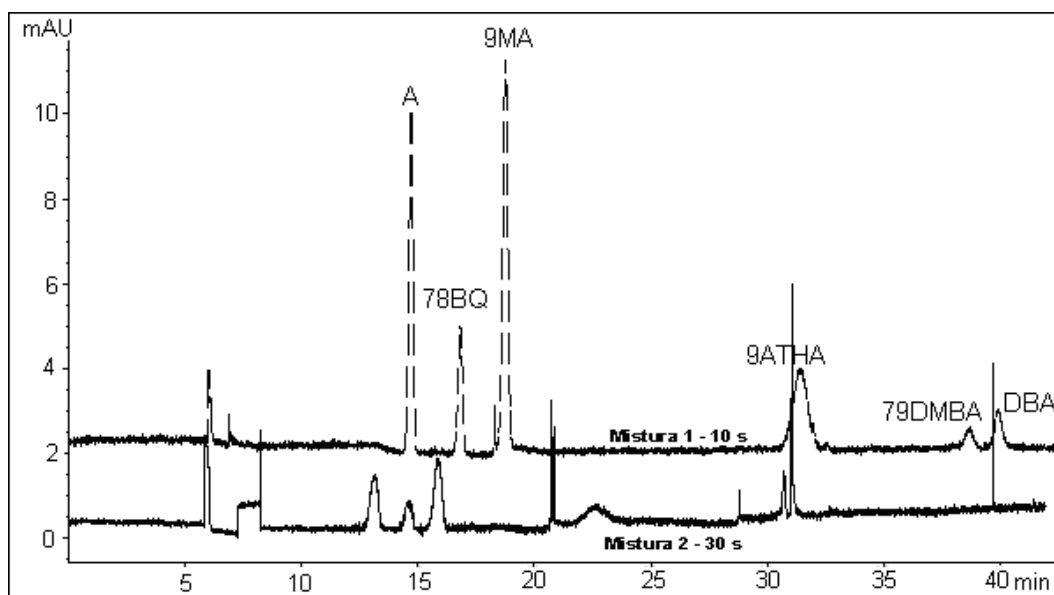


Figura 65 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 3 mol L^{-1} de uréia, pH 9,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C e 10 ou 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção. Mistura 1: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A e 9MA, $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 78BQ e 9ATHA, e $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e 79DMBA. Mistura 2: $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de A e 9MA, $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de 78BQ e 9ATHA, $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 79DMBA.

Como até aqui o alto tempo de análise era um fator crítico, para tentar diminuí-lo optou-se por utilizar apenas 2 mol L^{-1} de uréia no eletrólito (Figura 62) para fazer um estudo dos parâmetros instrumentais temperatura e diferença de potencial aplicada. O efeito da variação da diferença de potencial aplicada sobre a separação dos analitos está apresentado na Figura 66. Observa-se que, quanto menor a diferença de potencial aplicada, maior o tempo de análise, pois a velocidade eletroforética de um soluto é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada. No entanto, a resolução entre os picos da 79DMBA e da DBA não variou significativamente. Na Figura 62B é mostrado, de maneira mais evidente, essa pouca influência da diferença de potencial aplicada sobre a resolução entre os dois últimos picos, pois essa figura apresenta a reposta obtida com a detecção em 290 nm , comprimento de onda em que a 79DMBA e a DBA absorvem mais.

No caso da temperatura, Figura 67, observa-se um comportamento semelhante: quanto menor a temperatura, maior o tempo de análise. Isso ocorre porque quanto menor a temperatura, maior será a viscosidade do eletrólito de

trabalho e, conseqüentemente, maior o fluxo eletroosmótico. No entanto, através da Figura 67B, que evidencia os sinais da 79DMBA e da DBA, observa-se que a temperatura teve alguma influência sobre a separação destes dois analitos. A temperatura de 30°C parece ser a mais indicada, pois foi a que promoveu o melhor compromisso entre tempo de análise, resolução e intensidades dos picos. O eletroferograma obtido com os parâmetros instrumentais ajustados para 30 kV e 30°C e com o eletrólito com 2 mol L⁻¹ de uréia (20 mmol L⁻¹ de H₃BO₃, 40 mmol L⁻¹ de SDS e 20% de metanol, pH 9,0) está apresentado na Figura 68, e mostra uma redução do tempo de análise em 17 min, ou seja, uma queda de 45 para 28 min quando comparado com o resultado obtido com 25 kV e 25°C e com o mesmo eletrólito com 3 mol L⁻¹ de uréia (Figura 62).

