

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Maria Patrícia do Nascimento

Determinação da impureza de iodeto gerada na síntese de líquidos iônicos formados por sais de amônio quaternários e aminoácidos por CZE-UV

Juiz de Fora

2019

Maria Patrícia do Nascimento

Determinação da impureza de iodeto gerada na síntese de líquidos iônicos formados por sais de amônio quaternários e aminoácidos por CZE-UV

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2019

Aos meus pais, José Patrício e Maria das Mercês, por serem a minha inspiração e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, para que eu pudesse realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus por me iluminar, proteger e guardar.

Ao meu pai, José Patrício e a minha mãe, Maria das Mercês, meus maiores exemplos de vida. Por todo amor, carinho, dedicação, compreensão e cuidado. Por todos os conselhos, por sempre acreditarem em mim e me apoiar.

Ao meu irmão José Cláudio, pela amizade.

Ao meu orientador, Marcone, pela paciência, ensinamentos e amizade. Por acreditar em mim e no meu potencial e me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente.

Aos colegas do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) pelo companheirismo, amizade e ensinamentos.

Aos amigos, por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem a construir momentos especiais e felizes.

Aos companheiros de graduação e pós-graduação.

Aos membros da banca de defesa, Dr.^a Carla Beatriz Grespan Bottoli e a Dr.^a Paula Rocha Chellini, por terem aceitado o convite de participação e pelas críticas e sugestões pertinentes.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Instituto de Ciências Exatas, em especial ao Departamento de Química, minha segunda casa durante os últimos anos. Aos professores e demais funcionários, pela dedicação e por todos os ensinamentos.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro, principalmente à CAPES, pela bolsa concedida.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Os líquidos iônicos são sais orgânicos, compostos por um cátion orgânico e um ânion que pode ser orgânico ou inorgânico, com ponto de fusão abaixo de 100 °C, e propriedades características como baixa pressão de vapor e excelente estabilidade térmica. Os aminoácidos têm despertado grande interesse para a preparação de líquidos iônicos devido às características como a presença de um carbono quiral em sua estrutura e a biodegradabilidade, sendo possível estarem presentes nesses sais como um cátion ou ânion.

Nesse trabalho, foram analisados líquidos iônicos cujos aminoácidos L-leucina, L-valina e L-prolina agiram como ânions, sendo os cátions formados por sais de amônio quaternários derivados do glicerol. A síntese desses líquidos iônicos gerou o íon iodeto como impureza. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver métodos por eletroforese capilar de zona com detecção direta no UV para a determinação de iodeto como impureza desses sais orgânicos. A metodologia consistiu na utilização de 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20) como eletrólito, sendo realizada em fluxo eletrosmótico normal com polaridade invertida e injeção hidrodinâmica. Foi utilizando capilar de sílica fundida revestido com poliimida de 35 cm (26,5 ou 8,5 cm de comprimento efetivo) e 75 µm de diâmetro interno.

Foram avaliados diferentes modos de injeção de amostra, os quais foram a injeção convencional, a injeção pelo lado mais próximo ao detector (*outlet* - SEIP) e injeção múltipla (MICZE) para diminuir o tempo total da análise. As metodologias de injeção pelo *outlet* e múltipla foram desenvolvidas a partir da convencional.

Para a injeção pelo *outlet*, houve a inversão da pressão aplicada e da voltagem em relação ao método convencional. Para desenvolver o método por injeção múltipla, foram realizados dois planejamentos fatoriais, o primeiro 2³ e o segundo, 3², para obter as melhores condições que fornecessem o maior número de injeções, com melhor resolução e no menor tempo possível. Esses estudos possibilitaram a obtenção de um método que realizou 5 injeções consecutivas em menos de três minutos. Posteriormente, foi otimizada a forma de injeção das amostras, de modo que a melhor condição foi a que injetou a mesma amostra em uma única corrida, gerando uma análise em quintuplicata.

A quantificação das amostras e posterior comparação dos resultados usando a ANOVA a um fator, concluiu que há evidência de que não existem diferenças significativas entre eles, a 95% de confiança, sendo, portanto equivalentes.

Comparando o tempo total de análise dos métodos otimizados, conclui-se que a implementação da metodologia com injeção múltipla levou à sua diminuição assim como ao aumento da frequência analítica, já que ela permitiu trinta e uma injeções em uma hora, enquanto os outros dois métodos, injeção convencional e pelo *outlet*, possibilitaram sete e nove injeções por hora, respectivamente.

Palavras-chave: CZE-UV. Líquidos iônicos de aminoácidos. Íon iodeto.

ABSTRACT

Ionic liquids are organic salts, composed by an organic cation and an organic or inorganic anion, with melting point below 100 °C, and characteristic properties like low vapor pressure and excellent thermal stability. The amino acids have aroused great interest for the preparation of ionic liquids due to characteristics like a chiral carbon in its structure and biodegradability, being able to be present in these salts as a cation or an anion.

In this work, the ionic liquids analyzed were the ones in which the amino acids L-leucine, L-valine and L-proline acted as anions, being the cations composed by salts of quaternary ammonium derivatives of glycerol. These ionic liquids synthesis generated the ion iodide as impurity. Thus, the aim of this work was to develop methods by capillary zone electrophoresis with direct UV detection for the determination of iodide as impurity in these organic salts.

The methodology consisted of 40 mmol L⁻¹ of TRIS and 20 mmol L⁻¹ of HCl (pH 8.20) as background electrolyte (BGE), being performed in normal electroosmotic flow with inverted polarity and hydrodynamic injection. Coated fused silica capillary with polyimide of 35 cm (26.5 or 8.5 cm of effective length) and 75 µm of internal diameter was used.

Different modes of sample injection were evaluated, conventional injection, injection from the side closest to the detector (outlet – SEIP) and multiple injection (MICZE) to reduce the total analysis time. The outlet and multiple injection methodologies were developed from the conventional one.

For the outlet injection, the applied pressure and voltage were reversed in relation to the conventional method. To develop the multiple injection method, two factorial designs were performed, the first a 2³ and the second, 3², in order to obtain the best conditions that provides the higher number of injections, with better resolution and in the shortest possible time. These studies allowed to obtain a method that performs five consecutive injections in less than three minutes. After that, the sample injection mode was optimized in a way that the best condition was the one which injected the same sample in a single run, generating a five-fold analysis.

The samples quantification and posterior comparison of the results using the one-way ANOVA, concluded that there is evidence of no significant differences between them, in the 95% interval, being therefore equivalent.

Comparing the total analysis time of optimized methods, it was concluded that the implementation of multiple injection methodologies led to its decrease as well as the increase in analytical frequency, since it allowed thirty-one injections in one hour, while the other two

methods, conventional and outlet injection, enabled seven and nine injections per hour, respectively.

Key-words: CZE-UV. Amino acids ionic liquids. Iodide ion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do cátion 1 - 3-(tri-etilamônio)propano-1,2-diol.....	19
Figura 2: Estrutura do cátion tipo 2 - N-((1,3-dioxolan-4-il)metil)-N,N,N-trietilamônio.....	19
Figura 3: Estrutura dos aminoácidos.	20
Figura 4: Estrutura geral dos líquidos iônicos derivados de aminoácidos contendo o cátion tipo 1 ou o cátion tipo 2.	20
Figura 5: Estrutura do sal 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto usado na preparação dos LI de aminoácidos e sais de amônio quaternários.....	21
Figura 6: Esquema de obtenção do sal 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol a partir do glicerol.	21
Figura 7: Estrutura do sal intermediário 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto após troca aniônica do iodeto por hidroxila.....	22
Figura 8: Esquema de proteção das hidroxilas do sal intermediário 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto.....	22
Figura 9: Troca aniônica realizada para a preparação do LI tipo 2.	23
Figura 10: Representação esquemática do equipamento de CE.....	25
Figura 11: CE com polaridade e EOF normais para cátions.	28
Figura 12: CE com polaridade e EOF normais para ânions.	28
Figura 13: CE com EOF normal e polaridade invertida para ânions.....	29
Figura 14: CE com polaridade de EOF invertido.	30
Figura 15: Representação esquemática da injeção convencional.....	32
Figura 16: Representação esquemática da injeção pelo <i>outlet</i>	32
Figura 17: Representação esquemática da injeção múltipla no capilar.	33
Figura 18: Curva de mobilidade efetiva em função do pH para o I ⁻ , Cl ⁻ , TRIS e os aminoácidos presentes na estrutura dos LI objetos desse trabalho.	48
Figura 19: Representação esquemática da análise do I ⁻ sob EOF normal e polaridade invertida, usando injeção convencional.	50
Figura 20: Eletroferograma para uma solução 1 mmol L ⁻¹ de I ⁻ , utilizando a injeção convencional.....	51
Figura 21: Eletroferograma para a amostra de LI – 1A (A) e LI – 1A adicionado de 1 mmol L ⁻¹ de I ⁻ (B).	52
Figura 22: Eletroferogramas para as amostras de LI injetadas pelo modo convencional.	53

Figura 23: Representação esquemática da análise do I ⁻ sob EOF normal e polaridade invertida, usando injeção pelo <i>outlet</i>	54
Figura 24: Eletroferograma para uma solução 1 mmol L ⁻¹ de I ⁻ com injeção pelo <i>outlet</i> , lado mais próximo ao detector.	55
Figura 25: Eletroferogramas para as amostras de LI usando injeção pelo <i>outlet</i>	56
Figura 26: Eletroferogramas da injeção múltipla de I ⁻ 1,0 mmol L ⁻¹ variando o número de injeções consecutivas. (A) 2 injeções. (B) 3 injeções. (C) 4 injeções. (D) 5 injeções.	58
Figura 27: Eletroferogramas obtidos pela implementação do planejamento fatorial com 2 níveis e 3 fatores (2 ³).	61
Figura 28: Eletroferogramas obtidos na implementação do planejamento fatorial 3 ²	65
Figura 29: Eletroferogramas correspondentes ao teste de repetibilidade para os ensaios 6 e 9.	67
Figura 30: Eletroferograma para 1 mmol L ⁻¹ de I ⁻ pelo método de injeção múltipla usando as condições otimizadas no planejamento fatorial 3 ²	68
Figura 31: Eletroferogramas correspondentes ao método de injeção múltipla, obtidos para as amostras de LI sob as condições obtidas pelo planejamento fatorial 3 ²	69
Figura 32: Eletroferogramas de injeção múltipla obtidos para as amostras reais dos LI – 1C, 2A, 2B, 1A e 2B – sob as condições obtidas pelo planejamento fatorial 3 ²	70
Figura 33: Eletroferogramas de injeção múltipla obtidos para as amostras 1A e 2A sob as condições obtidas pelo planejamento fatorial 3 ²	71
Figura 34: Teste de seletividade para o método de injeção convencional, pelo <i>outlet</i> e múltipla.	78
Figura 35: Eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras de LI utilizando o método de injeção convencional.	80
Figura 36: Eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras de LI utilizando o método de injeção pelo <i>outlet</i>	81
Figura 37: Eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras de LI utilizando o método de injeção múltipla.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplo de programa de injeção múltipla.	34
Tabela 2: Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados.	39
Tabela 3: Testes realizados na análise de variância.	40
Tabela 4: Massa das amostras de LI recolhidas.	45
Tabela 5: Níveis utilizados para a implementação do planejamento fatorial 2^3	59
Tabela 6: Fatores e níveis utilizados para o planejamento 2^3 em duplicata.	60
Tabela 7: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 3^2	63
Tabela 8: Matriz de contraste e respostas para o planejamento fatorial 3^2	64
Tabela 9: Valores de RSD para o teste de repetibilidade para os ensaios 6 e 9.	67
Tabela 10: Valores de área usados para a implementação do modelo de regressão linear para os métodos otimizados para os 3 modos de injeção – convencional, <i>outlet</i> e múltipla.	73
Tabela 11: Resultados estatísticos para os modelos de previsão para os 3 métodos implementados – convencional, <i>outlet</i> e múltipla.	74
Tabela 12: Pressupostos avaliados para a análise de variância.	75
Tabela 13: Dados utilizados para a análise de variância.	75
Tabela 14: Validação para os três modos de injeção – convencional, <i>outlet</i> e múltipla.	77
Tabela 15: Resultados obtidos na quantificação de I^- pelos métodos otimizados – injeção convencional, pelo <i>outlet</i> e múltipla.	83
Tabela 16: Avaliação comparativa entre TAT e frequência analítica dos métodos otimizados.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA⁻ - aminoácidos

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BGE - *background electrolyte*

CE - eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*)

CRS - estatística de resolução cromatográfica (*chromatographic resolution statistic*)

CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio (*cetiltrimethylammoniumbromide*)

CZE - eletroforese capilar de zona (*capillary zone electrophoresis*)

EOF - fluxo eletrosmótico (*electroosmotic flow*)

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD - limite de detecção

LI - líquidos iônicos

LQ - limite de quantificação

MeOH - metanol

MEKC - Cromatografia Eletrocinética Micelar (*Micellar Electrokinetic Chromatography*)

MQ_{ep} - média quadrática devido ao erro puro

MQ_{faj} - soma quadrática devido à falta de ajuste

MQ_r - média quadrática dos resíduos

RSD - desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

SEIP - procedimento de injeção pelo lado mais curto ou próximo ao detector (*short-end injection procedure*)

SQ_{ep} - soma quadrática devido ao erro puro

SQ_{faj} - soma quadrática devido à falta de ajuste

SQ_r - soma quadrática dos resíduos

TAT - tempo total de análise (*total analysis time*)

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

UV - ultravioleta

Vis – visível

LISTA DE SÍMBOLOS

a - coeficiente angular

A_A - área do analito

A_{A+P} - área do analito adicionada mais padrão adicionado

A_P - área do padrão

b - coeficiente linear

C_a - concentração do analito

E - campo elétrico aplicado

F_{cal} - $F_{calculado}$

F_{tab} - $F_{tabelado}$

$H_{máx}$ - altura máxima do pico do analito

$H_{mín}$ - altura mínima do pico do analito

pK_a - constante de dissociação do soluto

q - carga do analito ionizado

r - coeficiente de correlação

R - recuperação

$R_{méd}$ - resolução média entre pares de solutos

R_{min} - resolução mínima aceitável

R_{ot} - resolução ideal ou desejada

$R_{i,i+1}$ - resolução entre pares de solutos adjacentes

$S_{ruído}$ - desvio padrão da linha base (ruído)

s - desvio padrão

t_n - tempo de migração do último soluto eluente

V - voltagem aplicada

x_m - média aritmética das medições

α_j - função de distribuição das espécies

ζ - potencial zeta

η - viscosidade

μ_{ef} - mobilidade efetiva

μ_j - mobilidade iônica de cada espécie

μ_{EP} - mobilidade eletroforética

μ_{OBS} - mobilidade eletroforética observada

μ_{EOF} - mobilidade eletrosmótica

v_{EP} - velocidade eletroforética

v_{EOF} - velocidade do fluxo eletrosmótico

v_{OBS} - velocidade eletroforética observada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. LÍQUIDOS IÔNICOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS	18
1.2. PREPARAÇÃO DOS LI DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS COM SAIS DE AMÔNIO QUATERNÁRIOS ORIGINADOS DO GLICEROL COMO CÁTIOS	20
1.3. IMPUREZAS	23
1.4. ELETROFORESE CAPILAR	25
1.4.1. Curva de mobilidade eletroforética efetiva	30
1.4.2. Deteção UV/Vis	30
1.4.3. Modos de injeção em CE	31
1.5. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	35
1.6. ESTATÍSTICA DE RESOLUÇÃO CROMATOGRÁFICA	36
1.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	37
1.7.1. Linearidade	37
1.7.2. Seletividade	40
1.7.3. Precisão	40
1.7.4. Limite de deteção	41
1.7.5. Limite de quantificação	41
1.7.6. Exatidão	42
2. OBJETIVOS	43
2.1. OBJETIVO GERAL	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. PARTE EXPERIMENTAL	44
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	44
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	44
3.3. DESCRIÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE LI	45
3.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA AS ANÁLISES	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. ESCOLHA DOS CONSTITUINTES DO ELETRÓLITO	47
4.2. INJEÇÃO CONVENCIONAL	50
4.3. INJEÇÃO PELO <i>OUTLET</i> (<i>SHORT-END INJECTION PROCEDURE - SEIP</i>)	53
4.4. INJEÇÃO MÚLTIPLA	57

4.5.	OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE I ⁻ POR CZE-UV	
	72	
4.7.	QUANTIFICAÇÃO DE I ⁻ NAS AMOSTRAS DE LI UTILIZANDO OS MÉTODOS DE INJEÇÃO CONVENCIONAL, <i>OUTLET</i> E MÚLTIPLA.....	79
4.8.	FREQUÊNCIA ANALÍTICA DOS MÉTODOS	84
5.	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

Líquidos iônicos (LI) são sais orgânicos constituídos, em geral, por um cátion orgânico e um ânion que pode ser orgânico ou inorgânico, com ponto de fusão abaixo de 100 °C. Muitas vezes, eles são líquidos à temperatura ambiente (25 °C) ou próximo dela (PEREIRA, 2013; SEDDON *et al.*, 2000).

Entre os cátions comumente encontrados em LI, estão os íons 1-alkil-3-metilimidazol, N-alkilpiridina, tetraalkilamônio, tetraalkilfosfônio e N-alkil-N-metil-pirrolizidínio. Já os ânions típicos de serem encontrados nos mesmos são o cloreto, brometo, tiocianato, acetato, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, triflato e bis(trifluorometilsulfonil)imida (HOOPERSTRAETE *et al.*, 2014).

Os LI têm como características a baixa pressão de vapor, excelente estabilidade térmica, condutividade elétrica, não inflamabilidade e alta polaridade (HOOPERSTRAETE *et al.*, 2014).

Entre as várias aplicações, encontram-se o uso como solventes em reações orgânicas e catálise (HOOPERSTRAETE *et al.*, 2014; PORTER *et al.*, 2014).

1.1. LÍQUIDOS IÔNICOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS

Entre os vários LI sendo sintetizados atualmente, encontram-se os que tem em sua composição cátions formados por sais de amônio quaternários derivados do glicerol e ânions, formados por aminoácidos (PEREIRA, 2013).

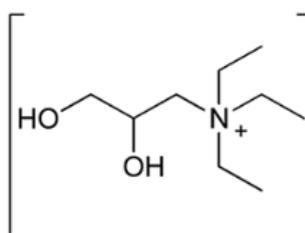
Para a preparação desses LI, o glicerol tem sido utilizado como material de partida para geração dos cátions, pois como ele é abundante no Brasil, há agregação de valor ao produto final (PEREIRA *et al.*, 2018).

Os aminoácidos contêm em sua estrutura grupo amino e grupo carboxílico, além de carbono quiral. Essas características associadas à sua biodegradabilidade, atividade biológica e baixo custo têm feito aumentar o interesse pela sua utilização na preparação de LI, gerando o que é denominado por LI derivados de aminoácidos (OHNO & FUKUMOTO, 2007; PEREIRA *et al.*, 2018).

Devido a presença de grupo amino e grupo carboxílico na estrutura dos aminoácidos, eles poderiam ser utilizados como ânions ou como cátions na formação do LI, por causa da possibilidade de haver protonação do grupo amino, gerando o cátion ou ionização do grupo ácido carboxílico gerando o ânion (OHNO & FUKUMOTO, 2007).

Dos LI nos quais os aminoácidos aparecem como ânions, encontram-se os que estão ligados a dois tipos de cátions diferentes, ambos correspondentes à sais de amônio quaternários derivados do glicerol. O primeiro cátion, aqui chamado cátion tipo 1, é o 3-(tri-etilamônio)propano-1,2-diol, que apresenta duas hidroxilas livres, uma primária e outra secundária, como mostrado na Figura 1 (PEREIRA, 2013).

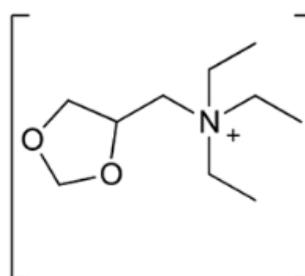
Figura 1: Estrutura do cátion 1 - 3-(tri-etilamônio)propano-1,2-diol.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

O segundo cátion, chamado cátion tipo 2, é o cátion N-((1,3-dioxolan-4-il)metil)-N,N,N-trietilamônio, em que as duas hidroxilas livres presentes no cátion tipo 1 estão protegidos na forma de cetal, como mostrado na Figura 2 (PEREIRA *et al.*, 2018).

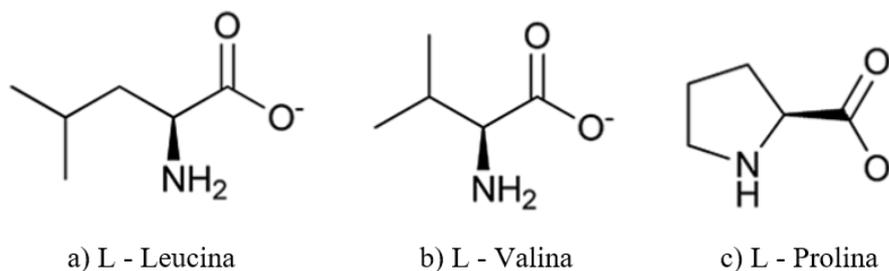
Figura 2: Estrutura do cátion tipo 2 - N-((1,3-dioxolan-4-il)metil)-N,N,N-trietilamônio.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

Entre os aminoácidos utilizados na preparação de LI, são encontrados os que estão mostrados na Figura 3. Sendo eles: L-leucina (Figura 3a), L-valina (Figura 3b), e L-prolina (Figura 3c) (PEREIRA, 2013; PEREIRA *et al.*, 2018).

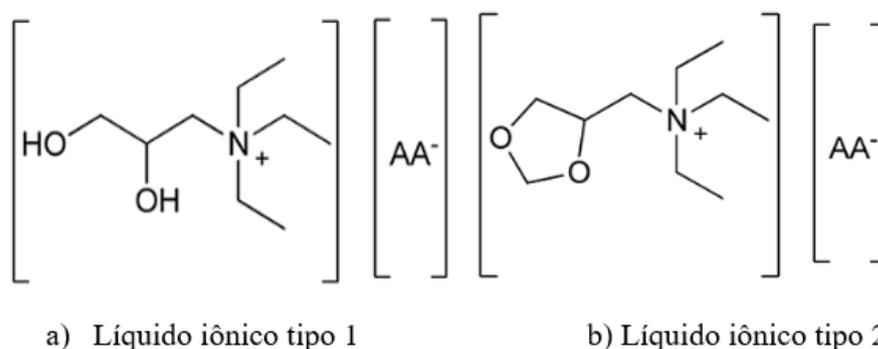
Figura 3: Estrutura dos aminoácidos.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

Dessa forma, o LI formado entre o cátion tipo 1 e um aminoácido, é denominado LI tipo 1. Enquanto o LI composto pelo cátion tipo 2 e um aminoácido, tem a denominação LI tipo 2. A estrutura geral dos dois tipos de LI é apresentada na Figura 4:

Figura 4: Estrutura geral dos líquidos iônicos derivados de aminoácidos contendo o cátion tipo 1 ou o cátion tipo 2.



[AA⁻] = Aminoácidos

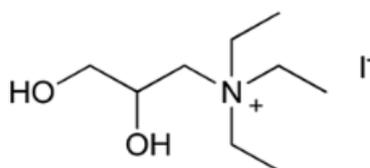
Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

1.2. PREPARAÇÃO DOS LI DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS COM SAIS DE AMÔNIO QUATERNÁRIOS ORIGINADOS DO GLICEROL COMO CÁTIOS

Os dois cátions usados na preparação desses LI derivados de aminoácidos são preparados a partir do sal de amônio quaternário 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto, originado do glicerol, mostrado na Figura 5, como substância intermediária, em elevado grau de pureza de modo a evitar a obtenção de produtos contaminados (PEREIRA, 2013).

É possível perceber analisando a Figura 5, que essa estrutura apresenta um íon iodeto como contra-íon (PEREIRA, 2013).

