

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DOUTORADO EM QUÍMICA

Fernando Antonio Simas Vaz

**PREPARAÇÃO DE NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS PARA USO
EM ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR**

Juiz de Fora
2011

Fernando Antonio Simas Vaz

**PREPARAÇÃO DE NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS PARA USO
EM ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da
Universidade Federal de Juiz de Fora
como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2011

Este trabalho é dedicado às três meninas, sem as quais nada seria possível:

Telma, exemplar guerreira de batalha diária, que atende como mãe, irmã, avó, professora, amiga... Sua história merece ser lembrada;

Maysa, sinônimo de amor, apoio, prontidão, saúde emocional... Existe um centro de gravidade nela, que atua sobre mim;

Linda, que me ajudou muito com sua terapia diária, da qual pude aproveitar bem. Muito provavelmente não faz ideia do que significa tudo isso, mas sua importância foi gigantesca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço fortemente a DEUS por me conceder todos os atributos necessários para chegar ate aqui.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Marcone* pelo apoio desde minha monitoria em Química Analítica na graduação, até o Doutorado. Grande parte deste crescimento profissional eu devo a ele.

Aos meus pais *Telma* e *Ruy* pelos bons momentos. Cada etapa teve sua importância e será lembrada sempre.

Ao *Eduardo* pelos ensinamentos sinceros e honestos de um irmão mais experiente. Sua filosofia de vida permeia meus pensamentos.

Ao *Cledson*, grande *Vintagenesis*, pela amizade e respeito raros. Este me ajudou a incorporar a guitarra pelas veias.

À *Vivian* pela amizade e pelos sinceros conselhos.

Aos colaboradores *Prof^a. Dr^a. Renata Diniz*, *Prof. Dr. José Paulo*, *Prof. Dr. Sidney Ribeiro*, *César Polachini*, *Tiago Mendes*, *Ricardo Araújo* e demais pessoas que contribuíram de alguma forma durante este trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho, desde os recentes aos de longas datas, dos laboratórios do Departamento de Química e do *Grupo de Química Analítica e Quimiometria*, incluindo *Brenda* e *Patrícia* pela confiança nas aulas de violão.

À minha avó *Alda*, tia *Dorinha* e padrinho *Wilmar*, que agora estão mais próximos de Deus; às madrinhas tia *Eduarda* e tia *do Carmo*, tia *Hilda* e demais familiares, incluindo os lindos sobrinhos afilhados *Davi* e *Thiago*, novos integrantes da família.

Aos familiares da *Maysa*: *Marco Polo*, *Fátima* e *Allan* pela confiança.

À secretária da Pós-Graduação em Química *Simone*, pela sua prontidão, disposição e eficiência em resolver as coisas.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Departamento de Química e à Coordenação da Pós-Graduação em Química.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

“(...) - Minha pobreza tal é
que não tenho presente melhor:
trago este papel de jornal
para lhe servir de cobertor
cobrindo-se assim de letras
vai um dia ser doutor. (...)”

(João Cabral de Melo Neto, Morte e Vida Severina)

RESUMO

Nesta tese é descrita a preparação de novas fases estacionárias monolíticas (FEM) polimerizadas por fotoiniciação, através do método sol-gel, em capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato, para aplicação em eletrocromatografia capilar (ECC). Dentre as principais técnicas de separação em Química Analítica, a ECC tem despertado grande interesse no meio acadêmico, pelo fato desta combinar as vantagens tanto da cromatografia a líquido de alta eficiência quanto da eletroforese capilar. Grande parte do desenvolvimento da ECC se deve ao uso das FEM, as quais são semelhantemente aplicadas em outras técnicas cromatográficas. Ao contrário do revestimento de poliimida, amplamente empregado, o revestimento de poliacrilato, transparente acima de 370 nm e à luz visível, facilita a visualização da solução de sol no interior do capilar, o que permite controlar a injeção desta e de outras soluções, bem como observar a formação *in situ* da FEM. Além disso, é possível que seja feita a polimerização fotoiniciada sem a necessidade de remoção do revestimento polimérico que protege a coluna. O objetivo central deste trabalho foi entender e aprimorar o processo de fabricação das FEM para aplicações em ECC. Para isso, foram feitas modificações da câmara fotorreatora *homemade* utilizada para a polimerização das FEM, como uma correção na faixa espectral de trabalho de 350 a 700 nm para 350 a 400 nm; e instalação de dispositivos de segurança tanto para o operador quanto para o sistema elétrico. Para que fosse alcançado um melhor controle de injeção de fases líquidas no interior de tubos com dimensões capilares, a construção de um dispositivo de alta pressurização (DAP) que forneceu, além da pressão, grande precisão foi indispensável. O DAP, além de simples, teve ótima relação custo-benefício, comparado a modelos comerciais. O preparo das FEM foi otimizado mediante auxílio de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , onde se buscou analisar propriedades eletrocromatográficas frente diferentes proporções dos reagentes empregados e tempo de incidência de luz ultravioleta (UV). Este último fator não apresentou significância e foi desconsiderado, de forma que o planejamento fosse devidamente reduzido para um planejamento fatorial completo 2^3 , o que possibilitou uma análise mais apurada dos efeitos significativos. O fator mais influente foi a proporção de porogênio (tolueno), sendo que a melhor condição obtida foi utilizando 80,0 % (v/v) de solução porogênica; 3,5 % (m/m) de

fotoiniciador óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoi)-fenilfosfino (Irgacure 819); razão molar água/ metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPTMS) igual a 4 e tempo de incidência de luz UV de 10 minutos. As características morfológicas, espectroscópicas e porosidade foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura, infravermelho e porosimetria por adsorção de nitrogênio, respectivamente. As FEM foram testadas em ECC pela separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno) e alquilbenzenos (etilbenzeno, propilbenzeno, butilbenzeno e hexilbenzeno), todos compostos eletricamente neutros, diluídos em metanol (1 mmol L^{-1} cada), utilizando tiouréia como marcador de fluxo. Como fase móvel foi utilizada a mistura de acetato de amônio $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) e acetonitrila (40 %). A voltagem aplicada foi -20 kV; a temperatura de análise foi $20 \text{ }^\circ\text{C}$; a injeção dos analitos foi -25 mbar por 5 s; e a detecção no UV foram nos comprimentos de onda de 220 nm e 250 nm. Foi utilizado o modo ECC-rápida, que consiste na inversão do sentido de análise e injeção de padrões pela extremidade curta do capilar. Este modo se mostrou muito mais rápido, repetitivo e eficiente do que o modo normal, fornecendo em pouco mais de 12 minutos de análise, mais de 51400 pratos/m de coluna e desvios padrão relativos em tempo de migração/retenção entre 0,09 e 3,3 % e em área de pico relativa entre 0,14 e 1,6 %. Os perfis de separação em ECC corroboraram com os resultados de porosidade e morfologia obtidos.