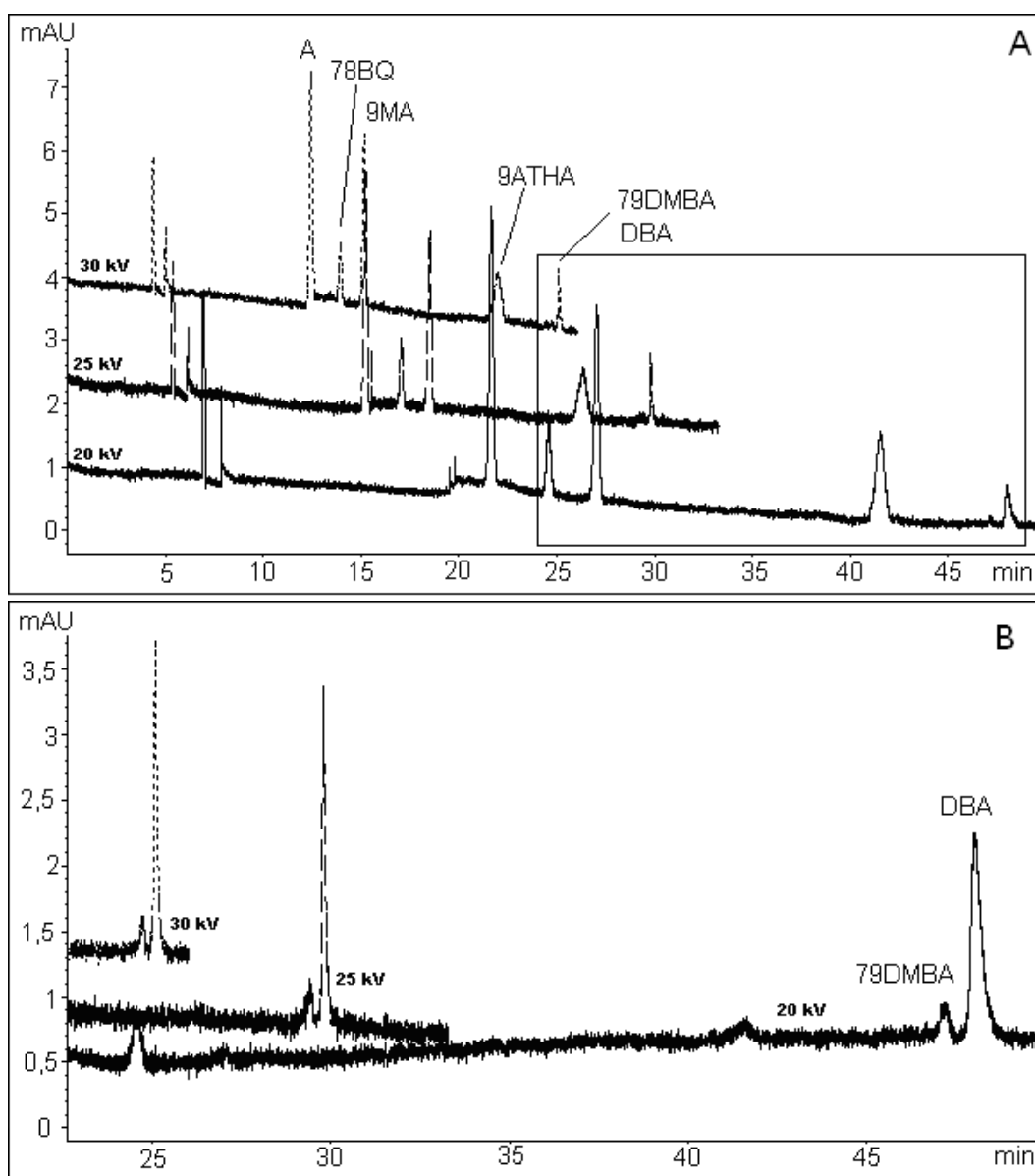


Figura 66 - Efeito da diferença de potencial aplicada sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 2 mol L^{-1} de uréia, pH 9,0. Condições instrumentais: 25°C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Solução padrão: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA. (A): eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção. (B): região destacada em A com $\lambda = 290 \text{ nm}$ para a detecção.