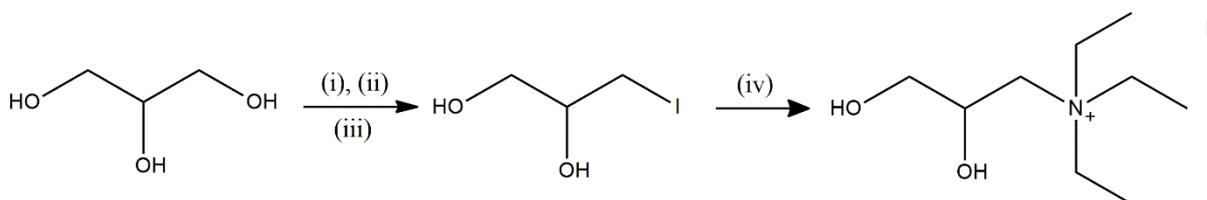
Figura 5: Estrutura do sal 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto usado na preparação dos LI de aminoácidos e sais de amônio quaternários.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

O sal 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto é obtido a partir do glicerol em quatro etapas, conforme mostra o esquema da Figura 6 (PEREIRA *et al.*, 2018).

Figura 6: Esquema de obtenção do sal 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol a partir do glicerol.

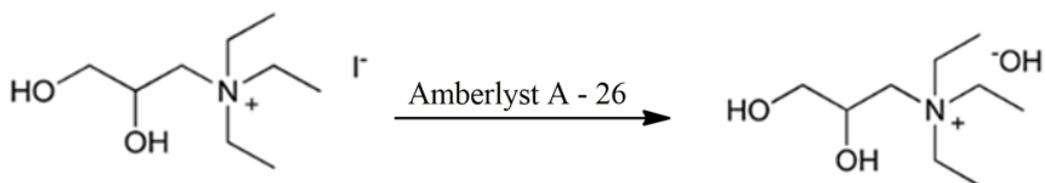


- (i) Acetona, ácido p-toluenosulfônico, éter de petróleo, Dean-Stark, 32 h, 60 °C;
 (ii) trifetilfosfina, I₂, imidazol, tolueno, 2 h, 90 °C; (iii) HCl 2 mol L⁻¹, acetona, 4 h, 50 °C; (iv) trietilamina, etanol, 16 h, 60 °C.

Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

Os LI do tipo 1 são preparados a partir da troca aniônica do íon iodeto no sal 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto pela hidroxila. Esse procedimento é realizado pela eluição do LI em coluna cromatográfica contendo a resina de troca aniônica Amberlyst A-26 íon hidróxido livre como fase estacionária e água deionizada como eluente, obtendo a estrutura mostrada na Figura 7 (PEREIRA, 2013).

Figura 7: Estrutura do sal intermediário 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto após troca aniônica do iodeto por hidroxila.

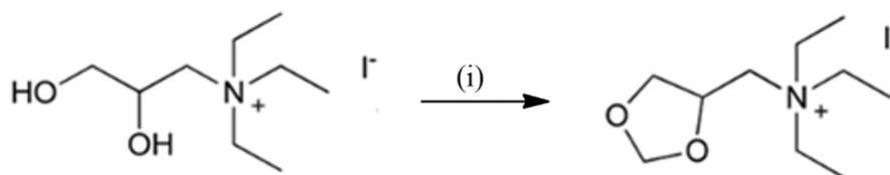


Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

Após a troca aniônica, os hidróxidos de sais de amônio quaternários são neutralizados utilizando os três aminoácidos mostrados na Figura 3, em excesso, separadamente (PEREIRA, 2013).

Já os LI do tipo 2, como apresentam as duas hidroxilas do LI tipo 1 protegidas na forma de cetel, necessitam de um método de preparo diferenciado. Dessa forma, de início há a proteção das hidroxilas da substância intermediária 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto na forma de cetel, tal como mostrado no esquema da Figura 8 (PEREIRA, 2013).

Figura 8: Esquema de proteção das hidroxilas do sal intermediário 3-(tri-etilamônio)propan-1,2-diol iodeto.

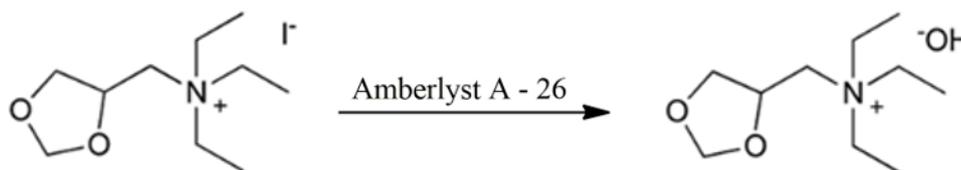


(i) Paraformaldeído (CH₂O), ácido p-toluenosulfônico, acetonitrila, 4 h, 90 °C.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2013.

Como esta apresenta o íon iodeto como contra-íon, é necessário haver a troca aniônica do íon iodeto, usando o mesmo procedimento discutido anteriormente, de acordo com a Figura 9 (PEREIRA, 2013).

Figura 9: Troca aniônica realizada para a preparação do LI tipo 2.



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2018.

Como o procedimento de preparo desses LI envolve a troca aniônica do íon iodeto por hidroxila, é possível que nesse procedimento não haja a troca total entre os íons, restando íons iodeto ao final do processo.

Assim, após a preparação dos dois tipos de LI mostrados anteriormente, é necessário averiguar se a troca aniônica foi efetiva, ou seja, se ainda há iodeto nos compostos formados. Caso esse íon esteja presente, ele é considerado impureza da síntese do LI (PEREIRA, 2013).

1.3. IMPUREZAS

Uma das limitações do trabalho com LI é a sua obtenção com alta e conhecida pureza, com as impurezas vindo, principalmente, da sua síntese (ANDANSON *et al.*, 2016).

As impurezas que mais se destacam em LI são a água e haletos. A importância dessas impurezas consiste na potencial alteração das propriedades físico-químicas como ponto de fusão, viscosidade, densidade, condutividade e estabilidade térmica.

O efeito dos haletos aos LI se estendem à reatividade de reações com catálise organometálica (HOOPERSTRAETE *et al.*, 2014).

Para determinar a ausência de haletos, como é o caso do íon iodeto em LI, e sua consequente pureza, é relatado na literatura o “teste do nitrato de prata (AgNO_3)” usando AgNO_3 a 1 %. Para isso, algumas gotas de AgNO_3 são adicionados a uma solução aquosa de líquido iônico (para LI hidrofílicos) ou a água de lavagem de um LI hidrofóbico. O cátion Ag^+ na presença de iodeto forma um precipitado amarelo formado por iodeto de prata (AgI), indicando assim a troca incompleta do íon iodeto pela hidroxila. Porém, na ausência do iodeto e alta concentração de hidroxila, há formação de um precipitado de hidróxido de prata (AgOH), que se desproporciona em óxido de prata II (AgO), que consiste em um precipitado preto, e prata elementar (Ag), indicando a ausência do íon iodeto, ou seja, indicando a troca efetiva deste pela hidroxila (HOOPERSTRAETE *et al.*, 2014; PEREIRA, 2013).

Esse método é aceito como prova da pureza do LI. Porém, este teste não consegue quantificar a concentração destas impurezas (PORTER *et al.*, 2014).

Uma forma de determinar haletos em LI de forma quantitativa é a titulação por Volhard. Seu princípio consiste na precipitação dos haletos, presentes em uma solução aquosa de LI, pela adição de excesso de AgNO_3 . O precipitado, então, é filtrado e o excesso de íons prata é titulado com solução de tiocianato (SCN^-) (STARK *et al.*, 2008).

Excesso de tiocianato forma um complexo vermelho-tijolo, formado por FeSCN^{2+} , com o indicador (Fe (III)) e o ponto final é determinado visualmente pela aparição permanente da coloração vermelha (STARK *et al.*, 2008).

Apesar desse método ser confiável, ele apresenta algumas desvantagens, como a grande quantidade de amostra usada (0,5 g) e a impossibilidade de sua regeneração. Assim, para uma realidade em que é obtido pouca quantidade de LI, seu uso se torna inviável (STARK *et al.*, 2008).

Hoogerstraete e colaboradores (2014) descrevem a técnica de fluorescência de reflexão total de raio-X para determinar impurezas halogênicas em líquidos iônicos formados pelo cátion 1-butil-3-metilimidazol e os ânions acetato, nitrato, trifluorometanossulfonato e bis(trifluorometilsulfonil(imida)). Esta técnica apresenta como vantagens, a simples preparação de amostra, o fato de a análise ser rápida e o pequeno gasto de amostra. Porém, ela tem como desvantagem o preparo da amostra envolver soluções padrão de metais, que são diluídas em ácido para não possibilitar a hidrólise deles. Assim, o ácido pode reagir com o haleto formando haleto de hidrogênio que são voláteis e podem evaporar na etapa de secagem da amostra, gerando resultados imprecisos (HOOPERSTRAETE *et al.*, 2014).

Berthier e colaboradores (2004) desenvolveram um método por eletroforese capilar, em que é determinado cloreto em LI formado pelo cátion 1-butil-3-metilimidazol e pelo ânion bis(trifluorometanossulfonil)amida. Neste, foi usado como eletrólito 24 mmol L^{-1} de amediol (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol) e 20 mmol L^{-1} de cromato (CrO_4^{2-}) em pH 8,4, capilar de sílica sem revestimento de 35 cm (26,5 cm até o detector) e 50 μm de diâmetro interno. A temperatura correspondeu a 35 °C e a voltagem aplicada de – 10 kV. A injeção ocorreu em duas etapas, injeção hidrodinâmica de água (50 mbar por 40 s) seguida pela injeção eletrocinética do LI (- 20 kV por 20 s). Essa metodologia proporcionou tempo de migração do cloreto menor do que 4 minutos. Esse método foi empregado, com alterações, para a determinação de brometo em LI de mesmo cátion, mas com o ânion hexafluorofosfato (BERTHIER *et al.*, 2004).

Como a performance do LI é altamente dependente da sua pureza, métodos que consigam quantificar essas impurezas, em baixas concentrações, se tornam necessários

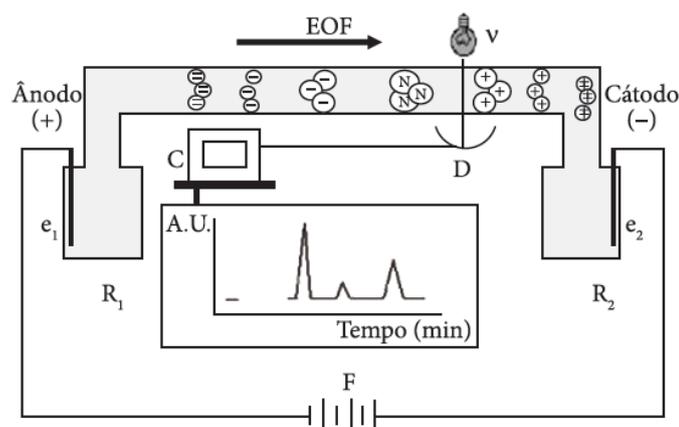
(GORDON *et al.*, 2008; HOOGERSTRAETE *et al.*, 2014; PORTER *et al.*, 2014). Sendo assim, a eletroforese capilar é uma alternativa para a quantificação de iodeto como impureza em líquidos iônicos.

1.4. ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) é uma técnica de separação analítica em meio líquido baseada na migração diferenciada de compostos neutros, espécies ionizáveis e íons solvatados mediante a aplicação de um campo elétrico à um tubo capilar contendo uma solução eletrolítica. Esta apresenta algumas vantagens em relação a outras técnicas, como pequeno volume de amostra utilizado, pouco ou nenhum solvente orgânico, curto tempo de análise e ausência de pré-tratamento das amostras antes da injeção (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Uma representação esquemática do equipamento de eletroforese capilar é demonstrada na Figura 10.

Figura 10: Representação esquemática do equipamento de CE.



Fonte: SPUDEIT *et al.*, 2012.

O instrumento consiste, basicamente, em um tubo capilar onde a separação ocorre, uma fonte de alta tensão (F, que opera com voltagens de até 30 kV), um par de eletrodos (e_1 e e_2) (geralmente, de platina), um detector (D), frascos reservatórios de amostra e eletrólito (R_1 e R_2) e um computador (C) para obtenção e tratamento de dados (BAKER, 1995; SPUDEIT *et al.*, 2012).

Entre os vários modos de eletroforese capilar disponíveis, um dos mais utilizados consiste na eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*),

também conhecida como eletroforese capilar em solução livre, porém este é o termo menos utilizado (BAKER, 1995; TAVARES, 1997).

Em CZE, o tubo capilar é preenchido com um eletrólito, geralmente de composição constante e características tamponantes. Ao ser aplicada uma tensão constante, os solutos migram através do capilar em zonas com velocidades constantes, mas distintas, o que gera a separação dos analitos em função das suas mobilidades eletroforéticas (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Os capilares mais comumente utilizados em CE são os de sílica fundida, os quais contêm grupos silanol (Si-OH). Ao se inserir o eletrólito neste capilar, esses grupos são ionizados a grupos silanoato (Si - O⁻) em pH em torno de três. Para melhorar essa ionização, passa-se uma solução básica como o hidróxido de sódio (NaOH) através do capilar, seguida pela passagem de eletrólito (BAKER, 1995).

Assim, a superfície carregada negativamente atrai cátions do eletrólito formando uma camada interna dos mesmos, que é denominada como camada fixa. Porém, ela não possui carga positiva suficiente para neutralizar as cargas negativas da superfície do capilar, então uma segunda camada de cátions, que é chamada de camada móvel, se forma nas proximidades da primeira, gerando a dupla camada difusa (BAKER, 1995).

Quando um campo elétrico é aplicado, os cátions da camada móvel são atraídos em direção ao catodo (polo negativo). Como esses cátions são solvatados, há o arraste do eletrólito com eles, causando o que se chama de fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electroosmotic flow*), cuja velocidade, denominada velocidade do EOF (v_{EOF}) é dada pela equação (1) (BAKER, 1995):

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta E}{4\pi\eta} \quad (1)$$

Em que ε é a constante dielétrica do tampão, ζ é o potencial zeta, E o campo elétrico aplicado (V/cm) e η corresponde a viscosidade do tampão. O potencial zeta (ζ) é determinado pela carga na superfície do capilar e é proporcional a espessura da dupla camada difusa (BAKER, 1995).

Os solutos carregados, sob a influência do campo elétrico, migrarão através do capilar com uma velocidade, característica e distinta para cada um, que é chamada de velocidade eletroforética (v_{EP}), dada pela equação (2), que é dependente da mobilidade eletroforética (μ_{EP}) e do campo elétrico aplicado (E) (BAKER, 1995).

$$v_{EP} = \mu_{EP} E \quad (2)$$

A mobilidade eletroforética (μ_{EP}) é a mobilidade característica que cada íon possui em solução e é dado pela equação (3) (BAKER, 1995):

$$\mu_{EF} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

Em que, q é a carga do analito ionizado, η é a viscosidade do eletrólito e r , o raio do soluto, que é assumido como radial. Dessa forma, tem-se que quanto maior a razão carga/raio ($\frac{q}{r}$) do íon, maior a mobilidade eletroforética dele para um dado campo elétrico e eletrólito usado, o que resulta em maior velocidade.

A mobilidade eletroforética (μ_{EP}) também pode ser expressa em função do campo elétrico, pela equação (4). Em que, v_{EP} é a velocidade eletroforética, E é o campo elétrico, definido como a razão entre a voltagem aplicada (V) e o comprimento do capilar (L) (BAKER, 1995).

$$\mu_{EP} = \frac{v_{EP}}{E} = \frac{v_{EP} L}{V} \quad (4)$$

A separação das espécies ocorre devido a diferença da velocidade eletroforética entre elas (BAKER, 1995; SPUDEIT *et al.*, 2012).

A velocidade do soluto é influenciada tanto pela mobilidade eletrosmótica quanto pela velocidade eletroforética, originando a velocidade eletroforética observada (v_{OBS}) dada pela equação (5) (BAKER, 1995).

$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (5)$$

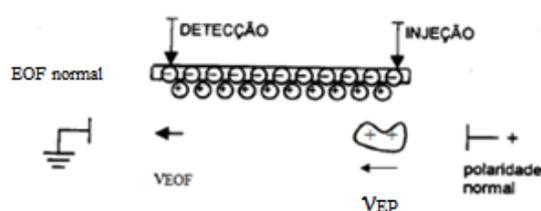
A mobilidade eletroforética observada (μ_{OBS}) também é influenciada pela mobilidade eletrosmótica (μ_{EOF}) e eletroforética pela equação (6) (BAKER, 1995):

$$\mu_{OBS} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad (6)$$

O equipamento de CE possibilita o uso de voltagem tanto positiva quanto negativa. Assim, o controle do EOF e da polaridade da fonte de alta tensão é importante para a análise de cátions e de ânions (TAVARES, 1997).

Na eletroforese capilar “normal”, a separação é conduzida sob EOF normal, ou seja, na qual o EOF está direcionado ao catodo (-). Se polaridade da fonte de alta tensão também é normal – positiva na extremidade em que é feita a introdução da amostra –, os cátions que são atraídos pelo polo negativo, assim como a sua mobilidade eletroforética, estarão na mesma direção do EOF (BAKER, 1995; COLOMBARA *et al.*, 1997; TAVARES, 1997), conforme a Figura 11.

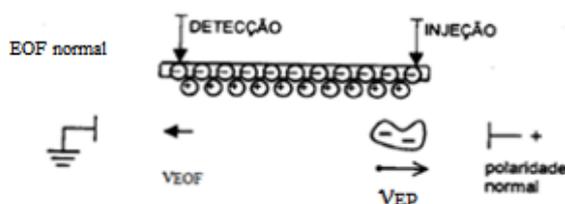
Figura 11: CE com polaridade e EOF normais para cátions.



Fonte: Adaptado de COLOMBARA *et al.*, 1997.

Na mesma condição, os ânions são atraídos pelo anodo (polo positivo). Dessa forma, a mobilidade eletroforética dos ânions se direciona ao mesmo, de modo que eles se movem na direção oposta ao EOF (BAKER, 1995; COLOMBARA *et al.*, 1997; TAVARES, 1997), conforme mostra a Figura 12. Assim, passam pelo detector os ânions maiores, que são mais lentos, por serem arrastados pelo EOF, já que possuem mobilidade menor do que este último. Se os ânions forem rápidos ou moderadamente lentos, eles deixam a coluna assim que o campo elétrico é aplicado e não atingem o detector (BAKER, 1995; COLOMBARA *et al.*, 1997; TAVARES, 1997).

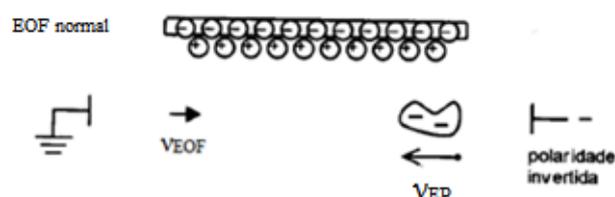
Figura 12: CE com polaridade e EOF normais para ânions.



Fonte: Adaptado de COLOMBARA *et al.*, 1997.

Dessa forma, para a análise de ânions rápidos, é interessante a inversão da polaridade da fonte de alta tensão. Assim, o detector fica posicionado do lado positivo (anodo), exercendo atração sobre os ânions, enquanto o EOF continua direcionado ao catodo (polo negativo), conforme a Figura 13. Os ânions continuam migrando na direção oposta ao EOF, porém como os ânions rápidos possuem mobilidade maior do que o EOF, apesar de migrarem em direção oposta a eles, conseguem ser detectados no detector. Entretanto, o fato de migrarem no fluxo contraeletrosmótico pode levar a análises com tempo mais elevado (BAKER, 1995; COLOMBARA *et al.*, 1997; TAVARES, 1997).

Figura 13: CE com EOF normal e polaridade invertida para ânions.

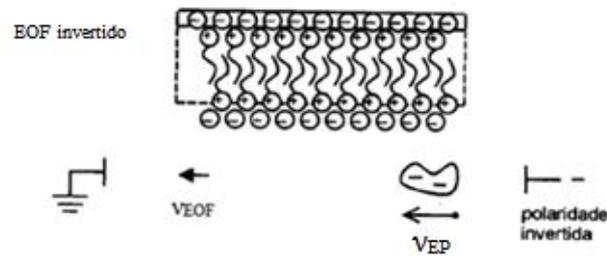


Fonte: Adaptado de COLOMBARA *et al.*, 1997.

Nas duas situações, solutos neutros migram na mesma velocidade do EOF, chegando ao detector junto com o mesmo, não sendo possível detectá-los usando CZE. Dessa forma, outros modos de CE devem ser utilizados de forma a detectá-los, como a Cromatografia Eletrocínética Micelar, do inglês *Micellar Electrokinetic Chromatography* (MEKC) (BAKER, 1995; SILVA *et al.*, 2007).

Uma outra possibilidade para a análise de ânions consiste na inversão do EOF, mantendo a polaridade invertida. Para essa inversão, é adicionado ao eletrólito um surfactante catiônico, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês *cetyltrimethylammoniumbromide*). Nesse, como demonstrado na Figura 14, a cauda hidrofílica da amina quaternária carregada positivamente, interage com os grupos silanoato ($\text{Si} - \text{O}^-$) da parede do capilar, enquanto a cauda hidrofóbica se associa entre si. Assim, a cauda hidrofílica também interage com os ânions do eletrólito, que são atraídos pelo polo positivo (anodo), invertendo assim o EOF sob a ação de um campo elétrico (BAKER, 1995; COLOMBARA *et al.*, 1997; TAVARES, 1997).

Figura 14: CE com polaridade de EOF invertido.



Fonte: Adaptado de COLOMBARA *et al.*, 1997.

1.4.1. Curva de mobilidade eletroforética efetiva

A mobilidade efetiva (μ_{ef}) de uma determinada espécie i , em solução, em equilíbrio com diferentes espécies j , pode ser calculada pela definição de Tiselius, que afirma que as espécies em equilíbrio irão migrar sob a influência de um campo elétrico com uma mobilidade efetiva, dada pela equação (7) (TAVARES, 1996):

$$(\mu_{ef})_i = \sum (\mu_j \alpha_j) \quad (7)$$

Em que, α_j representa a função de distribuição das espécies e μ_j a mobilidade iônica de cada espécie em equilíbrio (TAVARES, 1996).

A função de distribuição depende da magnitude da constante de dissociação do soluto (pK_a) e determina as espécies que predominam em um dado valor de pH. Dessa forma, possuindo os valores de pK_a é possível calcular a função de distribuição das espécies em equilíbrio, em um dado pH.

Construída essa função, e com o auxílio das mobilidades iônicas das espécies, determina-se os valores de mobilidade efetiva das espécies em um determinado pH. Com esses valores, é possível construir uma curva de mobilidade efetiva *versus* pH. Essa curva é um modo teórico útil para escolha do melhor pH para uma determinada separação ocorrer, além de auxiliar na escolha dos constituintes dos eletrólitos de corrida (TAVARES, 1996).

1.4.2. Detecção UV/Vis

Em CE, o modo de detecção mais utilizado é o baseado na absorbância da luz ultravioleta (UV) ou visível (Vis). Ele é usado quando as espécies de interesse apresentam

absorção na região do ultravioleta e/ou visível. Quando se incide luz sobre o capilar, a amostra absorve parte dessa luz e o que não é absorvido é detectada por um fotodetector, também chamado de fotodiodo (BAKER, 1995; SPUDEIT *et al.*, 2012).

O princípio da detecção por UV/Vis é baseada na lei de Lambert Beer, em que a absorbância (A) é dada pela equação (8) (BAKER, 1995; SATO, 2014):

$$A = \varepsilon b C \quad (8)$$

Em que “ ε ” é a absorvidade molar e “b”, o comprimento óptico. Para a CE, b será o próprio diâmetro interno do capilar. Já o símbolo “C” corresponde à concentração do soluto. A absorvidade molar depende das características do grupo cromóforo do soluto, do comprimento de onda incidente e da composição do eletrólito (BAKER, 1995; SATO, 2014).