Palavras-chave: Fase estacionária monolítica; Eletrocromatografia Capilar; Eletroforese capilar; Câmara reatora fotoquímica; Fotopolimerização; Capilar de sílica revestido com poliacrilato.

ABSTRACT

This thesis describes the preparation of new monolithic stationary phases (MSP) polymerized by photoinitiation through sol-gel approach in polyacrylate-coated fused silica capillary, for application in capillary electrochromatography (CEC). CEC has been concentrated much attention among the major separation techniques in analytical chemistry because it combines the advantages of both high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Much of the CEC development is due to the use of MSP, which are similarly applied to other chromatographic techniques. Unlike polyimide-coating, widely used, the polyacrylate-coating, which is transparent above 370 nm and visible, enables the visualization of the sol solution within the capillary, allowing one to control the injection of sol and other solutions, in addition to observe the *in situ* formation of the MSP. Furthermore, it is possible to perform the photoinitiated polymerization without removing this polymeric coating that protects the capillary. The main purpose of this work was to comprehend and improve the fabrication process of MSP, for CEC applications. For this, some changes were set in the homemade photo reactor chamber, used for the MSP polymerization, like correction in the work range from 350 – 700 nm to 350 – 400 nm; and installation of security devices for both operator and electric system safeties. For better control of liquid phases injection within tubes with capillary dimensions, the build of a high-pressure device (HPD) that provides a great precision, in addition to the high-pressure, was essential. HPD is simpler and relatively cheaper when compared to commercial models. The preparation of the MSP has been optimized through assistance of a 2^{4-1} fractional factorial design, with the intention to investigate electrochromatographic properties with different amounts of employed reagents and ultraviolet (UV) light incidence time. The later factor did not show significance and was unconsidered, making the design possible to be reduced to a 2^3 complete factorial design, which allowed analyzing the significant effects accurately. The most influent factor was the porogen (toluene) proportion, and the best condition was obtained using 80.0 % (v/v) of porogenic solution; 3.5 % of photoinitiator bis(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphine oxide (Irgacure 819); water to metacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMS) molar ratio equal to 4 and 10 minutes of UV light incidence time. The MSP morphological, spectroscopic characteristics and

porosity were evaluated through scanning electron microscopy, infrared spectroscopy and nitrogen adsorption porosimetry, respectively. The MSP has been tested in CEC through the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene and anthracene) and alkylbenzenes (ethylbenzene, propylbenzene, butylbenzene and hexylbenzene), which are electrically neutral compounds, after dilution in methanol (1 mmol L⁻¹ each), using thiourea as the flow marker. As mobile phase a mixture of ammonium acetate 16.7 mmol L⁻¹ at pH 7.0 (60.0 %) and acetonitrile (40.0 %) was used. The applied voltage was -20 kV, the temperature of analysis was 20 °C, the analyte injection was -25 mbar for 5 s, and UV detection was done at 220 and 250 nm. A fast-CEC mode, which consists to reverse the analysis direction and to introduce the analyte by capillary short-end injection, was performed. This mode was much more fast, repetitive and efficient than the normal one, providing in a little more than 12 minutes over than 51400 plates per meter of column and relative standard deviations ranging from 0.09 to 3.3 % for migration/retention time and from 0.14 to 1.6 % for relative peak area. The separation profiles in CEC corroborate with the porosity and morphology results.

Keywords: Monolithic stationary phase; Capillary electrochromatography; Capillary electrophoresis; Photochemical reactor chamber; Photopolymerization; Polyacrylate-coated fused silica capillary.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema básico da EC mostrando: os reservatórios de entrada de eletrólito (A), de amostra (B) e de saída de eletrólito/amostra (C); a detecção (D); um sistema de fornecimento de alta voltagem (E), aplicada ao eletrólito através de eletrodos de platina (F); e o capilar (G). O diâmetro do capilar foi ampliado desproporcionalmente para facilitar a visualização dos analitos no seu interior.....29
- Figura 2. Modelo para a interface capilar-eletrólito. As setas vermelhas indicam o vetor do FEO e as azuis indicam as forças eletrostáticas. Abaixo do plano de cisalhamento situa-se a camada móvel e acima do plano, a camada fixa.....33
- Figura 3. Representação dos perfis dos fluxos eletroosmótico e hidrodinâmico.34
- Figura 4. Ilustração de uma corrida de ECC, mostrando alguns componentes instrumentais, a FE e FM no interior do capilar e os constituintes da amostra introduzida.....38
- Figura 5. Histograma do número de publicações anuais envolvendo a ECC entre 1990 e 2011. Termo de pesquisa: “*Capillary Electrochromatography*”. Software de pesquisas de referências *Scifinder Scholar 2007*.....39
- Figura 6. Histograma do número de patentes anuais envolvendo a ECC entre 1994 e 2011. Termo de pesquisa: “*Capillary Electrochromatography*”, refinado para patentes.....40
- Figura 7. Posições da FE no modo *ECC-rápida* à esquerda e do modo convencional à direita.....42
- Figura 8. Parte do layout do software Chemstation 6.0. As setas indicam as diferenças quando se trabalha nos modos CEC ou CE+p. Quando estes modos não são utilizados, o cilindro verde, que representa a pressão externa, se torna ausente.....43