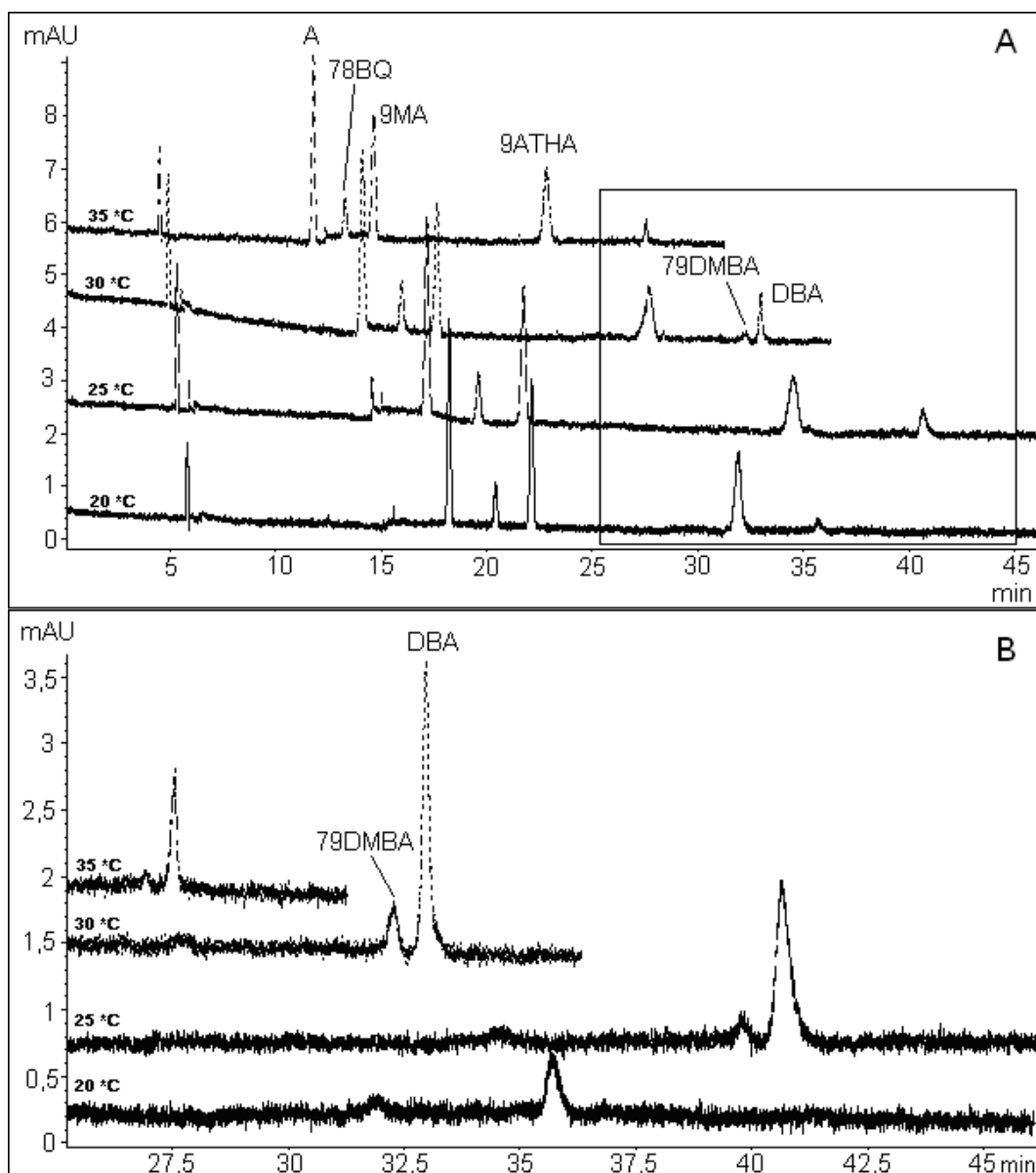


Figura 67 - Efeito da temperatura sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 2 mol L^{-1} de uréia, pH 9,0. Condições instrumentais: 25 kV e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Solução padrão: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA. (A): eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção. (B): região destacada em A com $\lambda = 290 \text{ nm}$ para a detecção.