Para compostos que apresentam baixa absorvidade molar no UV/Vis é possível usar a detecção indireta. Para isso, um cromóforo iônico é adicionado ao eletrólito. Durante a análise o comprimento de onda de absorção do sinal do cromóforo adicionado ao *background electrolyte* (BGE) é monitorado pelo sistema de detecção, de maneira que quando um soluto apresentando grupo cromóforo com baixa ou completa ausência de absorção molecular no comprimento de onda do cromóforo do BGE, desloca o íon cromóforo do mesmo proporcionando um decréscimo do sinal de absorbância, resultando em um pico negativo (BAKER, 1995; SATO, 2014).

1.4.3. Modos de injeção em CE

As amostras podem ser injetadas de duas formas, por injeção hidrodinâmica ou eletrocinética. Na injeção hidrodinâmica, é aplicada uma diferença de pressão que se estabelece entre o reservatório de amostra e o capilar. Essa forma de introdução de amostra permite que essa seja realizada de forma individual ou em sequência, denominadas como injeção simples e múltipla, respectivamente (SPUDEIT *et al.*, 2012).

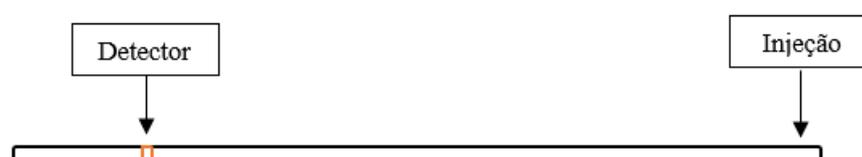
A segunda forma de injeção de amostra é a eletrocinética ou por eletromigração. Nesse tipo de introdução de amostra, ela é introduzida através da aplicação de voltagem (SPUDEIT *et al.*, 2012).

Nos equipamentos de CE, o detector está posicionado assimetricamente, de forma que há uma extremidade do capilar mais próxima ao detector e outra mais distante ao mesmo, havendo

possibilidade de realizar a injeção de amostras ou padrões em uma dessas extremidades (GLATZ, 2013).

A injeção convencional ocorre quando ela é realizada na extremidade do capilar mais distante ao detector (ALTRIA *et al.*, 1996), como mostra a representação esquemática mostrada na Figura 15.

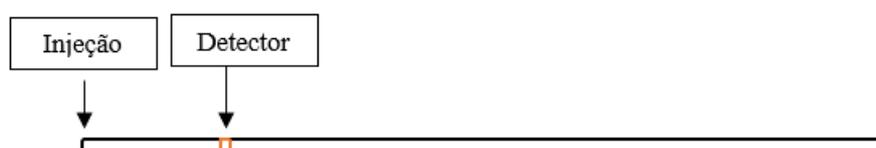
Figura 15: Representação esquemática da injeção convencional.



Fonte: Própria autora.

Quando a injeção de amostras ou padrões ocorre na extremidade mais próxima ao detector, o modo de injeção é conhecido em inglês como *short-end injection procedure* (SEIP), ou seja, procedimento de injeção pelo lado mais curto ou próximo ao detector, ou simplesmente, injeção pelo *outlet* (termo que foi utilizado nesse trabalho), como mostrado na Figura 16. Esse método de injeção minimiza a distância que o soluto deve percorrer antes da detecção, levando a diminuição do tempo de corrida (ALTRIA *et al.*, 1996; GLATZ, 2013).

Figura 16: Representação esquemática da injeção pelo *outlet*.



Fonte: Própria autora.

A menor distância entre o detector e a extremidade tem, em geral, entre 7 e 10 centímetros de comprimento. Para implementar o método de injeção pelo *outlet*, não é necessário fazer grandes modificações em relação à injeção convencional, com possibilidade de utilizar o mesmo capilar e demais condições, alterando apenas a polaridade e características da injeção. Para a injeção hidrodinâmica, a injeção é realizada colocando o frasco reservatório na posição do *outlet* (extremidade mais próxima ao detector), e aplicando pressão negativa no reservatório de entrada, o *inlet* (GLATZ, 2013). Além disso, é necessário considerar que esse modo de injeção demanda a

inversão da polaridade da voltagem aplicada durante a criação do método, em relação ao modo de injeção normalmente utilizado, para inverter a direção de migração dos analitos (ALTRIA *et al.*, 1996; GLATZ, 2013).

Todos os outros procedimentos relacionados à análise por CE, quando utilizada a injeção pelo *outlet*, são semelhantes aos utilizados com o modo de injeção convencional (GLATZ, 2013).

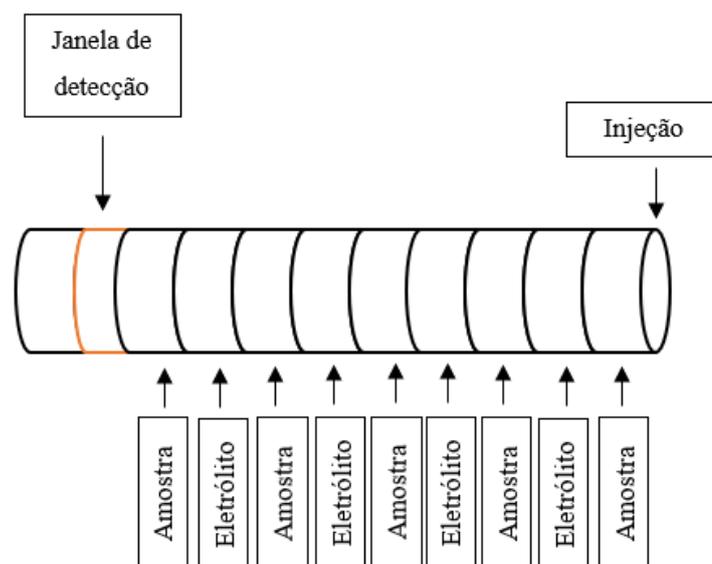
Um terceiro modo de realizar a injeção em CE, é denominada eletroforese capilar de injeção múltipla (MICZE), do inglês *multiple – injection CZE*. Este é um modo de CE que prevê a possibilidade de analisar duas ou mais amostras ou padrões dentro de uma única corrida, podendo ser usado tanto para a quantificação das amostras quanto para a construção de curvas analíticas (AMINI *et al.*, 2008; LÓDEN *et al.*, 2008; VITALI *et al.*, 2011).

Uma vantagem deste sobre o modo a injeção tradicional é a redução das variações no tempo de migração entre corridas e nas áreas dos picos, principalmente as causadas por pequenas alterações no EOF (AMINI *et al.*, 2008)

Esse método de análise aumenta a precisão de determinações, já que as amostras são analisadas sob as mesmas condições experimentais (LÓDEN *et al.*, 2008).

Nessa condição, as amostras são injetadas sequencialmente, sendo intercaladas pela injeção de eletrólito espaçador, que recebe essa denominação porque é injetado para garantir que as zonas de amostras não se misturem e que haja uma boa resolução entre os picos no eletroferograma obtido. A Figura 17 representa esquematicamente, a injeção múltipla.

Figura 17: Representação esquemática da injeção múltipla no capilar.



Fonte: Própria autora.

A implementação da metodologia por injeção múltipla demanda a elaboração de um método no equipamento de CE. Para isso, considerando o modelo Agilent 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) e o *software* (ChemStation A.06.01), é necessário seguir a sequência: *Method* → *New Method* → *Set up instrument method* → *CE* → *Injection*. Para realizar a injeção hidrodinâmica, em “*Function*”, selecionar “*Apply pressure*” e em “*Parameter*”, selecionar o valor da pressão aplicada e o tempo da mesma. Em seguida, para o “*inlet*”, selecionar o “*vial*” de injeção e para o “*outlet*”, selecionar “*Outlet home vial*”, isso quando se deseja fazer a injeção pelo lado mais distante ao detector.

O parâmetro “*inlet*” é o que define a injeção múltipla. Para isso, deve-se ter conhecimento dos *vials* que armazenam as amostras ou padrões e o eletrólito espaçador. Assim, seleciona-se “*append*” para programar o número de injeções desejado, considerando as injeções de amostras e eletrólito, com cada “*linha*” do programa de injeção correspondendo à uma introdução de amostra ou eletrólito espaçador. Posteriormente, seleciona-se o primeiro *vial* com amostra a ser injetado, em seguida seleciona-se o *vial* contendo o eletrólito espaçador, depois seleciona-se outro *vial* com amostra (que pode ser igual ao anterior ou não) com posterior escolha do *vial* com o eletrólito espaçador e assim sucessivamente. Esse procedimento deve ser realizado até definir o número de injeções consecutivas pretendido, conforme exemplifica o programa de injeção mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplo de programa de injeção múltipla.

<i>Function</i>	<i>Parameter</i>
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 5 s (<i>Inlet: 11 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 16 s (<i>Inlet: 48 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 5 s (<i>Inlet: 12 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 16 s (<i>Inlet: 48 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 5 s (<i>Inlet: 13 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 16 s (<i>Inlet: 48 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 5 s (<i>Inlet: 14 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 16 s (<i>Inlet: 48 Outlet: Outlet Home Vial</i>)
<i>Apply pressure</i>	25 mbar for 5 s (<i>Inlet: 15 Outlet: Outlet Home Vial</i>)

Vials de posição 11, 12, 13, 14 e 15 – Amostras.

Vial de posição 48 – Eletrólito.

Fonte: Própria autora.

Na Tabela 1, foi mostrada a injeção hidrodinâmica pelo lado mais distante ao detector de 5 amostras (25 mbar por 5 s), as quais estavam contidas nos *vials* de posições 11, 12, 13, 14 e 15, intercaladas por injeção de eletrólito espaçador (25 mbar por 16 s), contido no *vial* 48. De forma, que foram realizadas 9 injeções ao todo, entre introdução de amostra e eletrólito.

Todas as outras condições do método são definidas da mesma maneira que é realizada na injeção convencional.

Para encontrar a melhor separação entre os picos das amostras, o tempo de injeção de eletrólito deve ser investigado.

Porém, para a otimização do método usando injeção múltipla é necessário a análise da amostra usando a injeção convencional, de modo que as condições e parâmetros de separação sejam avaliadas, afim de identificar possíveis interferentes e se a injeção múltipla é de fato possível (VITALI *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o tempo total de análise (TAT), do inglês *total analysis time* de cada amostra consiste no tempo necessário para o procedimento de limpeza do capilar entre as corridas, tempo para injeção de amostra, separação e troca de reservatórios de amostra e eletrólito. Assim, a eliminação ou diminuição do tempo de uma dessas operações, tende a diminuir o TAT (VITALI *et al.*, 2011).

Dessa forma, algumas estratégias podem ser usadas para diminuir o TAT sem comprometer a eficiência de separação e a seletividade, como adição de um modificador do EOF ao eletrólito, diminuição do comprimento total ou efetivo do capilar, aumento da voltagem de separação ou o uso de diferentes modos de injeção como a injeção múltipla ou a injeção pelo *outlet*. O uso de uma dessas estratégias ou da combinação delas possibilita a diminuição do TAT e conseqüentemente o aumento da frequência analítica de um método, possibilitando um maior número de análises num dado intervalo de tempo (GLATZ, 2013; SPUDEIT *et al.*, 2012; VITALI *et al.*, 2011).

1.5. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento de experimentos tem sido utilizado, entre outros, para desenvolver métodos analíticos e melhorar a performance de análises.

O planejamento fatorial auxilia o planejamento de experimentos, fornecendo dados organizados que colabora com a interpretação e entendimento do sistema em estudo.

Para a execução de um planejamento fatorial, inicialmente é preciso definir os fatores ou variáveis de interesse, assim como as respostas. Ambos podem ser qualitativos ou quantitativos. Também é necessário identificar com clareza quais os objetivos que se pretende

alcançar, já que cada objetivo pretendido necessita de um determinado planejamento (NETO *et al.*, 2001).

Em seguida, identifica-se os níveis em que cada fator será avaliado. O planejamento fatorial completo executa experimentos em todas as combinações possíveis dos níveis, com cada combinação correspondendo a um ensaio experimental (NETO *et al.*, 2001).

Um planejamento com k fatores, variando em n níveis, contará com n^k ensaios. Se, por exemplo, um determinado estudo avaliará o efeito de 3 fatores sobre uma determinada resposta, variando em 2 níveis em cada um, o planejamento fatorial completo realizará 2^3 ensaios experimentais, ou seja, 8 experimentos ao todo. Esse valor corresponde a um número mínimo de experimentos a serem realizados. Em caso de interesse em estimar o erro experimental, são necessários a repetição de experimentos, o que demanda a realização de mais ensaios (NETO *et al.*, 2001).

Nesse tipo de experimento, o nível inferior é indicado pelo símbolo (-), o nível intermediário tem sua indicação dada pelo símbolo (0) e o nível superior é indicado pelo símbolo (+) (NETO *et al.*, 2001).

1.6. ESTATÍSTICA DE RESOLUÇÃO CROMATOGRÁFICA

A estatística de resolução cromatográfica, do inglês *chromatographic resolution statistic* (CRS), é uma função matemática mostrada na equação (9) (McGUFFIN *et al.*, 1997):

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(R_{i,i+1} - R_{ot})^2}{(R_{i,i+1} - R_{min})^2 R_{i,i+1}} \right] + \sum_{i=1}^{n+1} \frac{R_{i,i+1}^2}{(n-1)R_{méd}^2} \right\} \cdot \frac{t_n}{n} \quad (9)$$

Em que: $R_{i,i+1}$ corresponde a resolução entre pares de solutos adjacentes, $R_{méd}$ corresponde a resolução média entre pares de solutos, R_{ot} é a resolução ideal ou desejada fixada como 1,5, R_{min} é a resolução mínima aceitável, igual a 1, t_n é o tempo de migração do último soluto eluente e n é o número de solutos na amostra, igual a 5 (McGUFFIN *et al.*, 1997).

Essa expressão considera a resolução de todos os picos simultaneamente, sendo mais interessante do que avaliar a resolução pico a pico. A melhor resposta é definida como a que possui o menor valor de CRS (McGUFFIN *et al.*, 1997).

A CRS leva em consideração 3 elementos, que são: a resolução, a distribuição e tempo de separação. A resolução, indicada pelo primeiro termo da expressão, chamado de termo de resolução, avalia a resolução entre todos os pares de solutos adjacentes em comparação com os

distribuição, considera o espaçamento relativo entre as zonas de solutos. Já o tempo de separação, último termo da equação (9) e chamada de termo multiplicador, leva em consideração o tempo de análise e o número de picos de analitos a ser separados, simultaneamente (McGUFFIN *et al.*, 1997).

1.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

“Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação” (RIBANI *et al.*, 2004).

Encontram-se na literatura várias definições para validação. De acordo com a ANVISA, a “validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos” (BRASIL, 2017).

Já para a IUPAC, “validação de método faz uso de um conjunto de testes quem examinam as suposições nas quais o método se baseia e estabelece e documenta as características de desempenho de um método, de forma a demonstrar se ele é adequado para uma finalidade analítica específica” (THOMPSON *et al.*, 2002).

Os parâmetros de desempenho analítico ou figuras analíticas de mérito considerados para a validação de um método incluem, quando aplicável: “seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez” (INMETRO, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

Nesse trabalho, apenas algumas destas características de desempenho foram avaliadas. Estas correspondem a: linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e seletividade.

1.7.1. Linearidade

A linearidade é a habilidade que um método apresenta para fornecer resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

“A concentração de uma amostra não é uma grandeza física observável” (PIMENTEL & NETO, 1996), dessa forma, ela é encontrada de forma indireta. Para isso, é necessário encontrar uma função que relacione as medidas realizadas com a concentração desejada. Esse processo é denominado como calibração (PIMENTEL & NETO, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

Dessa forma, são realizadas medidas em um conjunto de padrões de concentração conhecida, para que se construa um modelo que relacione a grandeza medida para esses padrões com a concentração desejada. O modelo construído representa uma relação linear como mostra a equação (10), abaixo (PIMENTEL & NETO, 1996; RIBANI *et al.*, 2004):

$$y = ax + b \quad (10)$$

Em que, “a” é o coeficiente angular e “b” o coeficiente linear. Enquanto “y” é a variável dependente e representa o sinal medido e “x”, a variável independente, que representa a concentração da espécie de interesse (PIMENTEL & NETO, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

Recomenda-se que essa curva analítica seja construída a partir de pelo menos cinco níveis de concentração. Na construção da curva analítica, supõe-se que o modelo da curva de calibração se ajuste aos pontos experimentais. O método mais empregado para obter a máxima proximidade simultânea entre todos os pontos e a curva do modelo ajustada é o método dos mínimos quadrados ordinários (PIMENTEL & NETO, 1996).

O tratamento estatístico associado a esse método deve satisfazer a alguns pressupostos. O primeiro é de que “os únicos erros nas medidas são devidos a flutuações na variável dependente y (o sinal analítico)” (PIMENTEL & NETO, 1996), se houver erros na variável independente x (concentração), esses devem ser desprezíveis em relação à y. Ou seja, os padrões para o processo de calibração devem ser preparados com muito rigor de forma a minimizar e evitar erros adicionais. O segundo é a homocedasticidade, ou seja, que os erros tenham variância constante, o que pode ser avaliado através do teste F. Assim, realiza-se repetidas determinações, autênticas – um mesmo padrão não é reintroduzido no aparelho para leitura do sinal analítico, cada leitura é resultado de um padrão preparado independentemente (PIMENTEL & NETO, 1996). O terceiro é a independência, ou seja, que os erros não sejam correlacionados. Ou seja, o preparo de padrões ocorra de forma independente e semelhante, autêntica e a leitura seja realizada de forma aleatória, de forma a evitar a associação de desvios sistemáticos a determinados níveis (PIMENTEL & NETO, 1996). O quarto pressuposto é a que os erros sigam uma distribuição normal (PIMENTEL & NETO, 1996). O teste de normalidade pode ser realizado pelo teste de Shapiro-Wilk.

Em seguida, esse modelo é utilizado para prever a concentração das espécies de interesse a partir dos sinais analíticos medidos, procedimento denominado como regressão inversa. É importante ressaltar que a partir da etapa descritiva é possível calcular os coeficientes ou estimadores, a saber o coeficiente angular “a”, o coeficiente linear “b” e o coeficiente de correlação “r”. Este último, por sua vez, auxilia na obtenção de informações sobre a qualidade da curva obtida,

de forma que quanto mais próximo de 1,0, maior a adequação da curva aos pontos experimentais (RIBANI *et al.*, 2004).

Para verificar a validade do modelo implementado e sua significância estatística, a avaliação do coeficiente de correlação não é suficiente, sendo necessário fazer testes como a falta de ajuste e significância da regressão. Estes podem ser testados por meio da análise de variância, conforme os elementos mostrados na Tabela 2, a seguir (PIMENTEL & NETO, 1996):

Tabela 2: Tabela de análise de variância para o ajuste do modelo pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte	Soma quadrática	G. L.	Média quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{(p - 1)}$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{(n - p)}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{(m - p)}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{(n - m)}$
Total	$SQ_t = \sum \sum (y_{ij} - y_m)^2$	$n - 1$	

n_i = número de repetições no nível i , m = número de níveis distintos da variável x , $n = \sum n_i$ = número total de medidas, p = número de parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x . O segundo somatório das expressões para SQ_r , SQ_{ep} e SQ_t vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. y_m é a média de todos os valores de y ; y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i . O termo SQ significa soma quadrática e MQ significa média quadrática.

Fonte: PIMENTEL & NETO, 1996.

Os testes da falta de ajuste e de significância da regressão tem suas equações mostradas nas equações presentes na Tabela 3.

Tabela 3: Testes realizados na análise de variância.

Falta de ajuste	Significância da regressão
$F_{cal} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$	$F_{cal} = \frac{MQ_{reg}}{MQ_r}$
$F_{tab} = F_{\theta_{faj}, \theta_{ep}}$	$F_{tab} = F_{\theta_{reg}, \theta_r}$

Fonte: PIMENTEL & NETO, 1996.

Na verificação da falta de ajuste, se o valor de $F_{calculado}$ (F_{cal}) for menor que o valor de $F_{tabelado}$ (F_{tab}), dentro do intervalo de confiança estimado, há indício da falta de ajuste do modelo. Já no teste da significância da regressão, se o $F_{calculado}$ (F_{cal}) for maior do que o $F_{tabelado}$ (F_{tab}), há indicação da existência de uma relação linear entre as duas variáveis. Há uma recomendação, de que o F_{cal} seja pelo menos, cinco vezes maior do que F_{tab} para que o modelo tenha utilidade prática. Assim, a equação obtida pode ser usada para a quantificação das amostras em questão (PIMENTEL & NETO, 1996).

1.7.2. Seletividade

“A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa” (RIBANI *et al.*, 2004), de forma que se garanta que a resposta se deve ao analito e não a fatores como o diluente (BRASIL, 2017).

Para métodos cromatográficos, a pureza cromatográfica do sinal analítico deve ser comprovada, de forma que se garanta que o pico de resposta seja exclusivo do analito de interesse (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004).

1.7.3. Precisão

A precisão “representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas” (RIBANI *et al.*, 2004).

Uma forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*), expressa pela relação mostrada pela equação (11), em que s corresponde ao desvio padrão e x_m é a média aritmética das medições.

$$\text{RSD} = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (11)$$

1.7.4. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é “a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada utilizando um determinado procedimento experimental” (RIBANI *et al.*, 2004).

O LD pode ser calculado de três maneiras: de forma visual, relação sinal – ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica.

Nesse trabalho, o LD foi determinado a partir da relação sinal – ruído. Dessa forma, o mesmo foi avaliado através do cálculo do desvio padrão da linha base (ruído) do sinal, e a altura do pico do analito (FARIA *et al.*, 2008). A estimativa do LD pode ser calculada através da equação (12), em que $S_{\text{ruído}}$ corresponde ao desvio padrão da linha base (ruído), C_a é a concentração do analito, $H_{\text{máx}}$ é a altura máxima do pico do analito e $H_{\text{mín}}$ é a altura mínima do pico do analito (FARIA *et al.*, 2008; RIBANI *et al.*, 2004).

$$\text{LD} = \frac{3 \times S_{\text{ruído}} \times C_a}{H_{\text{máx}} - H_{\text{mín}}} \quad (12)$$

1.7.5. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) “representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental” (RIBANI *et al.*, 2004).

O LQ pode ser determinada pelos mesmos métodos que o LD. Nesse trabalho, o LQ foi determinado pelo método da relação sinal – ruído, assim como o LD. Podendo ser calculado pela equação (13), em que $S_{\text{ruído}}$ corresponde ao desvio padrão da linha base (ruído), C_a é a concentração do analito, $H_{\text{máx}}$ é a altura máxima do pico do analito e $H_{\text{mín}}$ é a altura mínima do pico do analito (FARIA *et al.*, 2008; RIBANI *et al.*, 2004).

$$\text{LQ} = \frac{10 \times S_{\text{ruído}} \times C_a}{H_{\text{máx}} - H_{\text{mín}}} \quad (13)$$

Uma observação importante é de que o primeiro nível da curva analítica deve conter a concentração do LQ (RIBANI *et al.*, 2004).

1.7.6. Exatidão

A exatidão “representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro” (RIBANI *et al.*, 2004).

Entre os métodos utilizados para a avaliação da exatidão, encontram-se o uso de materiais de referência e ensaios de recuperação (RIBANI *et al.*, 2004). Este último foi utilizado no presente trabalho.

A recuperação (R) foi determinada pela fortificação das amostras de padrão em três níveis de concentração: baixo (correspondente ao primeiro nível da curva analítica), intermediário (correspondente ao nível médio da curva) e alto (referente ao último nível da curva analítica) a partir da equação (14), em que A_{A+P} corresponde à área do analito adicionada do padrão utilizado, A_A é a área do analito e A_P é a área do padrão (FARIA *et al.*, 2008).

$$R (\%) = \frac{A_{A+P} - A_A}{A_P} \times 100 \quad (14)$$

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar um método por eletroforese capilar de zona com detecção direta no UV para determinação de iodeto como impureza da síntese de líquidos iônicos formados por sais de amônio quaternários e aminoácidos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e otimizar métodos por CZE-UV para a determinação de iodeto em processo de síntese de líquido iônico.
- Usar diferentes modos de injeção de amostra, injeção convencional, pelo *outlet* e múltipla, para diminuir o tempo total de análise e obter análises rápidas.
- Utilizar a Quimiometria através da aplicação de métodos de planejamentos de experimentos para a otimização do modo de injeção múltipla.
- Avaliação de alguns parâmetros de mérito de validação do método otimizado por injeção pelo *outlet* e injeção múltipla.
- Quantificação do iodeto nas amostras de líquido iônico.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

A água utilizada foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, MA, USA).