Figura 9. Representação de três tipos de colunas usadas em ECC: A) fase estacionária particulada esférica; B) fase estacionária tubular aberta; e C) fase estacionária monolítica.	44
Figura 10. Etapas da preparação de uma FEPE. A) obtenção da primeira fritas; B) preenchimento do capilar com as partículas esféricas (geralmente os diâmetros são menos regulares do que mostrado); C) obtenção da 2ª fritas; D) obtenção da janela de detecção.	46
Figura 11. Etapas da preparação de uma coluna tubular aberta, mostrando A) o capilar pré-tratado; B) o preenchimento do capilar com o sol; C) a camada de FE ligada à superfície do capilar com posterior pós-tratamento e D) a obtenção da janela de detecção.	48
Figura 12. Histogramas do número de publicações anuais envolvendo as FEM, entre 1990 e 2011. Termos de pesquisa: “ <i>Capillary Electrochromatography</i> ”, refinada com “ <i>Monolithic columns</i> ” para publicações envolvendo FEM para ECC; “ <i>Monolithic columns</i> ” subtraído os valores de FEM para ECC, para publicações envolvendo FEM para outras aplicações.	50
Figura 13. Fotografias de FEM obtidas por MEV (A e B) (GUSEV; HUANG e HORVÁTH, 1999; SMITH, 2002) e por MET (C) (AMATANI <i>et al.</i> , 2005).	51
Figura 14. Etapas da preparação de uma coluna monolítica, mostrando A) o capilar preenchido com um sol; B) a polimerização foto iniciada <i>in situ</i> , formando-se o gel; C) a remoção do solvente utilizado como porogênio com posterior pós-tratamento e D) a obtenção da janela de detecção.	53
Figura 15. Estruturas e nomes dos dezesseis HPA prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2011).	59
Figura 16. Fluxograma do processo de preparação de uma coluna monolítica. Os caminhos em pontilhado representam processos que não foram realizados.	67
Figura 17. Estrutura química do MPTMS.	69
Figura 18. Reações genéricas da catálise ácida, adaptado de Ribeiro (NASSAR; MESSADDEQ e RIBEIRO, 2002), onde $\text{Si}(\text{OR})_3\text{M}$ é o MPTMS.	69

Figura 19. A: dímero e B: trímero, formados pela condensação de duas e três moléculas de MPTMS hidrolisadas, respectivamente.	70
Figura 20. Fotólise do Irgacure 819 e iniciação da polimerização de um precursor polimérico genérico.	71
Figura 21. A: dímero de MPTMS; B: representação resumida do dímero (o grupo Z representa todos os átomos de uma carbonila à outra) e C: estrutura simplificada do polímero. As ligações em negrito evidenciam um dímero contendo um radical disponível para formar mais uma ligação. Para visualizar a formação do polímero com os trímeros, basta considerar a direção perpendicular ao plano da Figura.	72
Figura 22. FEM em capilar de 100 µm d.i. revestido com poliacrilato, pronta para uso em ECC.	73
Figura 23. Reator fotoquímico com as portas frontal e superior abertas, mostrando as lâmpadas e o espaço interno disponível para amostras.	75
Figura 24. Esquema mostrando diferentes ângulos de incidência da luz sob a solução fotopolimerizável na seção transversal do capilar.	76
Figura 25. Espectros de emissão de uma lâmpada negra, de uma lâmpada branca e das duas lâmpadas ligadas juntas (soma) no interior da câmara.	78
Figura 26. Espectros de absorbância do Irgacure 819 (0.03 % m/v, dissolvido em tolueno); de transmitância de um filme de poliacrilato (0,3 mm de espessura) e de emissão (escala não mostrada) de uma lâmpada fluorescente negra.	79
Figura 27. Esquema do circuito de alimentação elétrica utilizado na montagem da câmara. F: fase; N: neutro; T: terra; F1: fusível; MS: micro switch; L1-6: lâmpadas fluorescentes negras.	80
Figura 28. Esquema de funcionamento do micro switch. À esquerda, a porta frontal está fechada e o circuito elétrico está sendo alimentado. À direita, com a porta aberta, o circuito se abre, interrompendo a alimentação.	81
Figura 29. DAP para injeção de líquidos em tubos capilares. O parafuso lateral (parte inferior da foto) funciona firmando a proteção da seringa.	83

Figura 30. Conexões PEEK. Uniões True-ZDV para micro luvas (P-720); adaptadores do tipo Luer-to-Microtight (P-662); conectores padrão do tipo Microtight (F-125) e conectores para tubos de 360 µm d.e., Blue PEEK (F-124S).....	84
Figura 31. Seringa Gastight de 25 µL com agulha fixa A) acoplada ao capilar e B) desacoplada, mostrando os detalhes da conexão P-720.	85
Figura 32. Seringa Gastight 50 µL do tipo luer-lock A) acoplada ao capilar e B) desacoplada, mostrando os detalhes da conexão P-662.	85
Figura 33. Gráfico da vazão de água em função do número de voltas do parafuso de avanço do DAP com uma seringa comercial de 1 mL. Regressão linear: $m = 0,0445 \cdot N - 0,0180$. $R^2 = 0,9994$. Teste F: 0,70, para $F_{49;9} = 2,81$, (nível de 95 %).	87
Figura 34. Gráfico da vazão de água em função do número de voltas do parafuso de avanço do DAP com seringa Gastight de 25 µL. Regressão linear: $m = 0,4893 \cdot N - 0,5267$. $R^2 = 0,9933$. Teste F: 0,48, para $F_{3;10} = 3,71$, (nível de 95 %).	88
Figura 35. DAP-2 para injeção controlada com capacidade para duas seringas, com a plataforma de avanço nas posições A) recuada, B) intermediária e C), avançada.....	90
Figura 36. Gráfico da vazão de água em função do número de voltas do parafuso de avanço do DAP-2 com uma seringa Gastight de 25 µL. Regressão linear: $m = 0,524 \cdot N + 0,617$. $R^2 = 0,9916$. Teste F: 0,18, para $F_{2,8} = 4,46$, (nível de 95 %).	91
Figura 37. Eletrocromatogramas referentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} , obtidos com FEM de 8,0 cm em capilares de 36 cm (27,5 cm efetivos) revestidos com poliacrilato. Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L ⁻¹ cada. FM: solução de NH ₄ Ac 16,7 mmol L ⁻¹ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); voltagem: -20 kV; temperatura: 20 °C; injeção: 25 mbar x 5 s; detecção: 220 nm (linha preta) e 250 nm (linha cinza).....	96