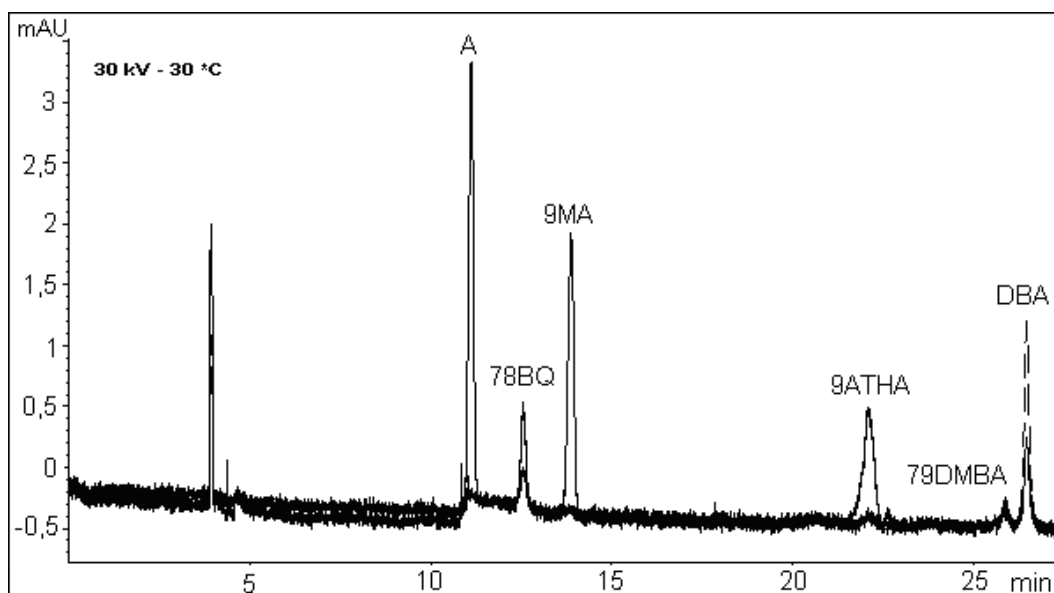


Figura 68 - Separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 2 mol L^{-1} de uréia, pH 9,0. Condições instrumentais: 30 kV, 30 °C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ (—) e $\lambda = 290 \text{ nm}$ (— —) para a detecção. Solução padrão: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA.

Uma avaliação um pouco mais detalhada sobre a influência do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 69. Nesse estudo, uma faixa de pH de 8,0 a 10,0 e as condições iniciais de 25 kV e 25 °C foram utilizadas. Como já mencionado, o comportamento esperado seria a diminuição do tempo de análise com o aumento do pH do eletrólito, já que neste caso há um aumento do fluxo eletroosmótico. Esse comportamento foi observado para os quatro primeiros picos do eletroferograma, mas, para os dois últimos picos, da 79DMBA e da DBA, houve um desvio deste comportamento para o pH 10,0, no qual estes dois analitos apresentaram tempos de migração maiores que em pH 9,5.

O pH 9,5 foi escolhido para a realização de um teste utilizando 30 kV e 30 °C, na tentativa de diminuir ainda mais o tempo da separação, e o resultado deste teste está apresentado na Figura 70. Observou-se uma redução do tempo da separação em 5 min, ou seja, uma queda de 28 para 23 min quando comparado com o resultado obtido com pH 9,0 (Figura 68). No entanto, houve uma pequena perda na resolução dos picos da 79DMBA e da DBA.