Iodeto de potássio (KI) foi adquirido da QUEMIS (São Paulo, Brasil), Tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) P. A. e ácido clorídrico (HCl) P. A. foram adquiridos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). Hidróxido de sódio (NaOH) micropérola PA foi adquirido da Synth (Diadema, SP) e metanol (MeOH) UV/HPLC foi obtido da Dinâmica (Diadema, SP). Isopropanol P.A. foi adquirido da Cinética Reagentes e Soluções (Jandira, SP). O detergente Extran[®] MA 02 neutro foi adquirido da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ).

A solução de NaOH na concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado para condicionamento inicial do capilar e limpeza entre as corridas.

A solução estoque do eletrólito composto por TRIS e HCl foi preparada na concentração de $200 \text{ mmol L}^{-1}/100 \text{ mmol L}^{-1}$ e estocada na geladeira. No dia em que as análises eram realizadas, a solução estoque era diluída em água para a concentração de $40 \text{ mmol L}^{-1}/20 \text{ mmol L}^{-1}$.

A solução estoque de KI na concentração de 100 mmol L^{-1} foi preparada e estocada em frasco adequado e diluída em água para a concentração de interesse no dia de injeção.

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar modelo Agilent 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e controle, aquisição e tratamento dos dados em *software* (ChemStation A.06.01), disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os capilares utilizados foram de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (8,5 ou 26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo (Polymicro Technologies, Phoenix, USA).

Para as análises, foi utilizado comprimento de onda de 230 nm e temperatura controlada do cartucho de 25 °C.

3.3. DESCRIÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE LI

As amostras de LI foram sintetizadas pelo Grupo de Estudos em Síntese Orgânica e Catálise do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e compreendem óleos viscosos, de coloração incolor ou amarelo-pálido (PEREIRA *et. al.*, 2018), solúveis em água. Elas foram cedidas para as análises através do recolhimento dos LI individualmente em microtubos tipo *ependorf* de 2 mL, seguindo as massas mostradas na Tabela 4. Em seguida, elas foram solubilizadas com água deionizada no próprio recipiente. Posteriormente, houve a transferência para um balão volumétrico de 10 mL com seu volume completado com água deionizada e estocadas em frasco âmbar em geladeira.

Tabela 4: Massa das amostras de LI recolhidas.

Amostra	Massa LI (g)
1A	0,4447
1C	0,3179
2A	0,5501
2B	0,2793

Fonte: Própria autora.

Os LI objetos do presente trabalho são divididos em duas séries com diferentes propriedades químicas: os LI tipo 1, os quais apresentam o cátion tipo 1 e o LI tipo 2, que apresentam o cátion tipo 2 (PEREIRA, 2013). Foram analisadas 4 amostras de LI, 2 amostras do tipo 1 e 2 amostras do tipo 2.

Nesse trabalho, o aminoácido L-leucina é indicado pelo código “A”, L-valina pelo código “B” e L-prolina com o código “C”. Assim, os LI foram denominados como 1A e 1C para os LI do tipo 1 e 2A e 2B para os LI do tipo 2.

Portanto, o LI 1A apresenta o cátion tipo 1 e o aminoácido L-leucina, o LI 1C apresenta o cátion tipo 1 e o aminoácido L-prolina, o LI 2A apresenta o cátion tipo 2 e o aminoácido L-leucina e o LI 2B apresenta o cátion tipo 2 e o aminoácido L-valina.

É importante destacar que os cátions, tipo 1 e tipo 2, passaram pelo teste qualitativo com AgNO₃, gerando um resultado negativo, ou seja, indicando que não havia iodeto residual presentes nesses LI.

Para injeção no equipamento de CE, as amostras de LI foram diluídas em água, usando um fator de diluição correspondente a 20.

3.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA AS ANÁLISES

Para a primeira utilização do capilar, houve o condicionamento com solução aquosa de NaOH a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ durante 30 minutos, água deionizada por 15 minutos e solução do eletrólito por 15 minutos. Para as utilizações posteriores, os tempos de condicionamento foram diminuídos para 5 minutos, 5 minutos e 15 minutos, respectivamente.

A limpeza do capilar entre as corridas seguiu a seguinte sequência: NaOH 1 mol L^{-1} por 1 minuto, água deionizada por 1 minuto, MeOH por 1 minuto, água por 1 minuto e eletrólito por 1 minuto.

Ao final da sequência de análises do dia, o capilar passou pelo processo de condicionamento final, utilizando NaOH 1 mol L^{-1} por 5 minutos e água também por 5 minutos. Após esse processo, ele era guardado para posterior utilização. Os eletrodos de platina utilizados foram lavados em lavadora ultrassônica utilizando isopropanol por 15 minutos, secando na sequência.

Todas as micropipetas foram recalibradas frequentemente para evitar erros adicionais na liberação de solução, de forma a não prejudicar a precisão e exatidão.

A cela de detecção foi lavada com álcool isopropílico sob banho ultrassônico por 15 minutos, frequentemente.

Todas as vidrarias utilizadas também foram lavadas em lavadora ultrassônica seguindo a seguinte sequência: 15 minutos em detergente Extran[®] MA 02 na proporção de 10 mL do mesmo para 2 L de água, 15 minutos com água e álcool comercial na proporção de 10 mL para 2 L de água, terminando o processo pelo enxágue por 3 vezes com água deionizada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

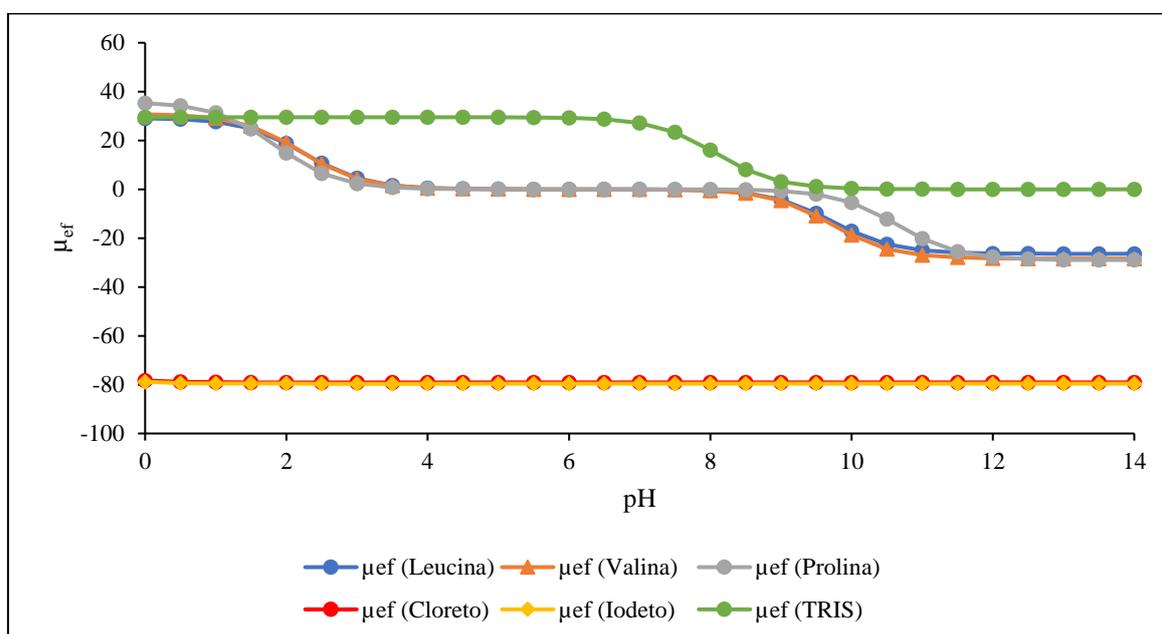
4.1. ESCOLHA DOS CONSTITUINTES DO ELETRÓLITO

Para o desenvolvimento e otimização de um método para a determinação de ânions por CE, é importante a seleção de um ânion do BGE contendo mobilidade próxima ao analito de interesse. Essa prática evita o fenômeno de eletrodispersão, que é “causada pelas diferenças de condutividade entre as zonas do eletrólito e da amostra” (SILVA *et al.*, 2007) e causa dispersão da zona durante a separação, evitando também a assimetria de picos. Além disso, para a determinação direta no UV, o ânion do BGE deve apresentar baixa absortividade molar próximo ao comprimento de onda do analito a ser determinado (BAKER, 1995; SILVA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A escolha do eletrólito foi baseada no trabalho desenvolvido por Manoel (2011) no qual o objetivo consistiu em desenvolver e otimizar um método por eletroforese capilar de zona para determinação de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) em matriz alimentícia. Manoel (2011) utilizou como constituintes do eletrólito de corrida o Tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) e o ácido clorídrico (HCl) nas concentrações de 40 e 10 mmol L⁻¹, respectivamente. Como o ânion iodeto (I^-) apresenta mobilidade próxima ao NO_3^- e NO_2^- , correspondendo aos valores de $-79,6 \times 10^5$ (cm² V⁻¹ s⁻¹), $-74,1 \times 10^5$ (cm² V⁻¹ s⁻¹) e $-74,6 \times 10^5$ (cm² V⁻¹ s⁻¹), respectivamente, pensou-se em utilizar o mesmo eletrólito para o presente trabalho (HIROKAWA *et al.*, 1983).

Para verificar se esse sistema eletrolítico poderia ser utilizado para a determinação de I^- , foi proposta a implementação de uma curva de mobilidade efetiva (μ_{ef}) versus pH, já que essa se apresenta como um método teórico eficiente para a escolha do pH de eletrólitos (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Assim, foi construída a curva de mobilidade efetiva versus pH para o I^- , cloreto (Cl^-), TRIS e os três aminoácidos presentes na estrutura dos LI, mostrada na Figura 18.

Figura 18: Curva de mobilidade efetiva em função do pH para o I^- , Cl^- , TRIS e os aminoácidos presentes na estrutura dos LI objetos desse trabalho.



Fonte: Própria autora.

O HCl e o ácido iodídrico (HI) são eletrólitos fortes em solução, ou seja, tem ionização completa, dessa forma, eles não sofrem variação de mobilidade efetiva com a variação do pH, como pode ser observado pela Figura 18, em que o I^- apresenta mobilidade constante em toda faixa de pH, assim como o Cl^- . No caso do TRIS, esse comportamento não é observado, sua mobilidade varia com o pH. Até pH um pouco superior a 6,0, a espécie predominante é a protonada, ou seja, $TRISH^+$. No intervalo de pH 6,0 – 9,0 há um equilíbrio entre essa espécie e TRIS (neutra, com mobilidade zero), sendo esta última predominante em pH maior do que 9,5.

Pela Figura 18 foi possível observar, ainda, que os três aminoácidos até pH em torno de 3,0 estão protonados. Em pH entre 3,0 e 8,5 a leucina e a valina estão neutras, enquanto a prolina permanece neutra até pH em torno de 9,0. A partir de pH 8,5 para a leucina e a valina, e pH 9 para a prolina, os três aminoácidos estão na forma aniônica. Nessa figura, observou-se que o Cl^- apresenta mobilidade muito próxima ao I^- , com seus valores correspondentes a $-79,1$ e $-79,6$ ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$), respectivamente, o que contribui para evitar a eletrodispersão e a assimetria de picos, como citado anteriormente. Além disso, o Cl^- apresenta baixa absorvibilidade molar no comprimento de onda de interesse. Para esse trabalho, isso foi importante porque a ideia inicial era otimizar um método sob detecção direta no UV, dessa forma, o ânion do BGE não deveria apresentar absorvibilidade no comprimento de onda de trabalho. Assim, o Cl^- apresentou as características necessárias para ser utilizado como ânion do eletrólito. Porém, o Cl^- não

apresenta capacidade tamponante, o que tornou necessária a escolha de um contra-íon que a possuía. Assim, o TRIS foi utilizado como contra-íon por conceder a capacidade tamponante necessária ao eletrólito (OLIVEIRA *et al.*, 2012; MANOEL, 2011). Como o pK_a do TRIS é 8,2, o pH de separação é próximo de 8,0, a sua utilização apresenta como vantagens, ser um padrão primário e possuir absorvibilidade molar compatível (transparente) na faixa de trabalho do UV (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A análise de ânions por eletroforese capilar em pH próximo de 8,0 ocorre no sentido contrário à um EOF com alta mobilidade, ou seja, no modo contra eletrosmótico. O I^- é atraído pelo polo positivo (anodo), ou seja, o ânion com alta mobilidade migra no sentido contrário ao EOF. Como a mobilidade do ânion de interesse é alta, foi necessário fazer a inversão da polaridade da fonte de alta tensão, de forma que ele pudesse migrar em direção ao detector. Por esse motivo foi usada voltagem negativa no lado da injeção.

A sua alta mobilidade nos levou a esperar que a sua mobilidade observada fosse maior, gerando análises rápidas, mesmo ocorrendo contra um fluxo eletrosmótico de alta mobilidade em pH próximo de 8,0. A análise no sentido contrário à um fluxo de alta mobilidade permite a redução de possíveis interferências, se mostrando como uma vantagem específica desse modo (MANOEL, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A análise da Figura 18 mostrou ainda que se houvesse interesse em determinar os aminoácidos, esse eletrólito não seria a melhor escolha, pela diferença de mobilidade entre eles e o ânion Cl^- do eletrólito ser alta. Além disso, como a mobilidade deles é bem inferior em relação ao I^- , esperava-se que o tempo de migração dos aminoácidos fosse mais elevado, não causando efeitos como a coluição.

Inicialmente, pretendeu-se também, não utilizar um inversor de EOF como o CTAB, de forma que o I^- migrasse no mesmo sentido do EOF, ou seja, no modo coeletrosmótico de migração dos analitos, já que se acreditava que podia-se obter uma análise rápida mesmo sem a inversão do EOF.

Dessa forma, para a análise do I^- foram utilizados EOF normal – parâmetro avaliado na sequência – e polaridade invertida.

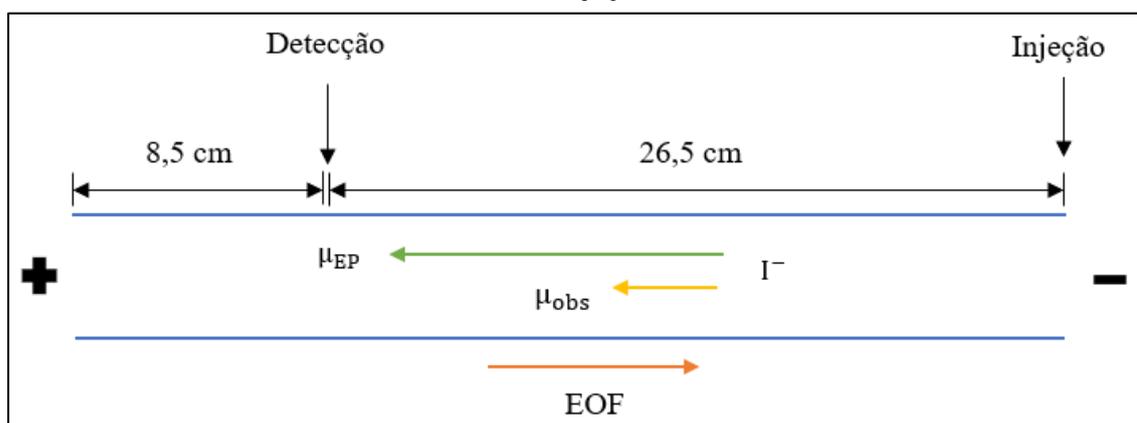
A concentração inicial do eletrólito utilizada nesse trabalho foi um pouco diferente da usada por Manoel (2011), correspondendo a 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl, pois Manoel (2011) o preparava a partir de soluções estoque dos constituintes do eletrólito, em separado. Já nesse trabalho, pretendia-se utilizar uma solução estoque conjunta dos dois. Portanto, a concentração de HCl de 10 mmol L⁻¹ não seria possível de ser alcançada, então utilizou-se a concentração de 20 mmol L⁻¹ (MANOEL, 2011).

Dessa forma, o eletrólito consistiu de 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl em pH 8,20.

4.2. INJEÇÃO CONVENCIONAL

A Figura 19, representa esquematicamente a análise do I⁻ sob EOF normal e polaridade invertida para a injeção convencional. Assim, vê-se que a polaridade no lado de injeção é negativa. Dessa forma, a mobilidade eletroforética do I⁻ se direciona ao anodo (+), ou seja, em sentido oposto ao EOF.

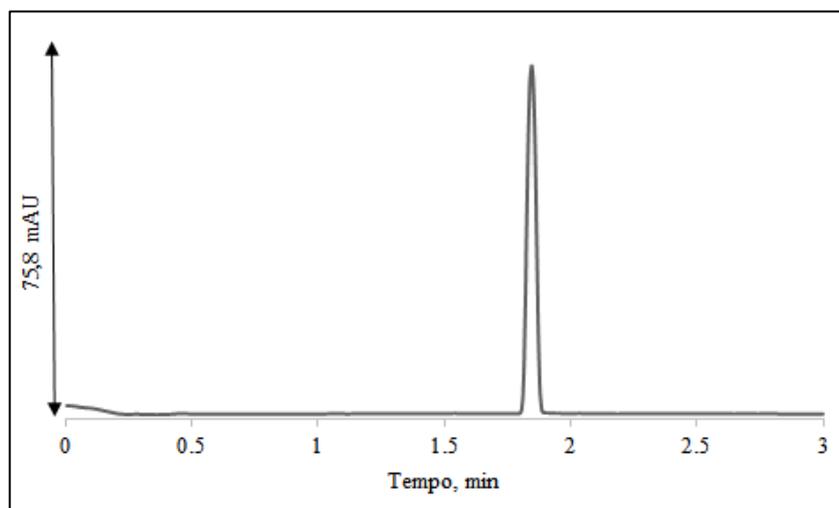
Figura 19: Representação esquemática da análise do I⁻ sob EOF normal e polaridade invertida, usando injeção convencional.



Fonte: Própria autora.

Assim, após a definição dos constituintes do eletrólito, que era composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), esse foi testado a partir da injeção de uma solução 1 mmol L⁻¹ de I⁻ no equipamento de CE fazendo-se a injeção pelo lado mais distante ao detector, sob as seguintes condições: cartucho contendo o capilar mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de - 25 kV. O capilar utilizado foi de sílica fundida revestidos com poliimida com 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo. O resultado é mostrado na Figura 20.

Figura 20: Eletroferograma para uma solução 1 mmol L⁻¹ de I⁻, utilizando a injeção convencional.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de - 25 kV. Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo.

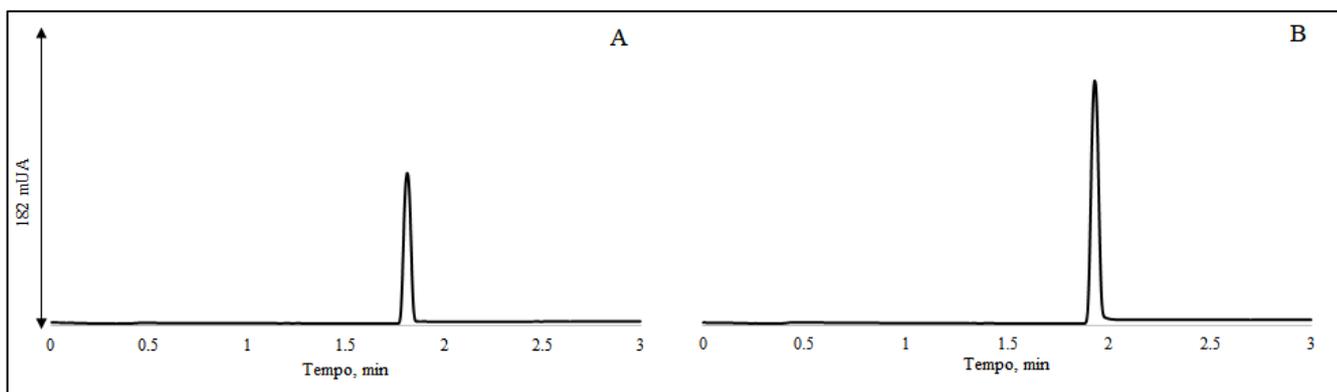
Fonte: Própria autora.

Analisando-se a Figura 20, percebeu-se a presença de um pico em 1,84 minuto, correspondente ao I⁻, mostrando um baixo tempo de análise. Dessa forma, concluiu-se que não havia necessidade de adição de um inversor do EOF para diminuir mais ainda o tempo de migração do I⁻, por ter se obtido uma corrida rápida mesmo sem a adição do mesmo.

De forma a avaliar esse eletrólito frente à amostra real de LI, fez-se a adição de uma das amostras sob as mesmas condições descritas anteriormente. O resultado é mostrado na Figura 21A. Como pôde ser observado nessa figura, houve um pico em 1,81 minuto, tempo de migração muito próximo ao I⁻ na Figura 20. Para confirmar que esse pico se tratava realmente do I⁻, fez-se um processo conhecido como *spiking*, na qual uma quantidade conhecida da solução de I⁻ foi adicionada à amostra de LI de modo que a concentração final de I⁻ correspondesse a 1 mmol L⁻¹. Se com esse processo, o pico em estudo sofresse aumento de intensidade, a conclusão seria que o pico se tratava realmente do analito em questão (BAKER, 1995).

Conforme pode ser visto na Figura 21B, o pico em 1,93 minuto apresentou maior intensidade quando comparado à Figura 21A. Assim, concluiu-se que esse pico se referia, de fato, ao I^- .

Figura 21: Eletroferograma para a amostra de LI – 1A (A) e LI – 1A adicionado de 1 mmol L^{-1} de I^- (B).

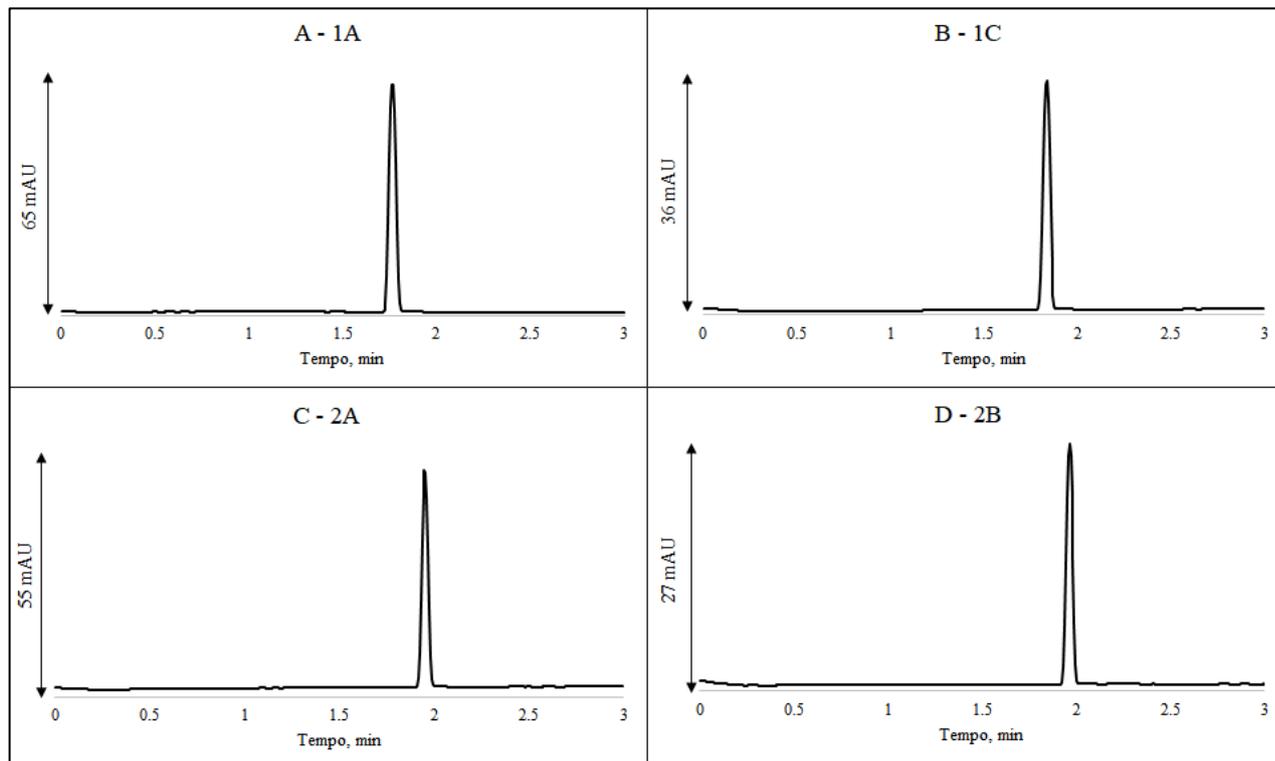


Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de – 25 kV. Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

Para comprovar que o eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20) aliado às condições instrumentais – cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm, voltagem aplicada de – 25 kV e capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo – se mostravam viáveis para a determinação de I^- nas amostras de LI, essas foram utilizadas para a injeção de todas as outras amostras de LI, conforme é mostrado na Figura 22:

Figura 22: Eletroferogramas para as amostras de LI injetadas pelo modo convencional.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -25 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

Como pode ser observado na Figura 22, essas condições permitiram a visualização do pico referente ao I^{-} para todas as amostras de LI disponíveis, em um tempo inferior a 2 minutos, concluindo então, que essas condições eram satisfatórias para a determinação de I^{-} na matriz em estudo.