- Figura 38. Eletrocromatograma referente à condição 3 do planejamento fatorial 2^{4-1} em diferentes comprimentos de onda e os espectros de cada pico. FEM de 8,0 cm em capilares de 36 cm (27,5 cm efetivos). Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); voltagem: -20 kV; temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: 25 mbar x 5 s.98
- Figura 39. Espectros de absorção molecular no UV dos compostos em ordem de eluição: tiouréia ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), naftaleno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), acenafteno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), fluoreno ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), fenantreno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e antraceno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), diluídos em MeOH.....99
- Figura 40. Gráfico da vazão de MeOH pela coluna 3 em função do tempo de aplicação de pressão (5 bar). Regressão linear: $m_{\text{MeOH}} = 0,0014 \cdot t + 2,2441$ (massa do reservatório). $R^2 = 0,9990$ 102
- Figura 41. Interpretação geométrica das respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para números de picos separados. O primeiro número das legendas se refere ao experimento, enquanto o segundo é a resposta. A origem do sistema cartesiano (0,0,0) está no centro do cubo. As coordenadas dos vértices são os níveis codificados da Tabela 5..... 106
- Figura 42. Interpretação geométrica das respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para vazão de MeOH (mg/min). O primeiro algarismo das legendas se refere ao experimento, enquanto o segundo é a resposta. 107
- Figura 43. Interpretação geométrica das respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para o tempo de análise (tempo de migração/retenção do antraceno, em minutos). O primeiro algarismo das legendas se refere ao experimento, enquanto o segundo é a resposta..... 108
- Figura 44. Eletrocromatogramas obtidos nos modos ECC-rápida (linha preta) e normal (linha cinza). Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. Condições: temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção: 220 nm; FEM: 8,0 cm de comprimento; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de 100 μm d.i.; FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH

7,0 (60 %) / ACN (40%); Modo ECC-rápida: voltagem: -20 kV; injeção: -25 mbar x 3 s; Modo normal: voltagem: +20 kV; injeção: +25 mbar x 3 s. ... 110

Figura 45. Eletrocromatogramas obtidos numa mesma coluna em triplicatas (A1, A2 e A3). Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L⁻¹ cada. Condições: temperatura: 20 °C; detecção: vide legenda; FEM: 8,0 cm de comprimento; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de 100 µm d.i.; FM: solução de NH₄Ac 16,7 mmol L⁻¹ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); Modo ECC-rápida: voltagem: -20 kV; injeção: -25 mbar x 3 s..... 111

Figura 46. Eletrocromatogramas obtidos em A) coluna de 8 cm de comprimento e B) coluna de 7 cm. Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L⁻¹ cada. (*) pico desconhecido. Condições: temperatura: 20 °C; detecção: vide legenda; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de 100 µm d.i.; FM: solução de NH₄Ac 16,7 mmol L⁻¹ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); Modo ECC-rápida: voltagem: -20 kV; injeção: -25 mbar x 3 s..... 114

Figura 47. Eletrocromatogramas obtidos com diferentes voltagens aplicadas, no modo ECC-rápida: A) -30 kV; B) -20 kV; e C) -10 kV, em FEM de 8 cm de comprimento. Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L⁻¹ cada. Condições: temperatura: 20 °C; detecção: vide legenda; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de 100 µm d.i.; FM: solução de NH₄Ac 16,7 mmol L⁻¹ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%). Injeção: -25 mbar x 3 s..... 115

Figura 48. Eletrocromatogramas dos alquilbenzenos: A: etilbenzeno; B: propilbenzeno; C: butilbenzeno e D: mistura dos padrões. FM: solução de NH₄Ac 16,7 mmol L⁻¹ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%). Modo de corrida por ECC-rápida. Voltagem: -20 kV; temperatura 20 °C; injeção: -25 mbar por 5 s. FEM de 8,0 cm. Detecção: 210 nm. Ordem de eluição: etilbenzeno (1), propilbenzeno (2) e butilbenzeno (3)..... 116

Figura 49. Eletrocromatogramas referentes ao planejamento fatorial 3^2 , obtidos com FEM de 8,0 cm em capilares de 36 cm (27,5 cm efetivos). Ordem de eluição: etilbenzeno (1), propilbenzeno (2), butilbenzeno (3) e hexilbenzeno (4), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. FM: vide Tabela 10. Voltagem: -20 kV; temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: 25 mbar x 5 s; detecção: 210 nm.	119
Figura 50. Eletrocromatogramas de mistura dos padrões de alquilbenzenos. FEM de 8,0 cm. Capilar de $100 \text{ }\mu\text{m}$ d.i. por 36 cm. Detecção: 210 nm. Modo de corrida ECC-rápida. FM (9): solução de acetato de amônio a 20 mmolL^{-1} (50%) com ACN (50%). 9A: voltagem: -20 kV; 9B: voltagem: -10 kV. Injeção: 30 mbar por 5 s. Ordem de eluição: etilbenzeno (1), propilbenzeno (2), butilbenzeno (3) e hexilbenzeno (4).....	120
Figura 51. A) Suporte para amostras do MEV, mostrando a fita de dupla-face (preta) e três capilares presos a ela; B) Cartucho onde estão posicionados os suportes.....	121
Figura 52. Imagens de MEV da FEM 1. Nas legendas pretas é possível verificar a ampliação, a escala de distância, a voltagem utilizada, o modo de detecção (LEI ou SEI) e a distância de trabalho (WD, do inglês, <i>working distance</i>).....	123
Figura 53. Imagens de MEV da FEM 2.....	124
Figura 54. Imagens de MEV da FEM 3.....	125
Figura 55. Imagens mais detalhadas de MEV da FEM 3. O quadrado vermelho indica a região de ampliação da imagem seguinte. As imagens C e D foram obtidas na mesma região do monólito com os modos de detecção LEI e SEI, respectivamente.	126
Figura 56. Imagens de MEV da FEM 4.....	127
Figura 57. Imagens de MEV da FEM 5.....	128
Figura 58. Imagens de MEV da FEM 6. A imperfeição observada na interface sílica – monólito (no centro da imagem inferior) é uma distorção da imagem apenas.....	129
Figura 59. Imagens de MEV da FEM 7.....	130