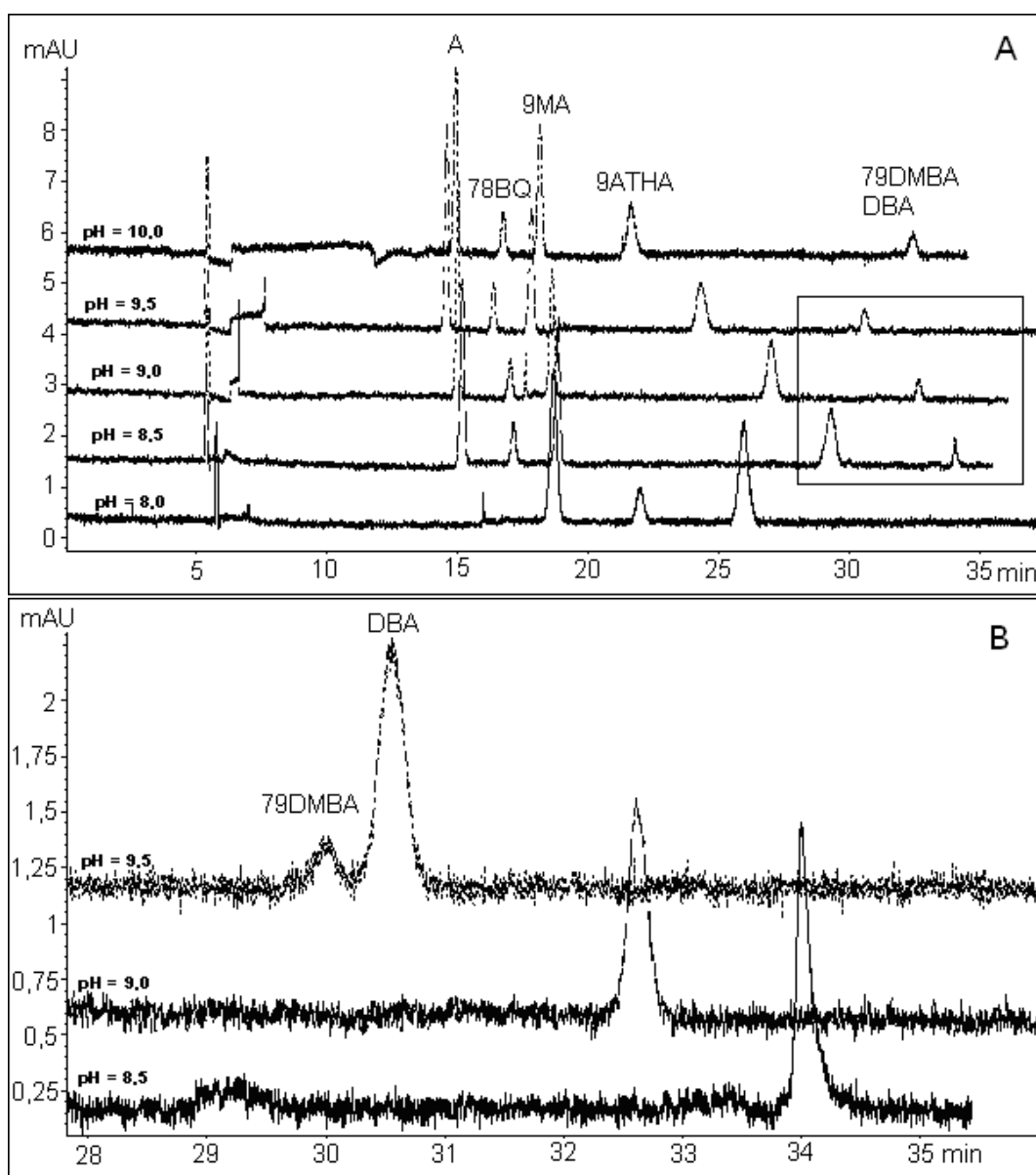


Figura 69 - Efeito do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 2 mol L^{-1} de uréia. Condições instrumentais: 25 kV, 25°C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Solução padrão: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA. (A): eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção. (B): região destacada em A com $\lambda = 290 \text{ nm}$ para a detecção.

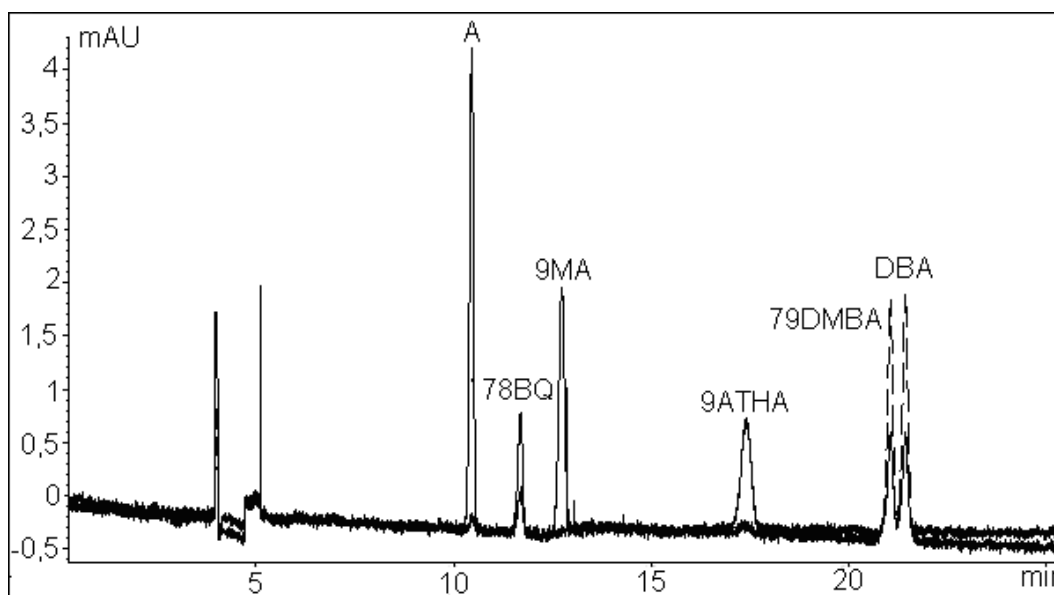


Figura 70 - Separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 2 mol L^{-1} de uréia, pH 9,5. Condições instrumentais: 30 kV, 30°C e 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ e $\lambda = 290 \text{ nm}$ para a detecção. Solução padrão: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e 79DMBA.