4.3. INJEÇÃO PELO *OUTLET* (*SHORT-END INJECTION PROCEDURE* - SEIP)

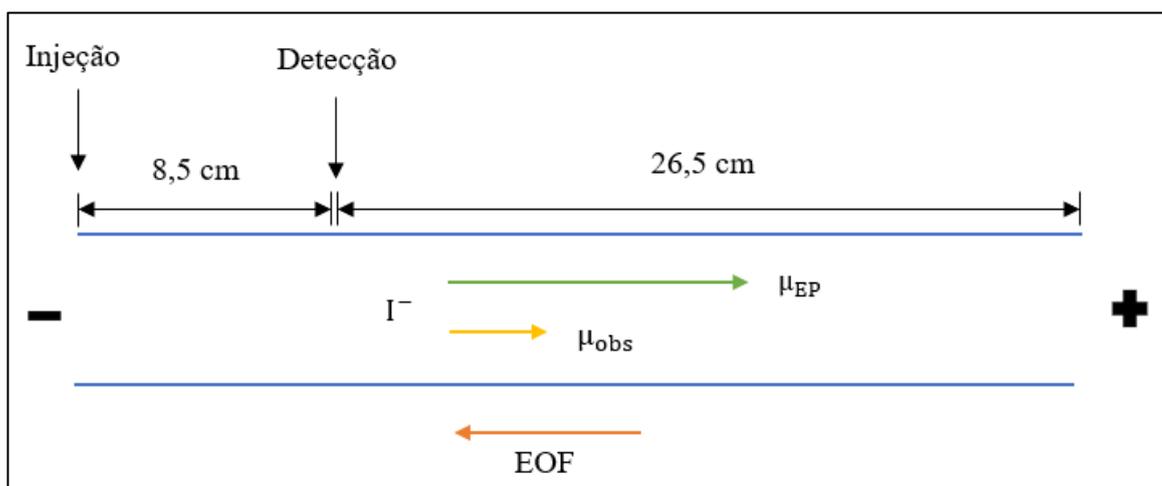
Visando diminuir o tempo total de análise, lançou-se mão de um segundo modo de injeção de amostra – a injeção pelo lado mais próximo ao detector.

Para isso, partiu-se das condições definidas na injeção convencional, necessitando apenas inverter a pressão aplicada durante o processo de injeção de amostra ou padrão. Desse modo, as

condições para esse segundo modo de injeção consistiram de: temperatura de 25 °C, injeção hidrodinâmica de - 25 mbar por 5 s e voltagem aplicada de - 25 kV. Ressalta-se que o comprimento de onda de detecção manteve-se o mesmo, 230 nm, assim como o eletrólito composto de TRIS 40 mmol L⁻¹ e HCl 20 mmol L⁻¹, pH 8,20 e o capilar, constituído por sílica fundida revestido com poliimida (série TSP) de 35 cm x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo. E que nesse procedimento, o comprimento efetivo passou a ser de 8,5 cm (correspondente à distância entre o detector e a extremidade mais próxima a ele).

A Figura 23, representa esquematicamente a análise do I⁻ sob EOF normal e polaridade invertida para a injeção pelo *outlet*. Nela percebe-se que o lado da injeção foi alterado, passando para o lado mais próximo ao detector. A polaridade é invertida em relação ao observado na Figura 19, assim na posição do *inlet*, ela é positiva e na posição do *outlet*, essa se torna negativa, de modo a permitir a passagem do analito pelo detector.

Figura 23: Representação esquemática da análise do I⁻ sob EOF normal e polaridade invertida, usando injeção pelo *outlet*.

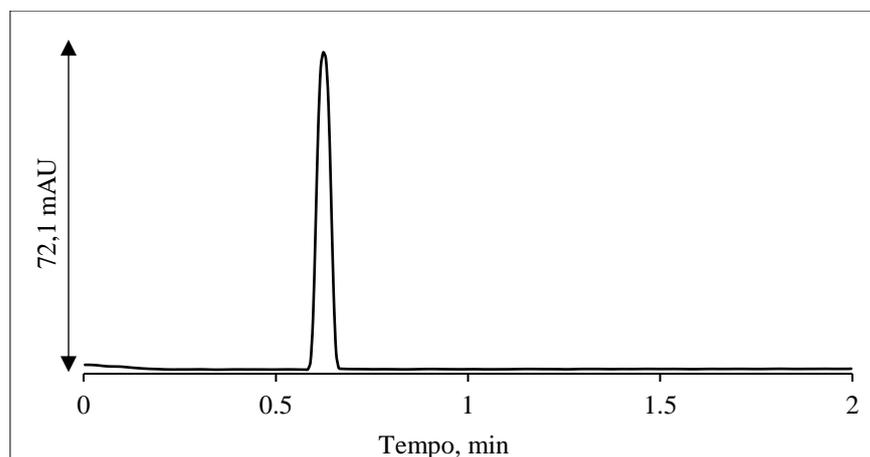


Fonte: Própria autora.

Ao injetar a solução de I⁻ 1 mmol L⁻¹ no equipamento de CE sob as condições descritas anteriormente, foi obtido o eletroferograma mostrado na Figura 24. Como pode ser observado na verificação dessa figura, o tempo de retenção (0,625 minuto) é bem menor em relação à injeção pelo lado mais distante ao detector, que era de 1,81 minuto, como já era esperado. Dessa forma, esse método de injeção se caracterizou como um método interessante em relação à injeção convencional, já que propiciou corridas mais curtas. Essa diminuição do tempo de corrida ressaltou a dispensabilidade do uso de inversor do EOF para obter análises rápidas para ânions, o que é uma

vantagem, já que diminui a quantidade de reagentes utilizados e a preocupação com seu posterior descarte, o que atende a requisitos da Química Verde.

Figura 24: Eletroferograma para uma solução 1 mmol L^{-1} de I^- com injeção pelo *outlet*, lado mais próximo ao detector.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção hidrodinâmica de -25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -25 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm ($8,5 \text{ cm}$ de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

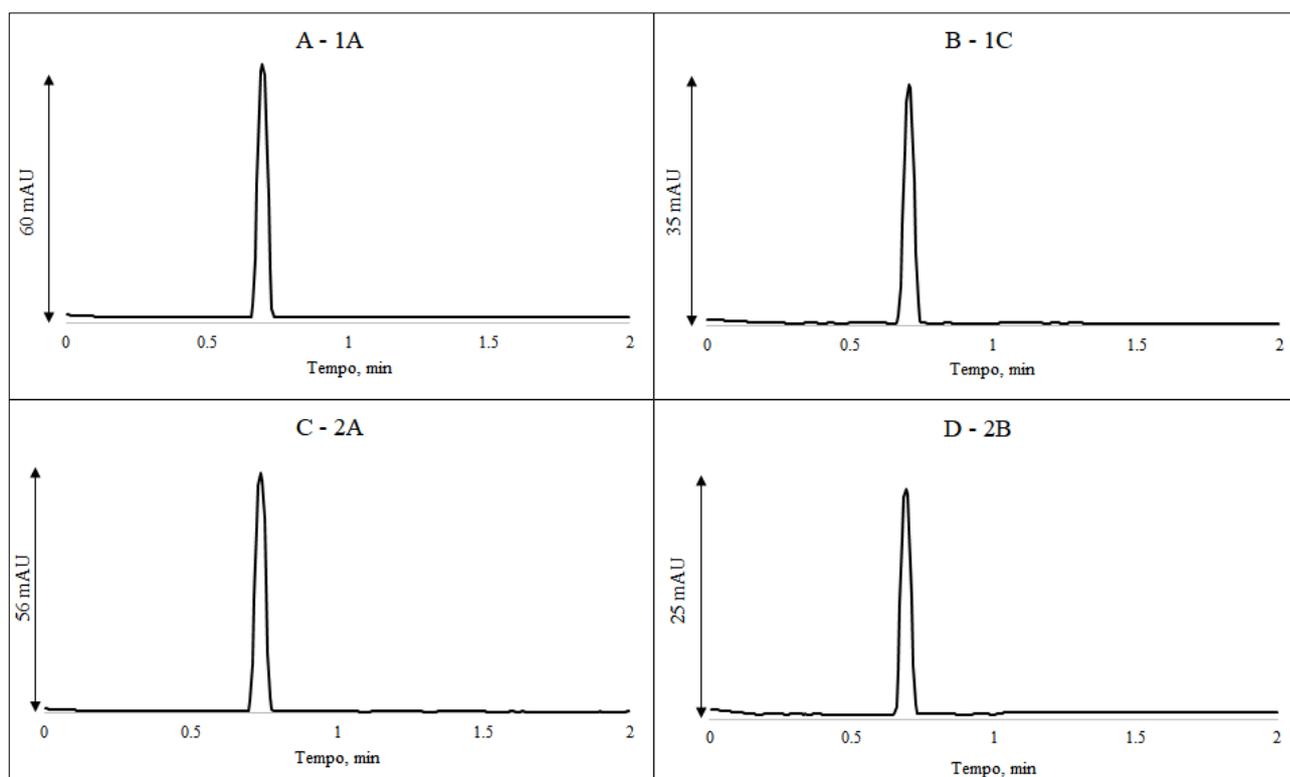
Comparando-se as Figura 20 e 24, percebeu-se que a altura do pico, realizando-se a injeção pelo *outlet* em relação à injeção pelo *inlet* é um pouco inferior. Porém, acreditou-se que esse comportamento não comprometeria a quantificação, pois além da diferença ser muito pequena, todo o processo de um dado método foi realizado sob a mesma condição, não alterando as condições de análise. Além disso, não havia garantia de que o diâmetro interno ao longo do capilar fosse o mesmo, ou seja, o diâmetro do capilar na extremidade mais distante ao detector poderia ser diferente da extremidade mais próxima ao mesmo. Além do mais, quando a injeção foi realizada pelo *inlet* (injeção convencional), poderia ocorrer o fenômeno de dispersão longitudinal.

Essa dispersão pode ocorrer devido ao maior tempo de residência do analito dentro do capilar em relação à injeção pelo *outlet*. O tempo de injeção assim como a pressão realizada na mesma são iguais para os dois tipos de injeção, dessa forma, ela ocorria durante 5 s. Porém, na injeção convencional a corrida durava cerca de 2 minutos, enquanto na injeção pelo *outlet*, a corrida durava metade do tempo. Dessa forma, o tempo de residência do analito no capilar no primeiro caso

era maior, o que poderia contribuir para a dispersão da zona e obtenção de picos maiores (TAVARES, 1996).

Para investigar se as condições descritas anteriormente para a injeção pelo *outlet* eram aplicáveis às amostras de LI, essas foram injetadas sob as mesmas condições. A Figura 25 mostra os eletroferogramas obtidos. A verificação dessa figura mostrou que todas as amostras apresentaram tempo de retenção inferior a 1 minuto.

Figura 25: Eletroferogramas para as amostras de LI usando injeção pelo *outlet*.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, injeção hidrodinâmica de -25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -25 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm ($8,5 \text{ cm}$ de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

4.4. INJEÇÃO MÚLTIPLA

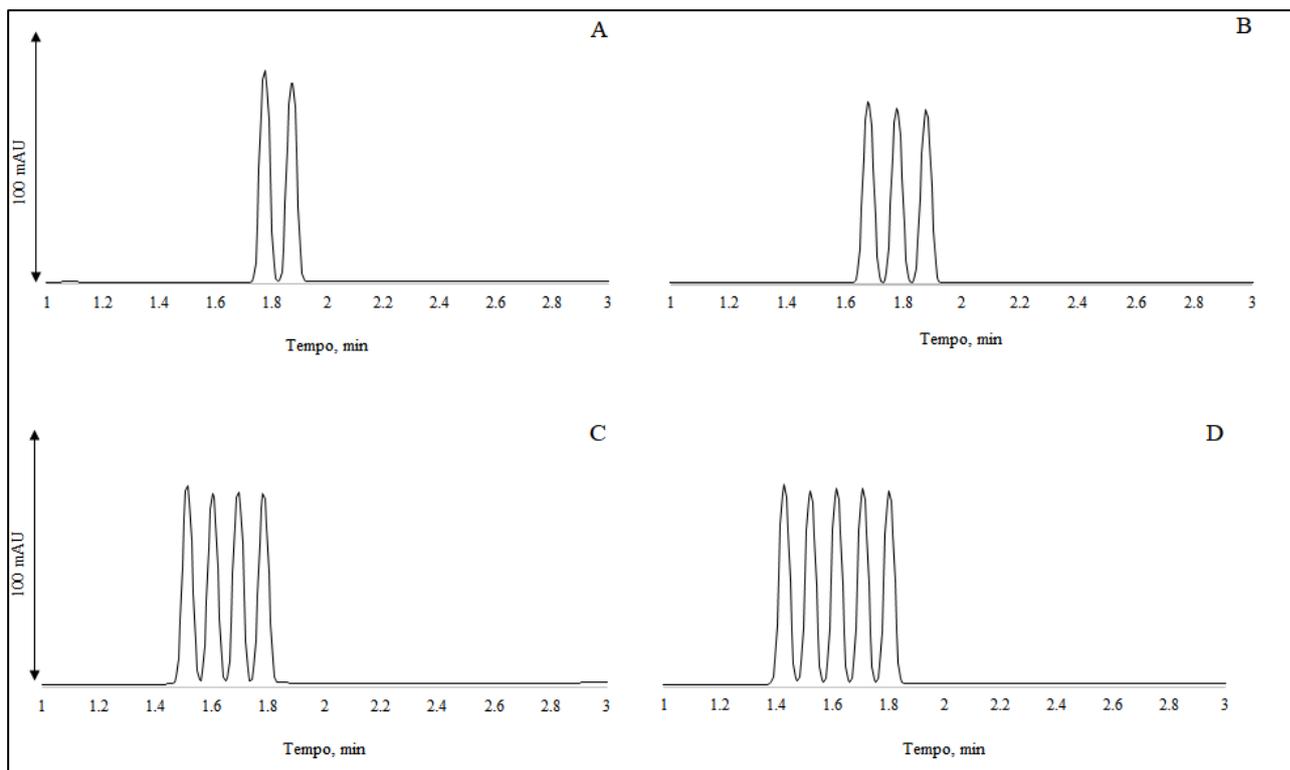
Com o intuito de diminuir mais ainda o tempo total de análise, lançou-se mão de um terceiro modo de injeção de amostra, a injeção múltipla, fazendo-se a injeção pelo lado mais distante ao detector.

Para isso, partiu-se das condições definidas na injeção convencional: temperatura de 25 °C, voltagem aplicada de – 25 kV, injeção hidrodinâmica de amostra de 25 mbar por 5 s e detecção em 230 nm. Assim, como a manutenção do mesmo eletrólito de corrida, constituído por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl, em pH 8,20 e o capilar de sílica fundida revestido com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo.

Como explicado anteriormente, de forma a manter as zonas do analito separadas e obter uma boa resolução entre os picos, era necessário realizar a injeção do eletrólito espaçador. Mas, para utilizar esse eletrólito era preciso definir a sua forma de injeção, considerando o interesse em manter a injeção hidrodinâmica, dessa forma, era necessário otimizar a mesma. Nesse parâmetro é possível variar tanto a pressão realizada durante a injeção quanto o tempo em que ela ocorre. Porém, manteve-se a pressão realizada durante a injeção constante (25 mbar) e definiu-se como parâmetro inicial do tempo de injeção, o valor correspondente ao dobro do tempo de introdução da amostra ou padrão. Como esse correspondia a 5 s, a injeção do eletrólito espaçador assumiu o valor de 10 s.

Para avaliar a viabilidade desse modo de injeção, fez-se a introdução de soluções de I⁻ na concentração de 1 mmol L⁻¹. Para isso variou-se o número de injeções consecutivas entre 2 e 5, intercalando-se com o eletrólito espaçador, nas condições já discutidas anteriormente. O resultado é mostrado na Figura 26.

Figura 26: Eletroferogramas da injeção múltipla de I^- $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ variando o número de injeções consecutivas. (A) 2 injeções. (B) 3 injeções. (C) 4 injeções. (D) 5 injeções.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção hidrodinâmica de amostra (25 mbar por 5 s) e de eletrólito espaçador (25 mbar por 10 s) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -25 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm ($26,5 \text{ cm}$ de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

Como pode ser observado na Figura 26, o tempo de obtenção do último pico correspondente ao I^- na injeção múltipla se mantinha similar ao tempo desprendido para a injeção simples (Figura 20), menos de 2 minutos. Além disso, comparando as diferentes quantidades de injeções (2, 3, 4 ou 5), esse tempo era semelhante entre elas.

Esse resultado era interessante pois mostrou a possibilidade de realizar a análise de até 5 amostras em uma única corrida, ou então analisar uma amostra em quintuplicata no mesmo período de tempo em que se analisariam 1 amostra pelo modo corrida única pelo método convencional ou 2 amostras, pelo *outlet*.

A Figura 26 mostrou ainda que apesar de ser possível realizar a separação dos picos injetados sequencialmente, não houve boa resolução entre eles. De forma a resolver essa questão,

recorreu-se a realização de um planejamento fatorial 2^3 , ou seja, em 2 níveis e 3 fatores em duplicatas autênticas, resultando em 16 ensaios. Além disso, devido ao tempo de corrida ter sido parecido independentemente de serem feitas de 2 a 5 injeções consecutivas, avaliou-se o número de injeções que seriam possíveis de serem realizadas, obtendo resolução entre os picos no menor tempo possível.

Os fatores utilizados nesse planejamento foram o tempo de injeção de eletrólito, a voltagem aplicada e o número de injeções de amostra. Desse modo, a Tabela 5, relaciona os níveis utilizados para cada um desses fatores.

Tabela 5: Níveis utilizados para a implementação do planejamento fatorial 2^3 .

	Fator	Níveis	
		-	+
1	Tempo de injeção de eletrólito (s)	10	15
2	Voltagem aplicada (kV)	- 15	- 25
3	Número de injeções	4	5

Fonte: Própria autora.

Como pode ser visualizado na Tabela 5, o tempo de injeção de eletrólito teve como menor nível, 10 s e como nível mais elevado, 15 s. Para a escolha do nível inferior, baseou-se nos resultados obtidos no estudo que resultou na Figura 26, pois percebeu-se que era possível separar os picos injetando o eletrólito por 10 s, necessitando, apenas, aumentar a resolução entre eles.

Escolheu-se uma voltagem aplicada de - 25 kV, pois esta foi utilizada nos dois modos de injeção vistos anteriormente, e - 15 kV. Sabe-se que com a utilização dessa voltagem, o tempo de corrida seria um pouco mais elevado, mas teria como vantagem a menor geração de calor durante a corrida eletroforética.

Já o número de injeções foi fixado em 4 e 5, já que as duas condições forneceram tempos de corrida parecidos, e em relação a um número menor de injeções, forneceriam uma maior frequência analítica.

A Tabela 6 mostra a matriz deste planejamento, o qual sofreu uma avaliação qualitativa, ou seja, avaliou-se o perfil dos eletroferogramas obtidos, enquanto a Figura 27 mostra os eletroferogramas obtidos para esse planejamento. Salientando-se que foi feita a injeção de I^- na concentração de $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Essa concentração correspondia ao nível mais elevado da curva de

calibração realizada, fazendo injeção convencional e pelo *outlet*, como será visto a seguir, no item “4.5”.

Tabela 6: Fatores e níveis utilizados para o planejamento 2^3 em duplicata.

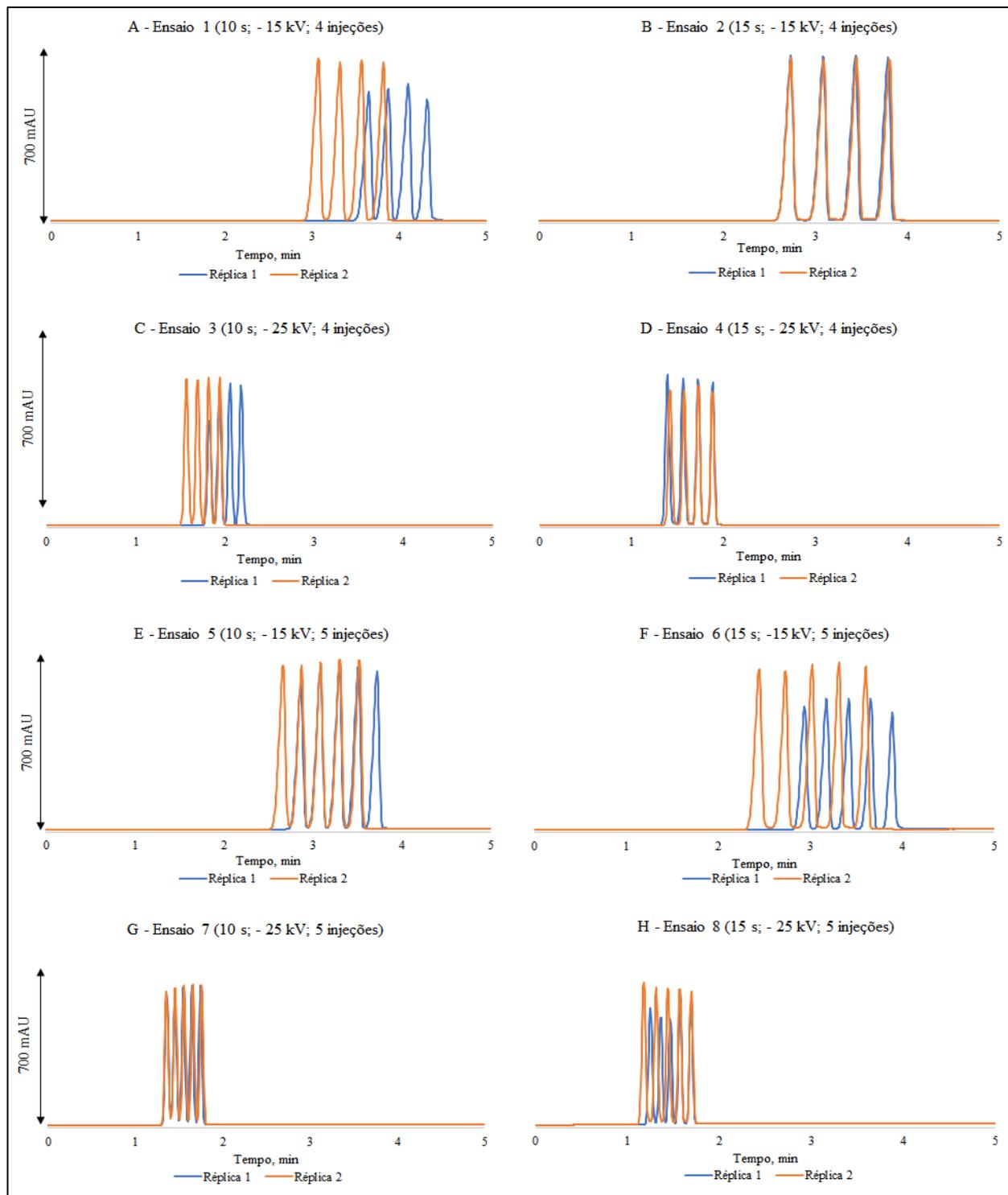
Ensaio	Tempo de injeção de eletrólito (s)	Voltagem aplicada (kV)	Número de injeções
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Níveis: Tempo de injeção de eletrólito (s): (-1): 10; (+1): 15.