Figura 60. Imagens de MEV da FEM 8.....	131
Figura 61. Imagens de MEV do monólito da condição 3 sintetizado em ambiente aberto. Ampliações: A) 100 x; B) 500 x C) 1000 x; D) 5000 x; E) 10000 x e F) 20000 x.	132
Figura 62. Espectros de absorção no infravermelho para os reagentes MPTMS e Irgacure 819 e o polímero obtido. As setas no espectro do MPTMS indicam bandas ausentes no espectro do polímero e vice-versa. Para melhor visualização, os espectros do Irgacure 819 e do MPTMS foram deslocados 40 e 100 unidades acima no eixo-y, respectivamente.....	134
Figura 63. Isotermas de adsorção/desorção para o monólito (condição 3).....	135
Figura 64. Gráfico de BET para determinação da área superficial específica do monólito.....	136
Figura 65. Fotografias digitais de um capilar contendo uma FEM. À esquerda, é possível observar a ampliação da imagem do capilar (aproximadamente três vezes) e à direita, o capilar numa região onde termina o monólito..	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de HPA encontrados em amostras ambientais e biológicas (NETTO <i>et al.</i> , 2000).....	58
Tabela 2. Fatores e níveis do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	93
Tabela 3. Matriz de planejamento com níveis codificados.	94
Tabela 4. Valores experimentais correspondentes aos níveis do planejamento 2^{4-1} .95	
Tabela 5. Matriz codificada do planejamento 2^3 , derivada do planejamento 2^{4-1}	100
Tabela 6. Massas (g) correspondentes à vazão de MeOH pelas colunas em função do tempo de aplicação da pressão.....	101
Tabela 7. Médias, efeitos principais e efeitos de interação de 2ª e 3ª ordens do planejamento fatorial 2^3	104
Tabela 8. Médias e desvio padrão relativo (DPR) para o tempo de migração/retenção (min), área relativa (A_r , valor da área do pico padrão i sobre valor da área da tiouréia) e número de pratos por metro de FEM (N/m) dos picos dos padrões de HPA e tiouréia, obtidos em triplicata, com três FEM distintas (replicatas autênticas).	112
Tabela 9. Médias e DPR para o tempo de migração/retenção (min), área relativa (A_r , valor da área do pico i sobre valor da área da tiouréia) e número de pratos (N) dos picos dos padrões de HPA e tiouréia, obtidos com as três FEM da Tabela 8.....	113
Tabela 10. Matriz de planejamento com níveis codificados 3^2	117
Tabela 11. Resultados relativos à medida de área superficial do monólito.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% m/m	Porcentagem massa por massa
% v/v	Porcentagem volume por volume
μA	Micro ampere
μ_{ef}	Mobilidade eletroforética
μ_{feo}	Mobilidade do fluxo eletroosmótico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ACN	Acetonitrila
A_r	Área relativa
b_0	Média
BET	Método de Brunauer, Emmett e Teller
b_n	Efeito n
C	Constante relacionada com a energia de adsorção da monocamada
CEM	Cromatografia eletrocinética micelar
CG	Cromatografia a gás
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas
CL	Cromatografia a líquido
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas
cm	Centímetro
d.e.	Diâmetro externo do capilar
d.i.	Diâmetro interno do capilar
DAD	Detector por arranjo de diodos
DAP	Dispositivo de alta pressurização
DPR	Desvio padrão relativo
E	Campo elétrico
EC	Eletroforese capilar
ECC	Eletrocromatografia capilar
ECZ	Eletroforese capilar de zona

EVA	Etil vinil acetato
F	Falta de ajuste
F _{aq}	Fase aquosa
FE	Fase estacionária
FEM	Fase estacionária monolítica
FEO	Fluxo eletrosmótico
FEPE	Fase estacionária particulada esférica
FETA	Fase estacionária tubular aberta
FM	Fase móvel
F _{org}	Fase orgânica
g	Gramas
HCl	Ácido clorídrico
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Irgacure 819	Óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fenilfosfino
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kelvin
<i>k</i>	Número de fatores
kg	Quilograma
kV	Quilovolt
<i>L</i>	Comprimento total do capilar
LEI	<i>Lower Secondary Electron Detector</i>
m ³	Metro cúbico
mAu	Mili unidades de absorvância
MDF	<i>Medium density fiberboard</i>
MeOH	Metanol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPTMS	Metacriloxipropiltrimetoxisilano

n	número de mols
N	Número de pratos
N_2	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NH_4Ac	Acetato de amônio
nL	Nanolitro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
P	Pressão absoluta de trabalho
P^0	Pressão de saturação
PEEK	<i>Poly(ether-ether-ketone)</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
q	Carga do soluto
r	Raio do soluto
R	Constante universal dos gases
R^2	Coeficiente de correlação
RPM	Rotações por minuto
s	Segundo
SEI	<i>Upper Secondary Electron Detector</i>
Si-O ⁻	Grupo silanato
SiO ₂	Sílica
Si-OH	Grupo silanol
T	temperatura de trabalho
t_{mig}	Tempo de migração
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
V	Voltagem
V_a	Volume de gás adsorvido
v_{ef}	Velocidade eletroforética do analito
v_{feo}	Velocidade do fluxo eletroosmótico
V_m	Volume de monocamada de gás cobrindo uma superfície

V_{obs}	Velocidade aparente ou observada
W	Watts
$W_{1/2}$	Largura da base do pico à meia-altura
WD	<i>Working distance</i>
X_n	Fator n
η	Viscosidade do eletrólito

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	26
1.1	ELETROFORESE CAPILAR	28
1.1.1	Princípios básicos.....	28
1.1.2	Capilar	29
1.1.3	Introdução de amostra	30
1.1.4	Fonte de alta tensão.....	30
1.1.5	Detecção.....	31
1.1.6	Fluxo eletrosmótico.....	31
1.1.7	Mobilidade	34
1.1.8	Alternativas em EC	36
1.2	ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR.....	37
1.2.1	Modos de análise em ECC	41
1.2.2	Fases estacionárias utilizadas em ECC	43
1.2.2.1	Fase estacionária particulada esférica	44
1.2.2.2	Fase estacionária tubular aberta	46
1.3	FASE ESTACIONÁRIA MONOLÍTICA	49
1.3.1	Macro e mesoporos	50
1.3.2	Modos de obtenção dos monólitos	52
1.3.3	Vantagens das FEM	54
1.3.4	Caracterização da porosidade do monólito.....	55
1.4	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	57
1.4.1	Ocorrência dos HPA.....	57
1.4.2	Toxicidade dos HPA.....	58