Finalmente, para avaliar se seria possível aumentar o tempo de injeção, nas condições da Figura 70, visando melhorar a sensibilidade do método, a solução contendo os analitos foi diluída duas vezes e injetada por 20 e 30 s e diluída quatro vezes e injetada por 30 e 40 s. Os eletroferogramas obtidos com 20 e 40 s estão apresentados na Figura 71. Picos sem distorção só foram observados com tempo de injeção de até 20 s e, mesmo assim, com perda na qualidade da resolução entre os picos da 79DMBA e da DBA. Apesar de os eletroferogramas obtidos com o tempo de injeção de 30 s não estarem mostrados na Figura 71, com este tempo de injeção os picos de todos os analitos ficaram deformados como os observados no eletroferograma obtido com 40 s.

Os resultados obtidos até o momento indicam que é possível aplicar MECC para a separação dos azaarenos básicos. Entretanto, um esforço maior no sentido de encontrar a composição do eletrólito e os parâmetros instrumentais mais adequados para melhorar a resolução e diminuir o tempo de análise ainda se faz necessário. Além disso, visando melhorar a sensibilidade do

método, procedimentos de pré-concentração em linha devem ser estudados, o que inclui o estudo da influência do solvente da amostra.

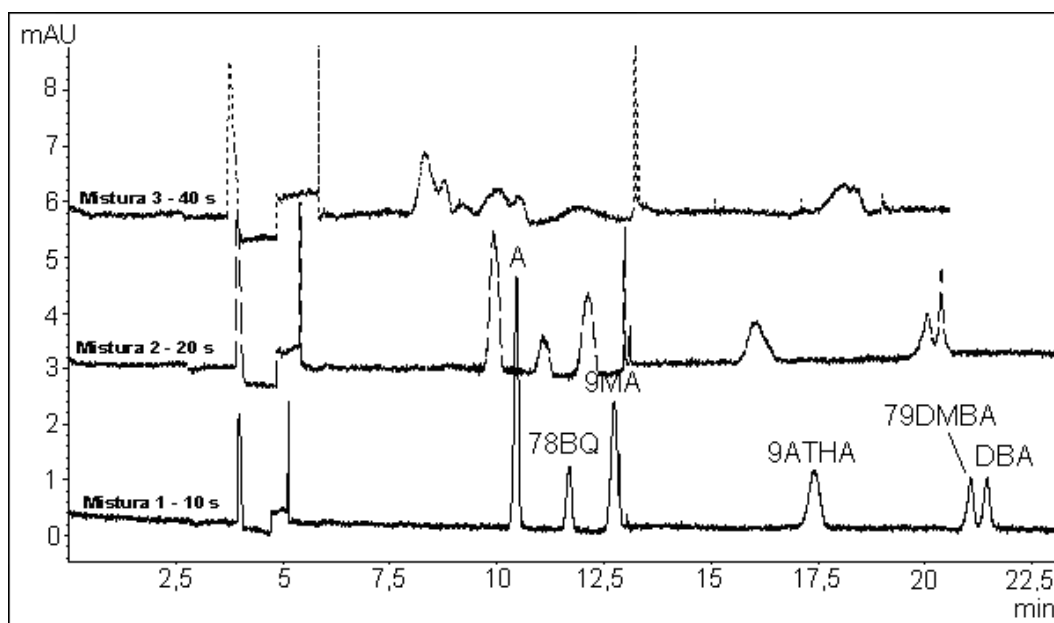


Figura 71 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por MECC, usando tampão borato 20 mmol L^{-1} contendo 40 mmol L^{-1} de SDS, 20% de metanol e 2 mol L^{-1} de uréia, pH 9,5. Condições instrumentais: 30 kV, 30°C e 10, 20 ou 40 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar. Eletroferogramas obtidos com $\lambda = 250 \text{ nm}$ para a detecção. Mistura 1: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e 79DMBA. Mistura 2: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e 79DMBA. Mistura 3: $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de DBA e 79DMBA.