Voltagem (kV): (-1): - 15; (+1): - 25. Número de injeções: (-1): 4; (+1): 5.

Fonte: Própria autora.

Figura 27: Eletroferogramas obtidos pela implementação do planejamento fatorial com 2 níveis e 3 fatores (2^3).



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo. A voltagem aplicada assim como o

tempo de injeção do eletrólito espaçador, foram mostrados em cada figura, mantendo-se a pressão constante em 25 mbar. Todos os picos se referem ao I^- .

Fonte: Própria autora.

Avaliando a Figura 27, percebeu-se que os ensaios 1, 2, 5 e 6 (Figuras 27 A, B, E e F) apresentavam maior tempo de migração (em torno de 4 minutos), devido a menor voltagem aplicada, - 15 kV. Enquanto os ensaios 3, 4, 7 e 8 (Figuras 27 C, D, G e H), devido a maior voltagem (- 25 kV), apresentavam tempo menor, em torno de 2 minutos.

Em todos os ensaios em que foi usado o menor nível de tempo de injeção (10 s), conjuntamente ao maior nível de voltagem aplicada (- 25 kV), a resolução entre os picos não ocorreu muito bem, como pode ser observado na Figura 27 C e G. Isso porque a voltagem elevada de - 25 kV associada ao tempo de 10 s, não proporcionaram um período suficiente para separar as zonas de amostras, de forma que houvesse boa resolução entre os picos, independentemente de o número de injeções ser igual a 4 ou 5.

Os ensaios com o mesmo nível de período de injeção do eletrólito anterior, mas com nível inferior de aplicação de voltagem (Figura 27 A e E) mostraram melhor perfil de separação quando comparado ao conjunto anterior, já que esses apresentavam tempo mais elevado para a separação, quando comparados aos anteriores.

Quando se analisou os eletroferogramas da Figura 27, D e H, que correspondia ao nível superior de injeção de eletrólito e voltagem aplicada (15 s e - 25 kV, respectivamente), percebeu-se que também não há uma grande resolução entre os picos. Com o ensaio 4 (Figura 27D) mostrando uma resolução um pouco melhor do que o ensaio 8 (Figura 24H) devido ao número menor de injeções.

Já os ensaios 2 e 6 (Figuras 27 B e F) mostraram serem os ensaios com melhor separação entre os picos. Nesse caso, o tempo de injeção de ambos era igual a 15 s e foi aplicada - 15 kV de voltagem. O ensaio 2 (Figura 27B) mostrou claramente que a resolução entre os picos era melhor e que havia maior precisão entre as duas réplicas do ensaio. O ensaio 6 (Figura 27F) demonstrou presença de separação entre os picos, mas com pouca resolução, se mostrando, inclusive, inferior à anterior. Além disso, houve menor precisão entre as réplicas. A diferença entre os dois ensaios, consistiu na quantidade de injeções consecutivas, e como pode ser observado o tempo se mostrou quase idêntico para ambos.

Portanto, apesar das condições do ensaio 2 (Figura 27B) terem mostrado uma ótima resolução e precisão, o ensaio 6 (Figura 27F) envolveu uma maior quantidade de injeções, o que melhoraria a frequência analítica, resultou no mesmo tempo de análise do ensaio 2 e ainda contou

com picos resolvidos. Por isso, imaginou-se que essas características do ensaio 6 mostravam condições de serem melhoradas, assim, elas foram utilizadas para a próxima etapa de otimização do método por injeção múltipla.

Visando obter uma maior frequência analítica para a análise, associada a melhor resolução entre os picos no menor intervalo de tempo possível, fez-se um segundo planejamento fatorial, mas dessa vez o planejamento foi do tipo, 3^2 , ou seja, com 2 fatores em 3 níveis cada um, com triplicata no ponto central, o que resultou em 11 ensaios. Para isso, foram injetadas soluções de I^- na concentração de $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$, mesma concentração utilizada no planejamento anterior.

Nesse planejamento, baseou-se nas condições do ensaio 6 (10 s de injeção de eletrólito, - 15 kV de voltagem aplicada e 5 injeções). Desse modo, fixou-se o número de injeções consecutivas como 5 e variou-se o tempo de injeção de eletrólito, mantendo a pressão constante e igual a 25 mbar, assim como a forma de injeção de amostra (25 mbar por 5 s), e a voltagem aplicada. Dessa forma, a Tabela 7, mostra os níveis utilizados para os dois fatores em estudo.

Tabela 7: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 3^2 .

Fator		Níveis		
		-	0	+
1	Tempo de injeção de eletrólito (s)	10	13	16
2	Voltagem aplicada (kV)	- 15	- 20	- 25

Fonte: Própria autora.

Dessa vez, para auxiliar na escolha das melhores condições de análise, ao invés de se fazer uma avaliação qualitativa, utilizou-se como resposta a estatística de resolução cromatográfica (CRS) que avalia a resolução de todos os picos presentes no eletroferograma em estudo de forma simultânea, e o tempo da corrida.

Dessa forma, a matriz de contraste e as respostas são mostradas na Tabela 8. Já os eletroferogramas correspondentes aos 11 ensaios se encontram na Figura 28.

Tabela 8: Matriz de contraste e respostas para o planejamento fatorial 3².

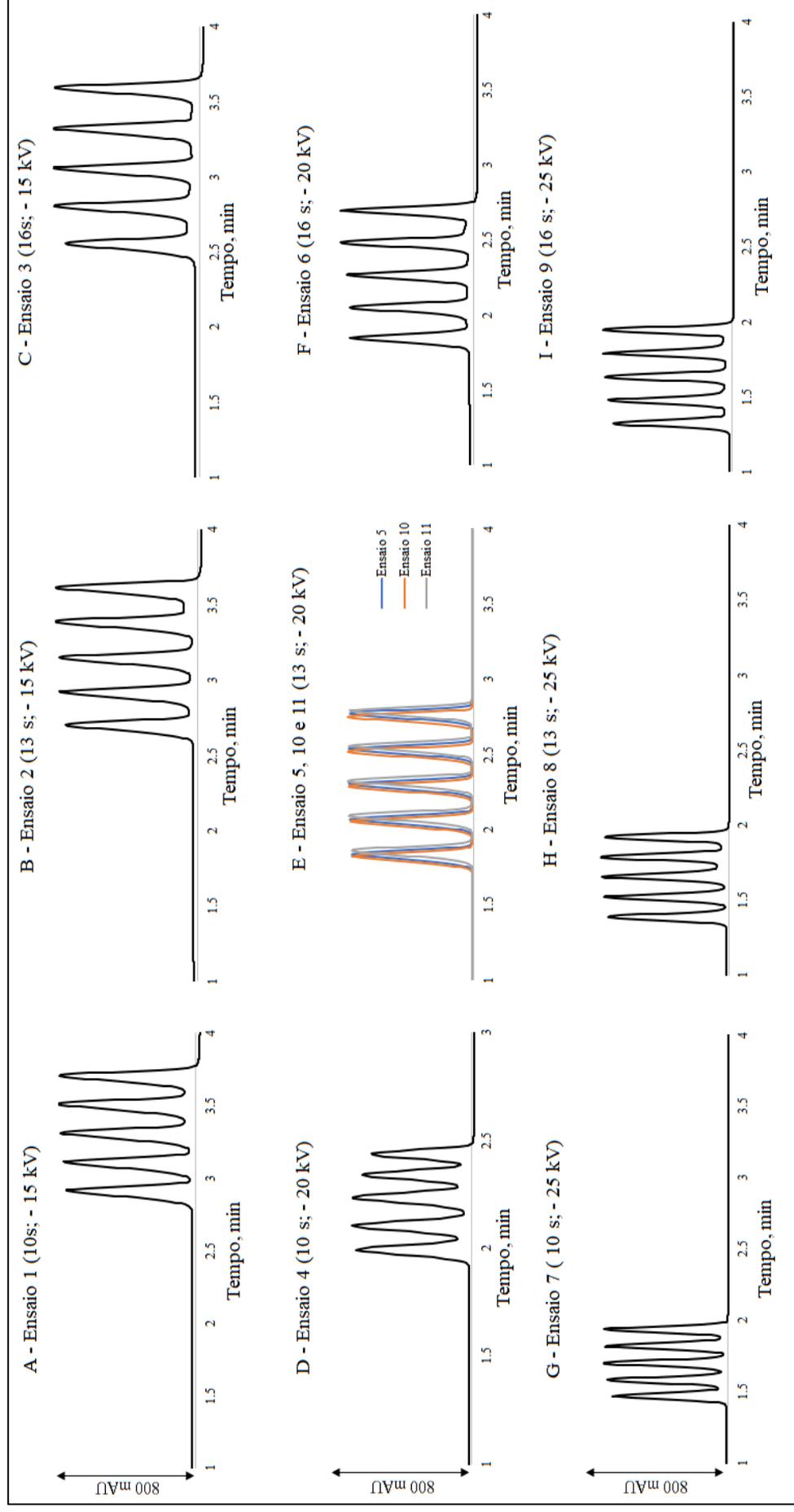
Ensaio	Tempo de injeção de eletrólito (s)	Voltagem aplicada (kV)	CRS
1	-1	-1	1672,05
2	0	-1	23,42
3	1	-1	1,60
4	-1	0	1769,48
5	0	0	1,792
6	1	0	0,99
7	-1	1	182,80
8	0	1	6,64
9	1	1	0,80
10	0	0	1,859
11	0	0	1,517

Níveis: Tempo de injeção de eletrólito (s): (-1): 10; (0): 13; (+1): 16.

Voltagem (kV): (-1): - 15; (0): - 20; (+1): - 25.

Fonte: Própria autora.

Figura 28: Eletroferogramas obtidos na implementação do planejamento fatorial 3².



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de amostra (25 mbar por 5 s) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm. Capilar de sílica fundida revestida com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo. A voltagem aplicada e as condições de injeção do eletrólito espaçador estão mostradas em cada figura, sendo a pressão aplicada de 25 mbar. Todos dos picos se referem ao I⁻.

Fonte: Própria autora.

Pela análise da Figura 28 de forma geral, percebeu-se que o aumento da voltagem aplicada levou à diminuição do tempo de análise, enquanto o aumento do tempo de injeção de eletrólito espaçador aumentou a resolução entre os picos.

Avaliando ainda essa figura, os ensaios em que o tempo de injeção de eletrólito correspondeu ao menor nível, ou seja, 10 s (Figura 28 A, D e G) apresentaram baixa resolução entre os picos. Isso resultou nos altos valores de CRS mostrados na Tabela 7. Assim, percebeu-se que era necessário maior quantidade de eletrólito entre as amostras para proporcionar maior resolução entre os picos.

Os ensaios com nível intermediário de eletrólito, 13 s, - Figura 28, B, E e H - mostraram melhor resolução entre os picos quando comparada aos ensaios com menor nível de tempo de injeção de eletrólito. Porém, a sua resolução ainda era menor (principalmente para os ensaios 2 e 8) quando comparada à Figura 28, C, F e I, correspondentes ao nível superior de eletrólito, 16 s, as quais demonstraram a melhor resolução entre os picos, quando comparados aos demais, refletindo nos baixos valores de CRS encontrados na Tabela 8.

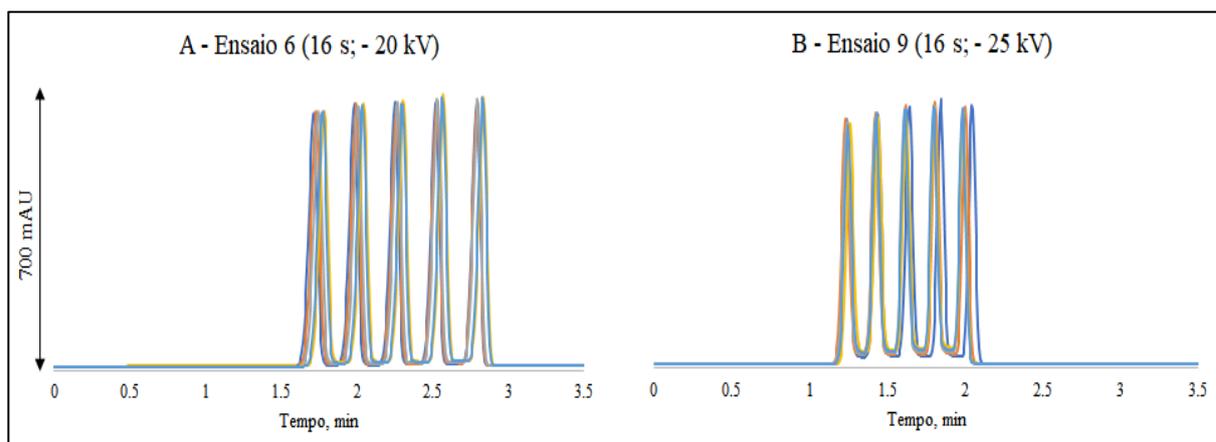
Percebe-se também pela Figura 28E, que os ensaios correspondentes ao ponto central (Ensaio 5, 10 e 11) apresentaram boa resolução entre os picos, mas não mostraram os menores valores de CRS.

De acordo com as respostas da Tabela 8, era possível perceber que os ensaios 6 e 9 apresentaram o menor CRS, o que ocorreu devido à alta resolução entre os picos, evidenciados a partir da análise da Figura 28 F e I, associado ao baixo tempo de análise. É interessante destacar que o ensaio 3, apesar de ter mostrado boa resolução entre os picos, o correspondente CRS não foi o menor por causa do tempo de corrida superior.

Os ensaios 6 e 7 apresentavam o nível mais elevado do tempo de injeção de eletrólito, ou seja, 16 s. A diferença entre os dois, consistia na voltagem aplicada. O ensaio 6 correspondia à aplicação de - 20 kV de voltagem e o ensaio 9, a - 25 kV. O valor maior de voltagem aplicada levou ao menor tempo de retenção do analito no ensaio 9 em comparação ao ensaio 6. Isso pôde ser comprovado pela observação dos eletroferogramas mostrados na Figura 28F e I.

Como os ensaios 6 e 9 apresentaram os melhores valores de CRS, de forma a determinar qual a melhor condição de injeção do eletrólito e aplicação de voltagem, definiu-se a repetibilidade como critério de otimização da melhor condição de análise. Assim, uma solução de I^- na concentração $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi injetada sob cada condição cinco vezes, como pode ser visto na Figura 29. Os valores do RSD dessa avaliação para a área dos picos e tempo de retenção são mostrados na Tabela 9.

Figura 29: Eletroferogramas correspondentes ao teste de repetibilidade para os ensaios 6 e 9.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção hidrodinâmica de amostra (25 mbar por 5 s) pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm. Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 μm de diâmetro interno x 375 μm diâmetro externo.

A voltagem aplicada e o tempo de injeção de eletrólito espaçador estão mostrados no título de cada figura. A pressão aplicada foi mantida em 25 mbar. Todos os picos se referem ao I^- .

Fonte: Própria autora.

Tabela 9: Valores de RSD para o teste de repetibilidade para os ensaios 6 e 9.

Ensaio	RSD – Área dos picos (%)	RSD – Tempo de migração (%)
6	1,71	0,77
9	3,81	1,29

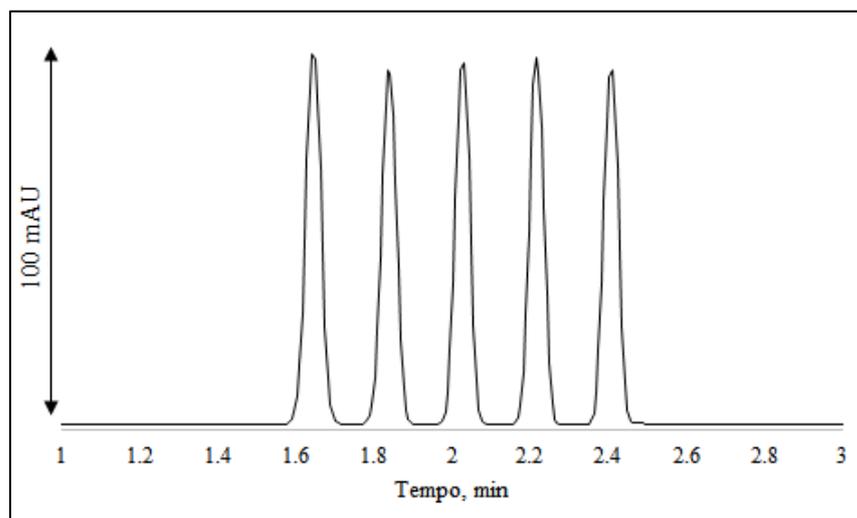
Fonte: Própria autora.

Observando a Figura 29 e a Tabela 9, o ensaio 6 apesar de levar a maior tempo de análise, apresentou a maior precisão quando comparado ao ensaio 9, já que seu RSD tanto para a área dos picos quanto para o tempo de migração, era menor. Dessa forma, por ser mostrar mais preciso, as condições referentes ao ensaio 6 foram utilizados para a continuidade do trabalho, sendo elas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s de amostra e 25 mbar por 16 s de eletrólito), capilar de sílica fundida com 35 cm de comprimento (26,5 cm de comprimento efetivo), 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, temperatura do cartucho de

25°C e voltagem aplicada de – 20 kV, comprimento de onda de detecção de 230 nm e eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20).

Assim, como o planejamento foi otimizado a partir de uma solução com concentração referente à 11,0 mmol L⁻¹ de I⁻, de forma a comparar os sinais obtidos entre a injeção múltipla, convencional (Figura 20) e pelo *outlet* (Figura 24), injetou-se a solução de I⁻ na concentração de 1 mmol L⁻¹ usando as condições otimizadas pelo planejamento fatorial 3². O resultado é mostrado no eletroferograma da Figura 30. Avaliando essa figura, percebeu-se que essas condições forneceram realmente picos bem resolvidos em um tempo de análise em torno de 2,5 minutos.

Figura 30: Eletroferograma para 1 mmol L⁻¹ de I⁻ pelo método de injeção múltipla usando as condições otimizadas no planejamento fatorial 3².



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de amostra de 25 mbar por 5 s e de eletrólito de 25 mbar por 16 s, pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de – 20 kV. Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo. Todos os picos se referem ao I⁻.

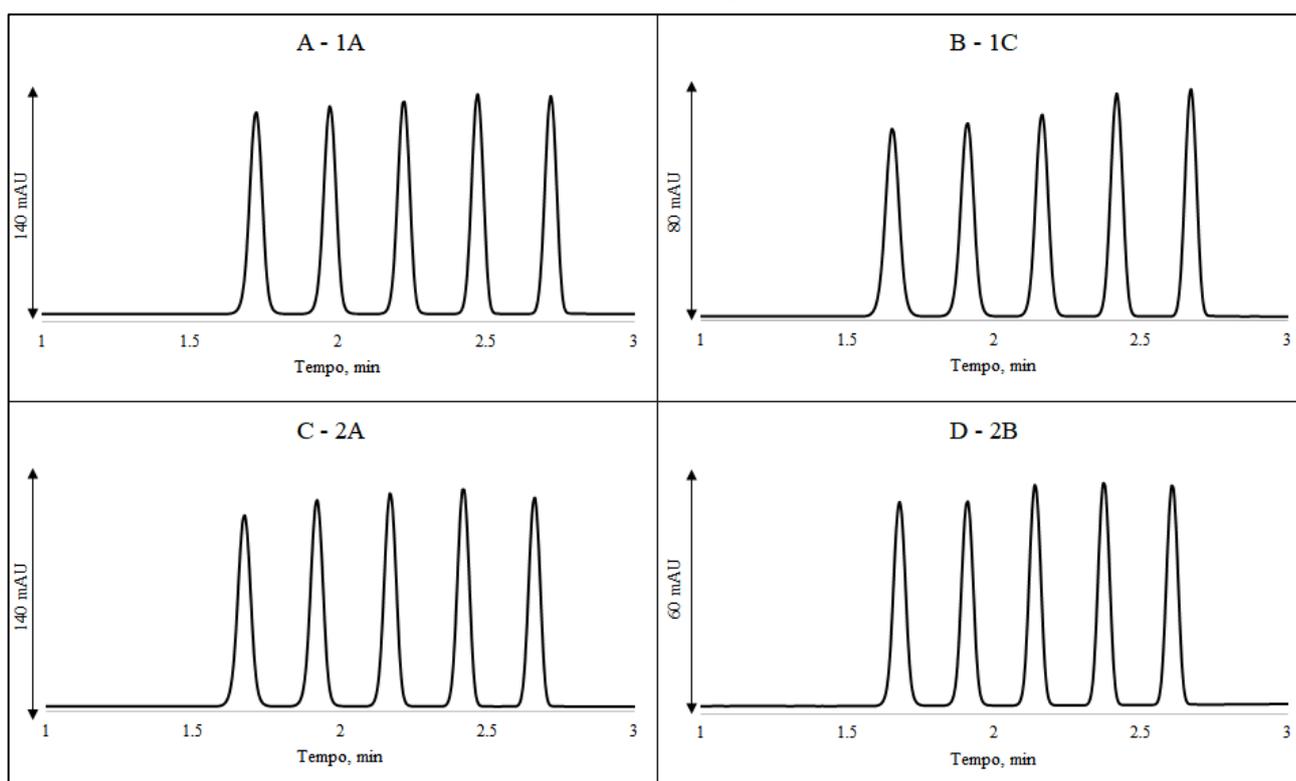
Fonte: Própria autora.

Quando se comparou as Figuras 20, 24 e 30, percebeu-se um aumento no sinal dessa última em relação aos dois primeiros. Acreditou-se que esse fenômeno ocorria devido a um alargamento das bandas causado pela difusão longitudinal, devido ao tempo de residência do

soluto no capilar aumentar da injeção pelo *outlet* para a convencional e deste para a injeção múltipla.

A fim de mostrar que esse método era aplicável às amostras de LI, essas foram injetadas em corridas distintas, de forma sequencial (cinco vezes) cada uma sob as condições otimizadas, resultando nos eletroferogramas mostrados na Figura 31.

Figura 31: Eletroferogramas correspondentes ao método de injeção múltipla, obtidos para as amostras de LI sob as condições obtidas pelo planejamento fatorial 3^2 .



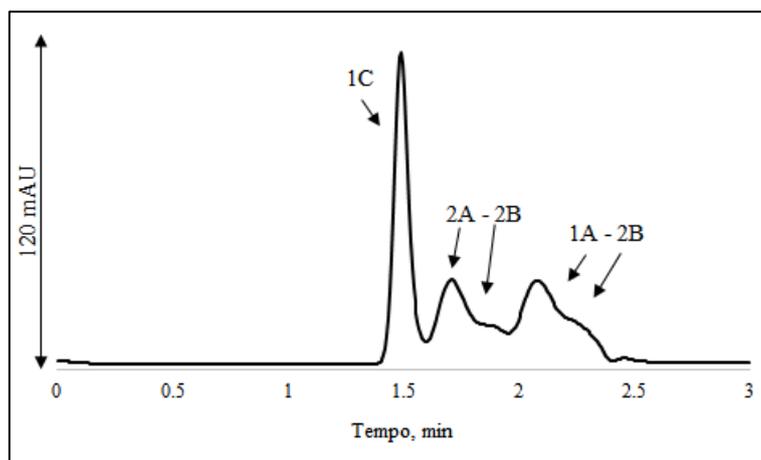
Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção hidrodinâmica de amostra de 25 mbar por 5 s e de eletrólito de 25 mbar por 16 s, pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -20 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo. Todos os picos se referem ao I^- .