1.4.3	Técnicas de análise de HPA.....	59
2.	OBJETIVOS	61
2.1	OBJETIVO GERAL.....	61
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
3.	EXPERIMENTAL.....	62
3.1	EQUIPAMENTOS.....	62
3.1.1	Infraestrutura local	62
3.1.2	Infraestrutura externa	63
3.2	CAPILARES.....	64
3.3	SERINGAS E CONEXÕES.....	65
3.4	REAGENTES E PADRÕES.....	66
3.5	PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS.....	67
3.5.1	Pré-tratamento.....	68
3.5.2	Preparo do sol	69
3.5.3	Preenchimento e obtenção do monólito	71
3.5.4	Limpeza e condicionamento do monólito.....	72
3.5.5	FEM prontas para testes e uso.....	73
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
4.1	MODIFICAÇÕES NA CÂMARA DE LUZ ULTRAVIOLETA	74
4.1.1	Descrição da câmara.....	74
4.1.2	Mudança na faixa espectral de emissão.....	77
4.1.3	Melhorias na segurança	79
4.2	CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVO DE PREENCHIMENTO A ALTA PRESSURIZAÇÃO	82
4.2.1	Conexões entre seringas e capilares.....	83
4.2.2	Teste do DAP	86

4.3	OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE COLUNAS COM AUXÍLIO DA QUIMIOMETRIA	92
4.3.1	Elaboração do planejamento 2^{4-1}	92
4.3.2	Seleção dos comprimentos de onda para detecção	97
4.3.3	Análise das respostas.....	99
4.3.4	Análise dos efeitos do planejamento 2^3	103
4.3.5	Interpretação geométrica dos efeitos.....	105
4.4	COMPORTAMENTO DAS FEM FRENTE ANÁLISE DE HPA EM ECC.....	109
4.4.1	Comparação entre modos de análise	109
4.4.2	Repetitividade	110
4.4.3	Reprodutibilidade.....	113
4.4.4	Comprimento das FEM.....	114
4.4.5	Variação da voltagem	115
4.5	COMPORTAMENTO DAS FEM FRENTE ANÁLISE DE ALQUILBENZENOS EM ECC.....	116
4.6	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MONÓLITOS.....	121
4.7	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO MONÓLITO.....	133
4.8	CARACTERIZAÇÃO DA POROSIDADE DO MONÓLITO.....	135
5.	PERSPECTIVAS	138
6.	CONCLUSÕES	140
	REFERÊNCIAS.....	144
	APÊNDICE.....	154
	ANEXO.....	178

1. INTRODUÇÃO

Uma das áreas mais importantes, com grande reconhecimento e interesse em Química Analítica é, sem dúvida, a de separação. Há mais de um século, vários cientistas no mundo vêm aperfeiçoando e implantando novas técnicas e metodologias de análise nesta direção, onde inúmeros trabalhos já foram contemplados com premiações, incluindo prêmios Nobel (TISELIUS, 1948; MARTIN e SYNGE, 1952; COLLINS; BRAGA e BONATO, 1995; CIOLA, 1998).

O principal interesse na separação de espécies químicas para a análise de uma amostra surge quando os seus constituintes apresentam propriedades e características físico-químicas (absorção ou emissão de luz, por exemplo) semelhantes frente a um sistema de detecção qualquer, e por outro lado, possuem funções distintas nesta matriz. Um exemplo disso, dentre inúmeros outros, é a análise dos ácidos orgânicos de um fluído vegetal (WANG *et al.*, 2003). Vários dos analitos presentes nesta matriz apresentam sinais semelhantes frente a um detector no ultravioleta (UV), mas possuem funções distintas nos tecidos vegetais. Para um estudo de cada uma destas funções, é necessário que os analitos sejam determinados e quantificados separadamente, justificando o uso de uma técnica de separação.

Em geral, os métodos de detecção são seletivos – atendem a uma classe de compostos – e poucos são específicos – atendem somente a uma espécie química. Por este motivo, as pesquisas em métodos de separação são tão numerosas. Os avanços nas técnicas de separação têm como apelos principais o aumento da simplicidade de operação, seletividade, repetitividade e reprodutibilidade, bem como diminuição do custo, tempo de análise e possíveis efeitos causados por interferentes ou outros constituintes presentes nas matrizes, que não sejam de interesse analítico.

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC) são duas técnicas que têm sido amplamente utilizadas para separação de compostos em meio líquido. A primeira é baseada na eluição diferenciada de compostos portadores de propriedades diferentes – dentre elas solubilidade, polaridade, peso molecular ou possibilidade de formação de complexos. O analito é transportado em uma coluna cromatográfica contendo uma fase estacionária (FE) porosa pela passagem forçada de uma fase móvel (FM) líquida, constituída por um

ou mais solventes. A FE consiste num material cujas partículas, rígidas e porosas, medem de 3 a 10 μm de diâmetro, ou num líquido – imiscível com a FM – adsorvido neste suporte particulado. FM e FE possuem hidrofobicidades diferentes, fazendo com que os analitos se particionem diferentemente pelas fases, propiciando, assim, a separação. As principais vantagens da CLAE são a seletividade, reprodutibilidade e a eficiência de separação de compostos iônicos e moleculares. Tais vantagens renderam à CLAE o status de técnica analítica de separação mais utilizada nos últimos anos do século passado (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002). Entretanto, a busca contínua por novas tecnologias tem mostrado que outros caminhos na ciência da separação também são bastante promissores.

1.1 ELETROFORESE CAPILAR

1.1.1 Princípios básicos

A segunda técnica analítica instrumental mencionada, a EC, se baseia na migração diferenciada de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis através da aplicação de um potencial elétrico da ordem de 10^4 V em um tubo capilar, contendo um sistema de eletrólito, normalmente tamponado (TAVARES, 1996). As principais vantagens da EC são o curto tempo de análise e a elevada eficiência nas separações de compostos de interesses biológico, farmacêutico, alimentício, ambiental e outros. A importância de EC tornou-se evidente com o projeto Genoma Humano, que teve como meta obter a sequência completa do DNA humano. Estas características ajudaram a tornar a EC uma técnica bastante atraente (TAVARES, 1996).