Fonte: Própria autora.

A partir da Figura 31, observou-se que o método poderia ser utilizado para a quantificação de I^- nas amostras reais de LI, fazendo a injeção sequencial 5 vezes da mesma amostra em uma mesma corrida e não gerando problemas de coluição entre os picos.

Com o objetivo de determinar se seria possível realizar a injeção de amostras diferentes em uma mesma corrida, injetou-se sequencialmente 5 amostras diferentes – 1C, 2A, 2B, 1A e 2A – no equipamento de CE, como mostra a Figura 32.

Figura 32: Eletroferogramas de injeção múltipla obtidos para as amostras reais dos LI – 1C, 2A, 2B, 1A e 2B – sob as condições obtidas pelo planejamento fatorial 3².



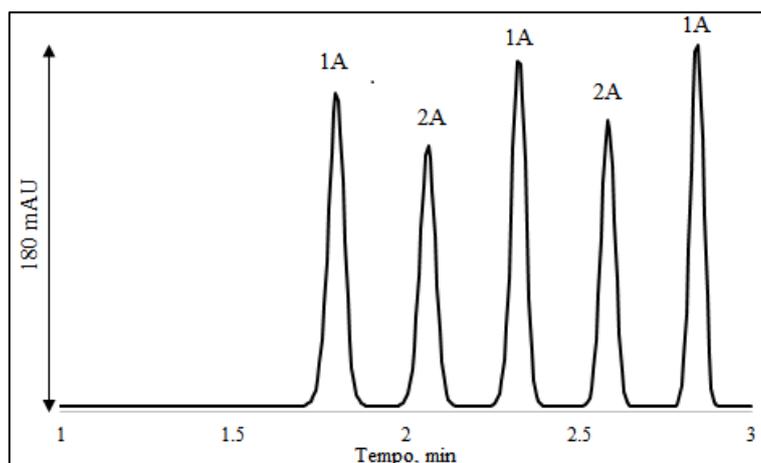
Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de amostra de 25 mbar por 5 s e de eletrólito de 25 mbar por 16 s, pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de – 20 kV. Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

Analisando-se a Figura 32, percebeu-se que apenas o primeiro pico era obtido de forma bem clara e resolvida. Enquanto os outros quatro sofriam coluição.

De forma a encontrar uma explicação para esse comportamento, injetaram-se duas amostras do mesmo aminoácido (A), porém com distintos cátions – 1A e 2A – para avaliar se haveria alguma mudança de comportamento. A partir dessa injeção, encontrou-se o eletroferograma mostrado na Figura 33.

Figura 33: Eletroferogramas de injeção múltipla obtidos para as amostras 1A e 2A sob as condições obtidas pelo planejamento fatorial 3^2 .



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, injeção hidrodinâmica de amostra de 25 mbar por 5 s e de eletrólito de 25 mbar por 16 s, pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -20 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

Avaliando a Figura 33, o comportamento anterior não era repetido, ou seja, o fato de serem feitas injeções de LI contendo cátions diferentes não causou qualquer influência sobre a corrida eletroforética. Isso indicou que a coluição entre os picos na Figura 32 era causada pela presença de diferentes aminoácidos dentro do capilar, fazendo com que houvesse alguma interação entre eles e resultando em coluição.

Relembrando a curva de mobilidade eletroforética efetiva da Figura 18, em pH 8,2 os aminoácidos estavam majoritariamente na forma neutra. Assim, acreditou-se que o comportamento visto na Figura 32 fosse devido à interação entre o grupo carboxilato e o grupo amino entre os aminoácidos, devido à formação de ligações de hidrogênio, alterando a configuração das zonas dentro do capilar.

Esse fenômeno não ocorria quando era feita a injeção de amostras contendo o mesmo aminoácido como visto na Figura 31, em que eram injetados sequencialmente o mesmo LI, ou seja, contendo o mesmo cátion e ânion. O mesmo comportamento era obtido perante à injeção de LI contendo o mesmo ânion, mas tipos diferentes de cátions, como visto na Figura 33. Isso

demonstrou que o fator influenciador na injeção era o tipo de aminoácido, sendo que o cátion não influenciava nesse processo.

Dessa forma, concluiu-se que não seria possível utilizar o método por injeção múltipla para análise de I^- realizando a injeção de amostras diferentes na mesma corrida eletroforética. Portanto, decidiu-se utilizar o método por injeção múltipla, realizando cinco injeções do mesmo LI sequencialmente, o que levou a análise de uma amostra em quintuplicata na mesma corrida, durando cerca de 2,5 minutos. É importante ressaltar que era possível realizar quintuplicatas autênticas, bastando para isso montar um método correto no equipamento de CE.

4.5. OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE I^- POR CZE-UV

Visando à quantificação de I^- em LI, decidiu-se implementar uma curva analítica. Porém, apesar do I^- nesses LI se tratarem de impureza de uma síntese e por esse motivo se esperar uma baixa concentração do mesmo nas amostras e por não haver uma regulamentação que apontasse a concentração máxima do mesmo, não se tinha ideia da faixa de concentração a ser utilizada na construção dessa curva analítica. Por causa disso, utilizou-se o método de adição de padrão com um incremento em algumas amostras, de forma a identificar de forma exploratória a média de concentração de I^- nas mesmas (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Assim, identificou-se que as amostras possuíam uma concentração de I^- na qual o uso de uma curva analítica na faixa de 0,1 – 11,0 mmol L⁻¹ seria suficiente (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A implementação da curva analítica foi feita baseada em cinco níveis de concentração em réplicas autênticas. As concentrações corresponderam à 0,1; 2,0; 5,0; 8,0 e 11,0 mmol L⁻¹. Para os métodos de injeção convencional e pelo *outlet*, foram utilizadas três réplicas e para a injeção múltipla, usou-se cinco réplicas.

Para todos os métodos com diferentes tipos de injeção, o modelo de regressão foi implementado através de regressão pelo método dos mínimos quadrados. Para isso, utilizou-se o método de padronização externa. Assim, soluções padrão de I^- nas concentrações referentes aos cinco níveis foram injetadas no aparelho de CE e obtidos os eletroferogramas correspondentes. Após a integração dos picos referente ao I^- e a obtenção das áreas, estas foram comparadas com suas concentrações.

Assim, a Tabela 10 apresenta os valores das áreas dos picos utilizados para a implementação do modelo e o valor do RSD, para os três métodos otimizados nesse trabalho.

Tabela 10: Valores de área usados para a implementação do modelo de regressão linear para os métodos otimizados para os 3 modos de injeção – convencional, *outlet* e múltipla.

Convencional						
[I ⁻] (mmol L ⁻¹)	Sinal 1 ^a replicata	Sinal 2 ^a replicata	Sinal 3 ^a replicata	Sinal 4 ^a replicata	Sinal 5 ^a replicata	RSD (%)
0,1	19,03	19,32	19,24	-	-	0,76
2,0	386,39	401,96	391,14	-	-	2,03
5,0	839,01	850,66	899,16	-	-	3,70
8,0	1311,44	1289,78	1349,15	-	-	2,28
11,0	1727,34	1894,70	1764,06	-	-	4,90
Outlet						
[I ⁻] (mmol L ⁻¹)	Sinal 1 ^a replicata	Sinal 2 ^a replicata	Sinal 3 ^a replicata	Sinal 4 ^a replicata	Sinal 5 ^a replicata	RSD (%)
0,1	19,70	21,14	22,20	-	-	5,97
2,0	324,52	317,6	339,32	-	-	3,36
5,0	832,76	798,17	782,66	-	-	3,19
8,0	1243,05	1152,10	1114,89	-	-	5,64
11,0	1585,36	1527,04	1606,30	-	-	2,61
Injeção múltipla						
[I ⁻] (mmol L ⁻¹)	Sinal 1 ^a replicata	Sinal 2 ^a replicata	Sinal 3 ^a replicata	Sinal 4 ^a replicata	Sinal 5 ^a replicata	RSD (%)
0,1	30,92	27,52	27,25	27,13	26,31	6,42
2,0	543,05	511,72	514,03	516,57	525,11	2,44
5,0	1292,83	1230,32	1195,03	1184,28	1191,40	3,70
8,0	1978,86	1907,69	1886,20	1818,87	1854,92	3,19
11,0	2551,45	2618,58	2652,26	2605,99	2600,03	1,40

Fonte: Própria autora.

Utilizando o método com injeção convencional, observou-se que todos os valores de RSD são menores do que 5 %, enquanto que pela injeção pelo *outlet*, o primeiro e o quarto nível foram obtidos com o RSD superior a 5 %. E no caso da injeção múltipla, apenas o primeiro nível tem o RSD acima de 5 %. Ou seja, no geral, todos os três métodos apresentaram baixos valores de RSD.

A Tabela 10 mostra de forma mais clara o que foi observado anteriormente sobre o alargamento das bandas causado pela difusão longitudinal. Já que para o método de injeção convencional e pelo *outlet*, em geral, houve um aumento de área do segundo para o primeiro. E que do método convencional para a injeção múltipla, também se observou esse aumento.

Utilizando-se o método dos mínimos quadrados, conseguiu-se obter a equação da curva analítica, bem como o coeficiente de correlação (r) para cada método otimizado, como mostra a Tabela 11.

Tabela 11: Resultados estatísticos para os modelos de previsão para os 3 métodos implementados – convencional, *outlet* e múltipla.

Modo de injeção	Equação da curva	r	a	b
Convencional	$y = 160,53 x + 39,547$	0,9977	160,53	39,547
<i>Outlet</i>	$y = 141,52 x + 40,403$	0,9970	141,52	40,403
Múltipla	$y = 234,3 x + 29,673$	0,9991	234,3	29,673

Fonte: Própria autora.

A Tabela 11, mostra que em todas as curvas implementadas, o valor do coeficiente de correlação era próximo de 1,0, mostrando a relação linear existente entre as variáveis y e x , correspondente a área e concentração, respectivamente.

Esses modelos de previsão só podem ser utilizados corretamente se sua linearidade for verificada e ainda, se houver significância da regressão e não apresentarem falta de ajuste. Porém, antes disso é necessário verificar os pressupostos normalidade e homocedasticidade, conforme discutido no item “1.7.1”. Considerou-se que o pressuposto da independência já era atendido, pelo fato de as soluções utilizadas na implementação desses modelos terem sido preparadas de forma autêntica e a injeção no equipamento de CE ter acontecido de forma aleatória. A Tabela 12 apresenta os resultados encontrados para esses pressupostos.

Tabela 12: Pressupostos avaliados para a análise de variância.

Modo de injeção	Normalidade		Homocedasticidade
	W_{cal}	W_{tab}	p-valor
Convencional	0,918	0,881	0,342
<i>Outlet</i>	0,888	0,881	0,357
Múltipla	0,894	0,888	0,162

Fonte: Própria autora.

A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro – Wilk, em que a resposta obtida, chamada de $W_{calculado}$ (W_{cal}) deve ser maior do que o $W_{tabelado}$ (W_{tab}) para um dado intervalo de confiança. Como pode ser observado na Tabela 12, todos os valores de W_{cal} eram maiores do que os valores de W_{tab} para os respectivos intervalos de confiança considerados, assim esse pressuposto foi aceito e os dados estavam distribuídos de acordo com uma distribuição normal.

Já a homocedasticidade foi verificada através do software MiniTab14[®], pelo teste de Levene. Pelos dados da Tabela 12, todos os valores eram maiores do que 0,05, de forma que esse pressuposto foi aceito e esses dados foram considerados homocedásticos.

Como os pressupostos não foram violados, a validade do modelo e a significância da estatística da curva ajustada podiam ser testados por meio da análise de variância, conforme explicado no item “1.7.1”. A Tabela 13 mostra o resultado final da análise de variância a 95 % de confiança.

Tabela 13: Dados utilizados para a análise de variância.

Modo de injeção	Falta de ajuste		Significância da regressão	
	F_{cal}	$F_{\theta_{faj}, \theta_{ep}}$	F_{cal}	$F_{\theta_{reg}, \theta_r}$
Convencional	1,53	3,71	2757,98	4,67
<i>Outlet</i>	3,62	3,71	2137,93	4,67
Múltipla	2,02	3,1	13167,94	4,28

Injeção convencional e *outlet*: $F_{\theta_{faj}, \theta_{ep}} = F_{3, 10}$ e $F_{\theta_{reg}, \theta_r} = F_{1, 13}$.

Injeção múltipla: $F_{\theta_{faj}, \theta_{ep}} = F_{3, 20}$ e $F_{\theta_{reg}, \theta_r} = F_{1, 23}$.

Fonte: Própria autora.

Avaliando os dados da Tabela 13, o valor de $F_{calculado}$ no teste da falta de ajuste foi menor do que o $F_{tabelado}$ para todos os métodos otimizados, afirmando-se então que, com 95 % de confiança,

não houve evidência de falta de ajuste nos modelos implementados. No caso do teste de significância da regressão, o $F_{\text{calculado}}$ foi mais de cinco vezes maior do que o F_{tabelado} , também em todos os métodos, mostrando que os modelos apresentavam regressões significativas.

Dessa forma, as equações mostradas na Tabela 11 foram consideradas satisfatórias e puderam ser utilizadas para a quantificação de I^- nas amostras de LI.

4.6. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE INJEÇÃO CONVENCIONAL, *OUTLET* E MÚLTIPLA

A Tabela 14, mostra os testes de validação realizados, consistindo em LD, LQ e recuperação.

O LD corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, enquanto o LQ representa a menor concentração que pode ser quantificada usando um determinado método. Salienta-se que os dois parâmetros foram medidos usando a relação sinal – ruído. De acordo com os dados da Tabela 14, foram encontrados baixos valores de LD e LQ, sendo que o primeiro nível das curvas analíticas implementadas foi superior ao LQ para as amostras em todos os métodos otimizados.

Os ensaios de recuperação foram realizados pela fortificação das amostras com soluções de I^- em três níveis de concentração: o primeiro correspondendo ao primeiro nível da curva analítica ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), o segundo nível correspondendo ao nível intermediário da curva, que foi considerado como $5,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e o terceiro nível, o qual se referiu ao nível mais elevado, ou seja, $11,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O cálculo foi realizado pela equação (14).

Ressalta-se que esse teste foi realizado para os métodos de injeção pelo *outlet* e múltipla. O primeiro foi realizado em triplicata e o segundo, em quintuplicata, ambos de forma autêntica.

Como pode ser observado na Tabela 14, sobre o ensaio de recuperação para o método de injeção pelo *outlet*, os resultados variaram entre 97,478 e 110,820%. Enquanto que para a injeção múltipla, a recuperação variou de 94,381 a 109,087%.

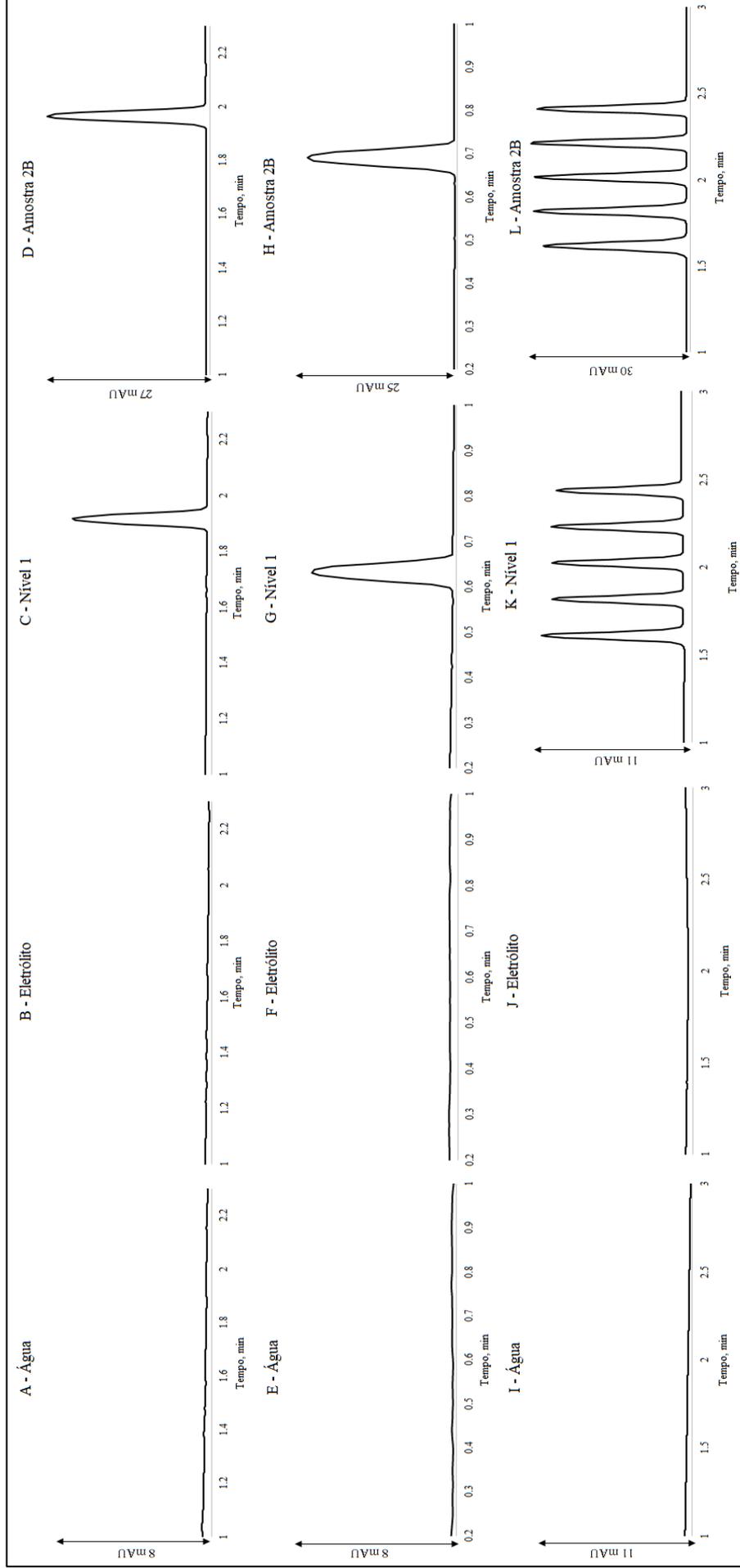
Tabela 14: Validação para os três modos de injeção – convencional, *outlet* e múltipla.

Modo de injeção	LI	LD (mmol L ⁻¹)	LQ (mmol L ⁻¹)	Recuperação		
				0,1 mmol L ⁻¹	5,5 mmol L ⁻¹	11,0 mmol L ⁻¹
Convencional	1A	0,004	0,014	-	-	-
	1C	0,006	0,020	-	-	-
	2A	0,003	0,011	-	-	-
	2B	0,002	0,008	-	-	-
<i>Outlet</i>	1A	0,006	0,02	101,538 ± 3,572	97,478 ± 3,800	103,287 ± 13,065
	1C	0,005	0,02	102,358 ± 7,445	106,343 ± 1,603	104,283 ± 7,000
	2A	0,006	0,02	108,021 ± 6,307	104,077 ± 2,804	110,820 ± 2,874
	2B	0,003	0,01	104,940 ± 5,403	98,487 ± 1,224	107,956 ± 3,365
Múltipla	1A	0,006	0,020	105,111 ± 22,941	94,381 ± 1,589	101,519 ± 1,726
	1C	0,005	0,016	96,053 ± 8,682	104,675 ± 3,003	105,401 ± 1,806
	2A	0,005	0,018	109,087 ± 17,602	101,072 ± 2,310	107,264 ± 2,984
	2B	0,005	0,017	100,983 ± 22,377	104,484 ± 1,350	101,872 ± 2,029

Fonte: Própria autora.

O exame de seletividade foi realizado com o objetivo de assegurar que o sinal analítico era devido ao analito de interesse e não a outros fatores. Para esse teste, fez-se a injeção do eletrólito de corrida composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20) e da água, que é o diluente das amostras de LI, para os três métodos otimizados. Os eletroferogramas correspondentes podem ser visualizados na Figura 34. Nessa figura, foi feita a comparação dos eletroferogramas do eletrólito e da água, com o eletroferograma de um dos níveis da curva analítica e de uma das amostras de LI. Para isso, foram escolhidos o primeiro nível da curva de calibração e a amostra 2B.

Figura 34: Teste de seletividade para o método de injeção convencional, pelo *outlet* e múltipla.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TRIS e 20 mmol L⁻¹ de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a 25 °C, injeção hidrodinâmica de amostra: convencional e múltipla (25 mbar por 5 s), *outlet* (-25 mbar por 5 s). Injeção hidrodinâmica de eletrólito – injeção múltipla (25 mbar por 16 s) -, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de – 25 kV (convencional e *outlet*) e – 20 kV (múltipla).

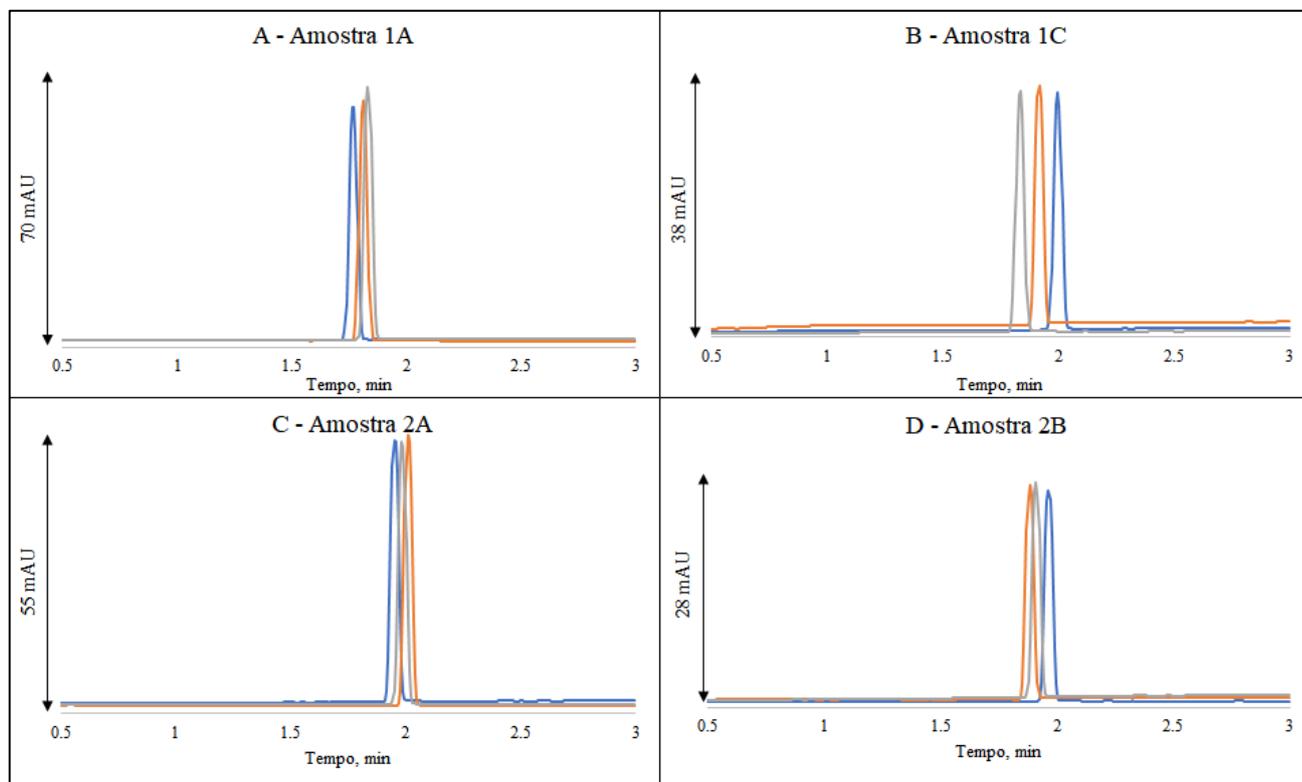
Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (8,5 cm (injeção pelo *outlet*) ou 26,5 cm (injeção convencional e múltipla) de comprimento efetivo) x 75 µm de diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo.

Conforme pode ser visualizado na Figura 34, nos eletroferogramas da água e do eletrólito, não foi possível perceber sinais na região do pico do I^- em nenhum dos três métodos otimizados que pudessem interferir na sua determinação, de forma que pôde se garantir que o pico de resposta pertenceu exclusivamente ao I^- .

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE I^- NAS AMOSTRAS DE LI UTILIZANDO OS MÉTODOS DE INJEÇÃO CONVENCIONAL, *OUTLET* E MÚLTIPLA

Implementadas as curvas analíticas dos 3 métodos, estas foram utilizadas para a quantificação das amostras de LI. Para isso, injetou-se as amostras sob as condições otimizadas e após a integração do pico correspondente ao I^- , a área resultante foi usada na curva de calibração para obter a concentração correspondente do analito. Salienta-se que as quantificações usando o método convencional e pelo *outlet* foram realizadas em triplicatas autênticas e a quantificação usando a injeção múltipla foi realizada em quintuplicatas autênticas, conforme o método otimizado. A Tabela 15, mostra os resultados obtidos na quantificação para os três métodos, assim como o desvio padrão, o RSD e o intervalo de confiança a 95%. Enquanto os eletroferogramas correspondentes à quantificação pelos mesmos três métodos podem ser visualizados nas Figuras 35, 36 e 37.

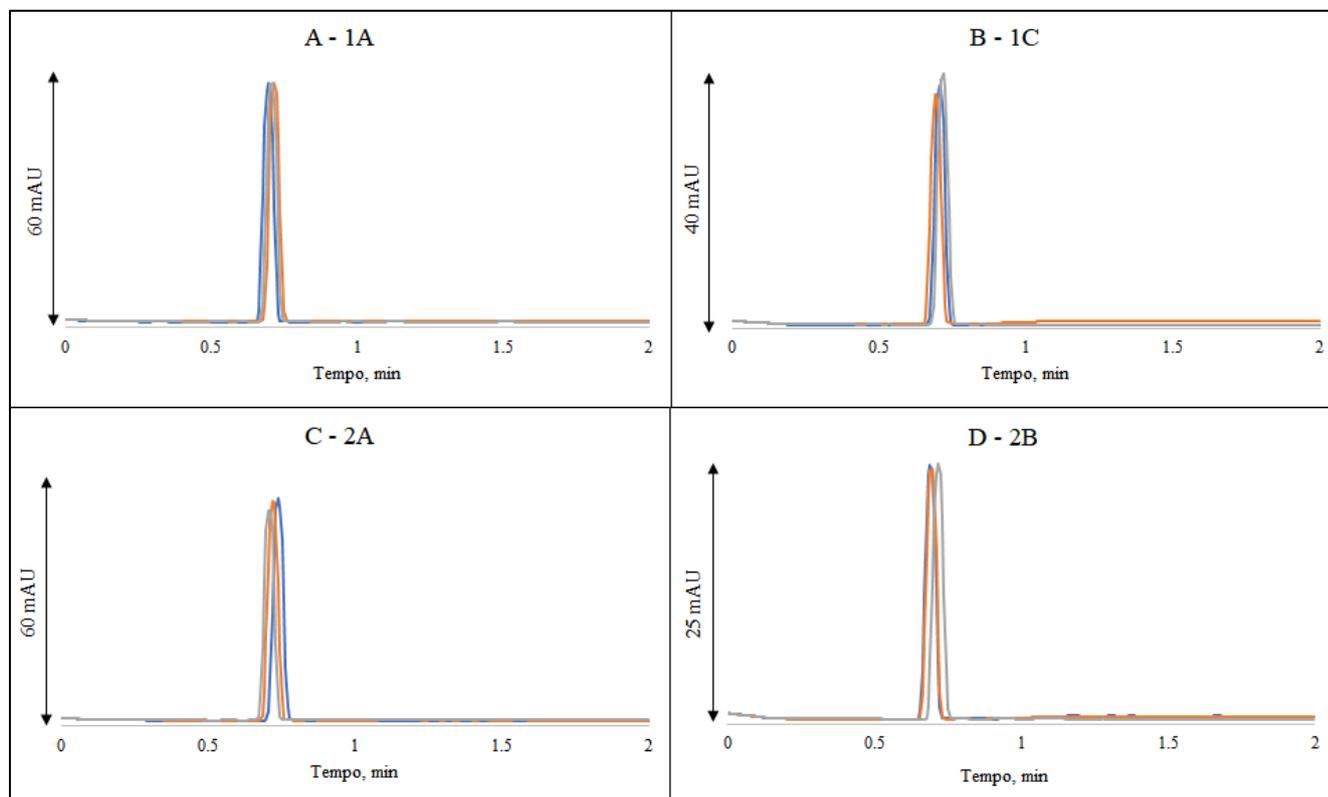
Figura 35: Eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras de LI utilizando o método de injeção convencional.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 5 s pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -25 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

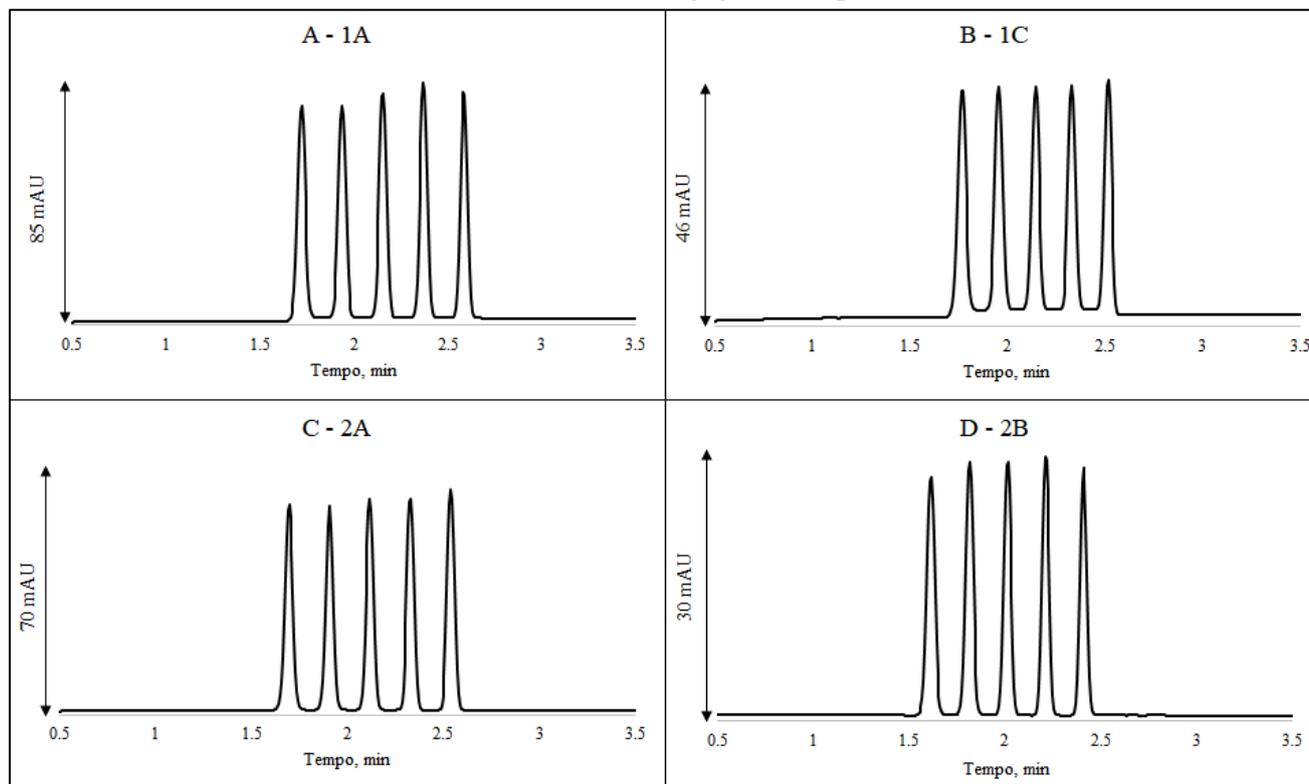
Figura 36: Eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras de LI utilizando o método de injeção pelo *outlet*.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, injeção hidrodinâmica de -25 mbar por 5 s pelo lado mais próximo ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -25 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm ($8,5 \text{ cm}$ de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo.

Fonte: Própria autora.

Figura 37: Eletroferogramas correspondentes à quantificação das amostras de LI utilizando o método de injeção múltipla.



Condições: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TRIS e 20 mmol L^{-1} de HCl (pH 8,20), cartucho mantido a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, injeção hidrodinâmica de amostra de 25 mbar por 5 s e de eletrólito de 25 mbar por 16 s, pelo lado mais distante ao detector, comprimento de onda de detecção correspondendo a 230 nm e voltagem aplicada de -20 kV . Capilar de sílica fundida revestidos com poliimida (série TSP) de 35 cm (26,5 cm de comprimento efetivo) x $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno x $375 \text{ }\mu\text{m}$ diâmetro externo. Todos os picos se referem ao I^{-} .

Fonte: Própria autora.

Tabela 15: Resultados obtidos na quantificação de I^- pelos métodos otimizados – injeção convencional, pelo *outlet* e múltipla.

Modo de injeção	LI	[I^-] %(m/m)	RSD (%)	Intervalo de confiança (95%)
Convencional	1A	4,203 ± 0,240	5,721	3,797 – 4,608
	1C	2,394 ± 0,085	3,538	2,251 – 2,537
	2A	2,496 ± 0,065	2,621	2,386 – 2,606
	2B	1,273 ± 0,028	2,199	1,226 – 1,320
Outlet	1A	4,092 ± 0,017	0,422	4,062 – 4,121
	1C	2,456 ± 0,222	9,045	2,082 – 2,831
	2A	2,901 ± 0,117	4,039	2,703 – 3,098
	2B	1,186 ± 0,034	2,838	1,129 – 1,242
Múltipla	1A	4,439 ± 0,127	2,869	4,318 – 4,561
	1C	2,903 ± 0,160	5,498	2,751 – 3,055
	2A	2,733 ± 0,066	2,406	2,670 – 2,796
	2B	1,884 ± 0,087	4,595	1,801 – 1,966

Fonte: Própria autora.

Avaliando a Tabela 15, que mostra as quantificações de I^- realizadas utilizando os três métodos otimizados, percebeu-se que os valores encontrados para os mesmos LI são semelhantes, não havendo grandes diferenças entre eles. De forma a verificar estatisticamente se havia alguma diferença significativa entre as médias obtidas nas três metodologias, foi realizada análise de variância (ANOVA a um fator), usando o *software IBM SPSS Statistics 21*, no intervalo de confiança de 95%. Como o resultado encontrado nesse teste, ou seja, o p-valor foi obtido no valor de 0,891 e esse é maior do que 0,05, concluiu-se que não houve evidência de diferença significativa entre os três métodos otimizados a 95% de confiança.

Para verificar a validade do teste realizado (ANOVA a um fator) foram verificadas as suposições normalidade, pelo teste de Shapiro – Wilk, homocedasticidade das variâncias, pelo teste de Levene e independência pelo teste de Durbin – Watson, nos resíduos. Todos foram realizados utilizando o *software IBM SPSS Statistics 21*. Esses testes mostraram os seguintes p-valores: 0,210 para normalidade, 0,932 para a homogeneidade e 2,055 para a independência. A normalidade e homogeneidade mostraram p-valores maiores do que 0,05 e a independência mostrou estar próximo de 2,0 (esse teste verifica se há autocorrelação entre os resíduos, sendo que a sua ausência indica a independência entre eles, evidenciado por valores próximos a 2).

Dessa forma, as suposições não foram violadas e o teste ANOVA a um fator foi considerado válido.

Os valores encontrados de I^- nas amostras de LI utilizando as três metodologias otimizadas não diferiram significativamente. Isso demonstrou que mesmo havendo um alargamento dos picos causado pela difusão longitudinal, resultando em maiores áreas para os métodos em que houve maior tempo de residência do analito no capilar, não houve comprometimento dos métodos, visto que as médias encontradas para eles foram estatisticamente semelhantes. Esse comportamento foi devido ao fato de todo o processo de desenvolvimento de um método em particular, desde a implementação da curva analítica até a quantificação ter submetido o analito ao mesmo fenômeno.

Quanto aos valores do RSD, com exceção da amostra 1C na injeção pelo *outlet*, que apresentou RSD de 9,045%, as outras amostras apresentaram baixo RSD, com os valores variando entre 0,422 e 5,721%.

A Tabela 15 mostra ainda que todas as amostras de LI se encontraram dentro do intervalo de confiança a 95%, determinado para cada uma.

4.8. FREQUÊNCIA ANALÍTICA DOS MÉTODOS

De forma a analisar a frequência analítica dos métodos otimizados – convencional, *outlet* e múltipla – fez-se uma comparação entre o período de tempo que cada método otimizado demandou para realizar uma corrida eletroforética. A Tabela 16 apresenta os valores correspondentes a essa comparação.

Tabela 16: Avaliação comparativa entre TAT e frequência analítica dos métodos otimizados.

Injeção	Tempo de injeção (min)	Tempo de aquisição dos dados (min)	Limpeza entre corridas (min)	Tempo total de cada corrida (min)	TAT* (min)	Número de injeções/hora
Convencional	0,08	3	5	8,08	96	7
Outlet	0,08	1	5	6,08	72	9
Múltipla	1,48	3	5	9,48	37,9	31

*Considerando a análise de quatro amostras avaliadas em triplicatas para os métodos de injeção convencional e pelo *outlet*, e em quintuplicatas para o método de injeção múltipla.

Todos correspondendo a réplicas autênticas.

Fonte: Própria autora.

A Tabela 16 mostra que o tempo total para analisar uma amostra utilizando o método otimizado de injeção convencional demandou cerca de 8,08 minutos, para a injeção pelo *outlet* demandou cerca de 6,08 minutos, enquanto que para a injeção múltipla ela durou cerca de 9,48 minutos. Porém, o diferencial dessa última consiste em realizar a análise de uma amostra em quintuplicata, enquanto os outros dois métodos correspondem a análise de uma réplica de uma amostra. Portanto, se há intenção de realizar uma triplicata, por exemplo, são necessárias mais duas corridas.

Considerando que foram analisadas quatro amostras, a sua quantificação em triplicata demandou a realização de doze corridas eletroforéticas para o método de injeção convencional e pelo *outlet*, durando cerca de 1,6 e 1,2 horas, respectivamente. Enquanto que, para a injeção múltipla o mesmo processo, em quintuplicata, foi realizado em quatro corridas eletroforéticas demandando cerca de 37,9 minutos, mostrando diminuição do tempo total de análise (TAT).

A Tabela 16 mostra ainda que em 1 hora foi possível realizar sete injeções usando a injeção convencional e nove injeções pelo método de injeção pelo *outlet*, enquanto que por injeção múltipla, foi realizado cerca de trinta e uma injeções por hora. Isso demonstra que os métodos de injeção pelo *outlet* e injeção múltipla levaram ao aumento da frequência analítica, principalmente quando usada a injeção múltipla já que esta aumentou mais de quatro vezes o número de injeções por hora em relação à injeção convencional.

Dessa forma, as propostas levantadas nesse trabalho para diminuir o TAT, injeção pelo *outlet* e múltipla, foram realmente efetivas, levando inclusive a aumento da frequência analítica,

considerando que o teste ANOVA a um fator a 95% de confiança, realizado para avaliar se havia diferença entre as médias de concentração de I^- obtidas em cada método, não apresentou indícios de diferença significativa entre elas.

5. CONCLUSÕES

Os LI de aminoácidos têm despertado interesse nos últimos anos devido às suas características como possibilidade de atuar como cátions ou ânions, biodegradabilidade e baixo custo, podendo ser utilizados como organocatalisadores em reações químicas. Dessa forma, como o sucesso do LI é dependente de sua pureza, métodos que consigam quantificá-los se tornam necessários.

Foi possível desenvolver e otimizar três métodos para análise de iodeto nessas matrizes, de modo a diminuir o tempo total de análise e obter análises rápidas. Cada método utilizou um modo de injeção de amostra distinto. Foi desenvolvida uma metodologia com injeção convencional, uma por injeção pelo *outlet* e a terceira com injeção múltipla. Todos os modos empregaram EOF normal e polaridade invertida, de maneira a migrarem em modo contraeletrosmótico. Esses métodos desenvolvidos se mostraram rápidos, sem a necessidade do uso de inversor de EOF para diminuir o tempo de corrida, o que se mostra interessante para a Química Verde, por diminuir o gasto de reagentes e a preocupação com seu descarte.

Foi possível utilizar a Quimiometria, através do emprego de planejamentos de experimentos, para otimizar o método de injeção múltipla, de forma a encontrar as condições que proporcionavam a melhor resolução entre os picos no menor tempo e com o maior número de injeções possíveis, de modo a aumentar a frequência analítica do método. Assim, chegou-se na condição que proporcionava cinco injeções consecutivas de amostras. Além disso, foi estudada a melhor forma de injeção das mesmas, determinando que seria mais interessante ser feita a injeção do mesmo tipo de amostra em uma única corrida.

Nesse trabalho, foram avaliados alguns parâmetros de mérito dos métodos otimizados, sendo eles: linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, seletividade e exatidão. O método de injeção convencional não foi avaliado, apenas, o último parâmetro, ou seja, a exatidão.

Os três métodos otimizados permitiram a realização da quantificação de iodeto nas amostras de LI. As médias encontradas foram testadas usando o teste ANOVA a um fator no nível de 95% de confiança, para determinar se havia diferença entre elas. De acordo com o resultado encontrado, concluiu-se que não havia evidência de diferença significativa entre as médias determinadas para cada método.

Nota-se ainda a importância dos métodos otimizados, visto que a metodologia mais utilizada para a determinação de iodeto como impureza de líquidos iônicos, que é o teste do nitrato de prata (teste qualitativo), não indicou a presença dessa impureza nos líquidos iônicos

analisados. Enquanto que os métodos otimizados por CZE-UV conseguiram determinar e quantificar o íon iodeto, em uma faixa de 1,186 a 4,439 % (m/m).

A injeção múltipla possibilitou trinta e uma injeções por hora, enquanto que a injeção convencional e pelo *outlet*, permitiram sete e nove injeções em uma hora, respectivamente. Isso mostra uma grande vantagem do método de injeção múltipla em relação aos outros dois métodos otimizados, já que apresentou alta frequência analítica e tempo total de análise reduzido. Uma desvantagem do modo de injeção múltipla seria a implementação do método no equipamento de CE. Assim, concluiu-se que a injeção múltipla se apresenta como um método para determinação de I^- mais interessante do que os métodos de injeção convencional e pelo *outlet*.

REFERÊNCIAS

- ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. The Use of a Short-end Injection Procedure to Achieve Improved Performance in Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, v. 43, n. 3/4, 1996.
- AMINI, A.; LÓDEN, H.; PETTERSSON, C.; ARVIDSSON, T. Principles for different modes of multiple - injection CZE. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3952 – 3958, 2008.
- ANDANSON, J. M.; MENG, X.; TRAĬKIA, M.; HUSSON, P. Quantification of the impact of water as an impurity on standard physico-chemical properties of ionic liquids. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 94, p. 169 – 176, 2016.
- BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 244 p.
- BERTHIER, D.; VARENNE, A.; GAREIL, P.; DIGNE, M.; LIENEMANN, C.; MAGNA, L.; OLIVIER-BOURBIGOU, H. Capillary electrophoresis monitoring of halide impurities in ionic liquids. **Analyst**, v. 129, p. 1257 – 1261, 2004.
- BRASIL. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 87-89.
- COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512 – 518, 1997.
- FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389 – 396, 2008.
- GLATZ, Z. Application of short-end injection procedure in CE. **Electrophoresis**, v. 34, p. 631 – 642, 2013.
- GORDON, C. M., MULDOON, M. J. Synthesis of Ionic Liquids. *In*: WASSERSCHIED, P; WELTON, T. **Ionic Liquids in Synthesis**. Weinheim: WILEY-VCH Verlags GmbH & Co. KgaA, 2008. p. 7-25.
- HIROKAWA, T.; NISHINO, M.; AOKI, N.; KISO, Y.; SAWAMOTO, Y.; YAGI, T.; AKIYAMA, J. Table of isotachophoretic indices: I. Simulated qualitative and quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3 – 10. **Journal of Chromatography**, v. 271, p. D1 – D106, 1983.
- HOOGERSTRAETE, T.V.; JAMAR, S.; WELLENS, S.; BINNEMANS, K. Determination of Halide Impurities in Ionic Liquids by Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry. **Analytical Chemistry**, Bélgica, v.86, p. 3931–3938, 2014.

INMETRO: Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos. Inmetro. Rio de Janeiro, Julho 2018.

LÓDEN, H.; PETTERSON, C.; ARVIDSSON, T.; AMINI, A. Quantitative determination of salbutamol in tablets by multiple-injection capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 181 – 185, 2008.

MANOEL, R. V. G. Desenvolvimento de métodos para determinação de cátions inorgânicos em leites, nitrito e nitrato em alface e histamina em peixes utilizando eletroforese capilar. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

McGUFFIN, V. L.; TAVARES, M. F. M. Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 152 – 164, 1997.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como variar tudo ao mesmo tempo. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Unicamp, Campinas: 2001. p. 83 – 148.

OHNO, H.; FUKUMOTO, K. Amino Acid Ionic Liquids. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 11, p. 1122 - 1129, 2007.

OLIVEIRA, M. A. L.; SOARES, D. C.; TOSTES, G. S.; GUIMARÃES, M. C.; VAZ, F. A. S. Optimization of an Alternative Methodology for Simultaneous Analysis of Nitrite and Nitrate in Water from Urban Street by Capillary Electrophoresis under Direct UV Detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 484 – 490, 2012.

PEREIRA, M. P. Estudos visando à preparação e utilização de líquidos iônicos, derivados do glicerol e aminoácidos, como amino catalisadores. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

PEREIRA, M. P.; MARTINS, R. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; BOMBONATO, F. I. Amino acid ionic liquids as catalysts in a solvent free Morita – Baylis - Hillman reaction. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 8, p. 23903 – 23913, 2018.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268 – 277, 1996.

POOLE, C. F. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. **Journal of Chromatography A**. v. 1037, p. 49-82, 2004.

PORTER, J. M.; DREYER, C. B.; BICKNASE, D.; VYAS, S.; MAUPIN, C. M.; POSHUSTA, J.; MARTIN, J. Optical measurements of impurities in room-temperature ionic liquids. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**. v. 133, p. 300-310, 2014.

PRADO, T. L. A.; PORTO, B. L. S.; OLIVEIRA, M. A. L. Method optimization for trans fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation. **Analytical Methods**, v. 9, p. 958 – 965, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

SATO, R. T. Otimização de metodologia alternativa para determinação de ácidos graxos livres, em óleos vegetais, por eletroforese capilar. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/4316>>. Acesso em: 02 ago. 2018.

SEDDON, K.; STARK, A.; TORRES, M. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 2275 – 2287, 2000.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologias para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740 – 744, 2007.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos Básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**. V. 4, n. 4, p. 287 – 297. 2012.

STARK, A.; BEHREND, P.; BRAUN, O.; MÜLLER, A.; RANKE, J.; ONDRUSCHKA, B.; JASTORFF, B. Purity specification methods for ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 10, p. 1152 – 1161, 2008.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 493 – 511, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493 – 511, 1997.

THOMPSON M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for single – laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

VITALI, L.; HORST, B. L.; HELLER, M.; FÁVERE, V. T.; MICKE, G. A. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations – Applications in iodide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4586 – 4591, 2011.