Os comandos para o controle do equipamento e aquisição de dados são feitos mediante interface com um computador. A Figura 1 ilustra o esquema simplificado da EC.

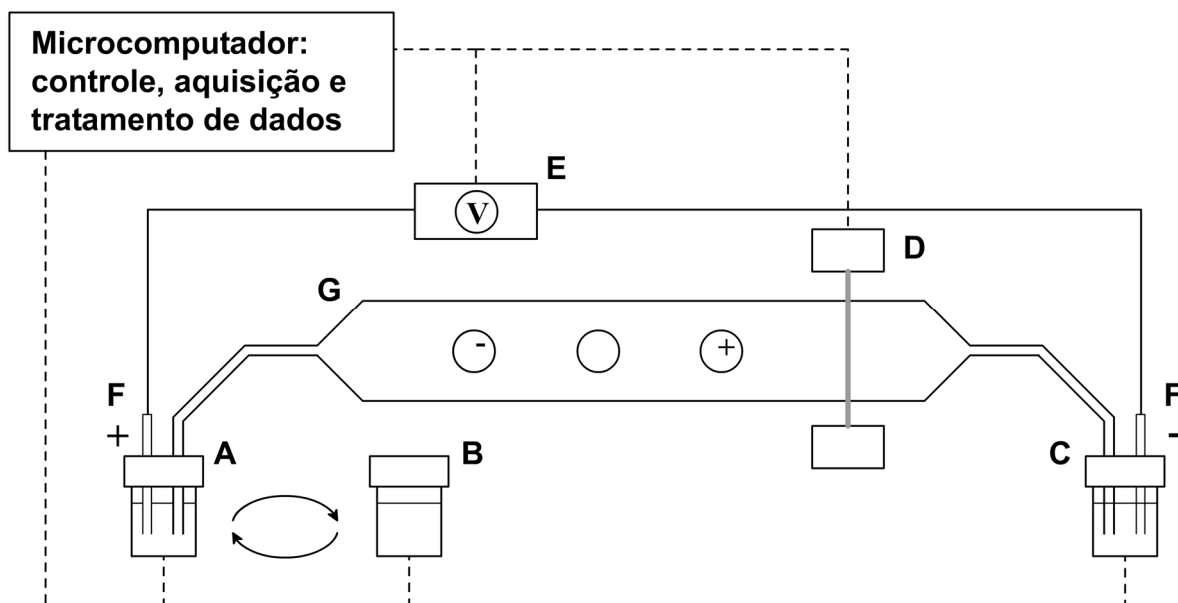


Figura 1. Esquema básico da EC mostrando: os reservatórios de entrada de eletrólito (A), de amostra (B) e de saída de eletrólito/amostra (C); a detecção (D); um sistema de fornecimento de alta voltagem (E), aplicada ao eletrólito através de eletrodos de platina (F); e o capilar (G). O diâmetro do capilar foi ampliado desproporcionalmente para facilitar a visualização dos analitos no seu interior.

1.1.2 Capilar

Em EC, a separação dos analitos é conduzida em tubos capilares (canal de migração) de sílica fundida, Pyrex ou Teflon com dimensões que podem variar de 15 a 100 μm de diâmetro interno (d.i.), 360 a 400 μm de diâmetro externo (d.e.) e 50 a 100 cm de comprimento. A geometria do capilar (elevada área superficial interna em comparação ao volume) favorece a dissipação do calor (oriunda do efeito Joule – geração de calor devido à passagem de corrente elétrica), sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente elevados (100 - 600 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos), alta resolução e curtos tempos de análise (BAKER, 1995).

Para minimizar efeitos térmicos, o cartucho onde é acomodado o capilar possui aberturas que permitem a passagem de ar termostatizado, o que permite controlar a temperatura durante as corridas. Outra configuração existente de

cartucho consiste no acondicionamento do capilar no interior de um tubo flexível de silicone por onde percola um líquido refrigerante.

1.1.3 Introdução de amostra

A amostra é introduzida no capilar contendo um eletrólito, geralmente tamponado, como uma banda de pequena espessura, por métodos eletrocinético ou hidrodinâmico. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do capilar de forma que a amostra é inserida de maneira discriminativa, ou seja, a injeção é preferencial aos constituintes que migram mais rapidamente em determinada condição. Na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão, que pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo no reservatório de solução, ou por gravidade, onde a amostra é introduzida por sifonagem. A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota homogênea da composição do soluto na amostra. O volume injetado (na ordem de nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução de eletrólito e da pressão fornecida.

1.1.4 Fonte de alta tensão

Durante uma corrida de EC, uma fonte de corrente contínua regulada de alta tensão é usada para estabelecer o campo elétrico constante ao longo do capilar, com valores típicos de voltagem no intervalo de -30 a 30 kV e corrente de -100 a 100 μ A. O operador é protegido contra o contato acidental com o sistema de alta voltagem pela inclusão deste sistema numa caixa de acrílico, equipada com chaves de segurança. A fonte de alta tensão é conectada ao sistema de análise através de eletrodos de platina, imersos aos reservatórios de eletrólito, aos quais também ficam imersas as extremidades do capilar preenchido com eletrólito. Assim, o circuito elétrico é fechado quando há aplicação da voltagem.

Quando o campo elétrico é estabelecido, cada zona (constituída de um analito) migra com velocidade constante, mas diferenciada, em função da razão

carga/raio hidrodinâmico, proporcionando assim a separação. Numa dada condição, quanto maior a carga, podendo se levar em conta o grau de ionização, e menor o raio de um constituinte iônico, incluindo sua hidratação, mais rapidamente este irá migrar.

1.1.5 Detecção

Toda a análise é monitorada por um sistema de detecção. Alguns detectores são comumente encontrados, como o espectrômetro de massas, o de condutividade, o de absorção molecular, o de luminescência, dentre outros (BAKER, 1995). O detector por arranjo de diodos (DAD) utilizado neste trabalho, por exemplo, é um sistema no qual inúmeros fotodiodos atuam simultânea e continuamente como transdutor de intensidade luminosa/carga elétrica, convertendo sinal luminoso em sinal elétrico (JR. e PASQUINI, 1997), que posteriormente é transformado em sinal analítico. Cada diodo está disposto geometricamente de forma a coletar apenas a radiação eletromagnética (difratada após a passagem pela amostra, no caso no interior do capilar) com pequena faixa de comprimentos de onda. Assim é possível coletar o espectro de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-vis), além de monitorar os compostos em um ou mais comprimentos de onda nesta região.

Quando cada analito passa por uma “janela de detecção” (comumente obtida através da remoção de uma seção de aproximadamente 0,5 cm do revestimento do capilar, posicionada a 8,5 cm da extremidade de saída), ele é flagrado pelo sistema de detecção que indica a presença de uma banda de pequena espessura (pico). Isto gera um gráfico do sinal analítico em função do tempo de migração, denominado “eletroferograma”.

1.1.6 Fluxo eletrosmótico

Uma característica importante em análises por EC é a presença de um fluxo da solução de eletrólito (geralmente no sentido introdução-deteção) denominado

fluxo eletrosmótico (FEO). Este fenômeno é fortemente relacionado às propriedades da superfície interna do capilar (WÄTZIG; KAUPP e GRAF, 2003).

No caso dos capilares de sílica fundida, a sílica (SiO_2) precisa ser funcionalizada com a passagem de uma base forte, formando, na superfície, grupos silanóis (Si-OH). Quando um eletrólito é posteriormente inserido no capilar, a superfície interna se torna negativamente carregada, devido à ionização dos silanóis a grupos silanatos (Si-O^-), se o pH do eletrólito for maior ou igual a três (BAKER, 1995).

A parede interna do capilar eletricamente carregada atrai, por forças eletrostáticas e/ou de coesão, cátions provavelmente desidratados e moléculas orientadas de água do eletrólito (adsorção específica), formando uma camada imediatamente adjacente à superfície, a *camada compacta*. Nesta camada íons hidratados também são atraídos mais fracamente (adsorção não específica). A camada compacta não tem carga positiva suficiente para neutralizar a superfície negativa do capilar. Portanto, mais cátions hidratados são atraídos, formando uma nova camada, a *camada difusa*, nas proximidades da camada compacta. Na camada difusa, a concentração de carga positiva e as forças de atração decrescem com o aumento da distância à superfície, até atingir a concentração do próprio eletrólito. Este gradiente de concentração define os limites da camada difusa. As camadas compacta e difusa formam a *dupla camada elétrica*. A Figura 2 mostra o modelo adaptado (FARIA, 2010) da interface capilar – eletrólito.

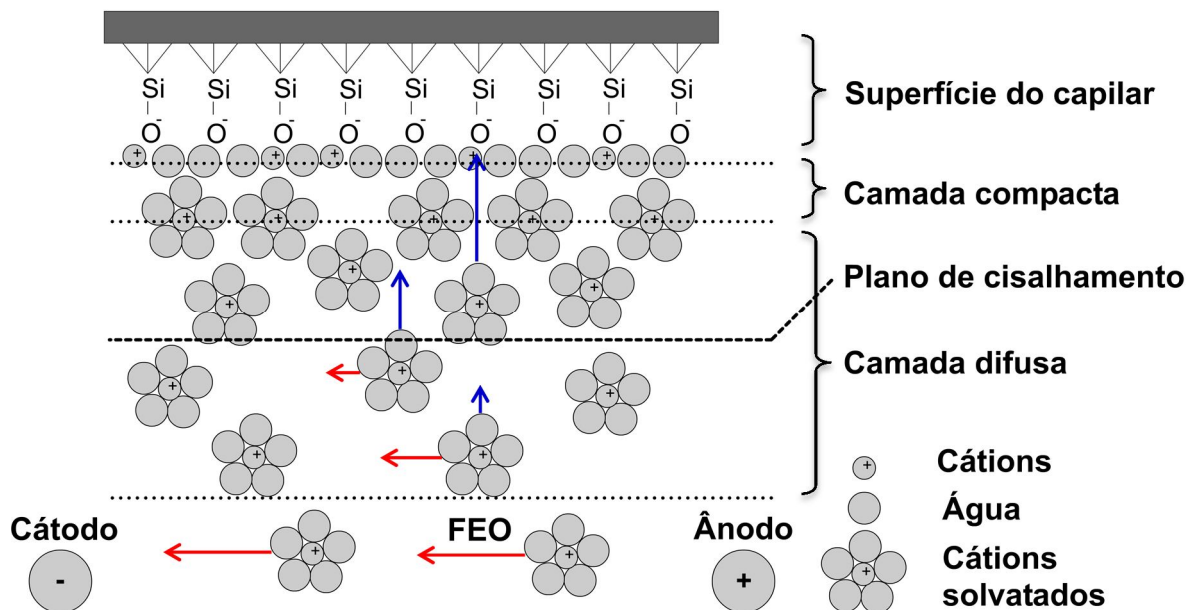


Figura 2. Modelo para a interface capilar-eletrólito. As setas vermelhas indicam o vetor do FEO e as azuis indicam as forças eletrostáticas. Abaixo do plano de cisalhamento situa-se a camada móvel e acima do plano, a camada fixa.

Quando é aplicada a diferença de potencial nas extremidades do capilar, os cátions solvatados são atraídos em sentido ao cátodo e arrastam todo o leito aquoso, induzindo o FEO. Na camada difusa, cátions mais próximos do eletrólito possuem movimento e os mais próximos da camada compacta permanecem imóveis. O limite entre os cátions móveis (camada móvel) e os fixos (camada fixa) define o plano de cisalhamento.

O FEO é caracterizado por um perfil de velocidade linear – ou plano. Isto significa que um mesmo componente vetorial é adicionado aos íons de um determinado soluto, estando estes íons mais próximos ou não da parede do capilar (desde que na camada móvel). Isto minimiza o efeito de alargamento de banda do soluto, distinguindo a EC da CLAE, que apresenta um perfil parabólico de velocidade, oriundo do fluxo induzido por pressão. A Figura 3 mostra os perfis dos fluxos em EC e CLAE:

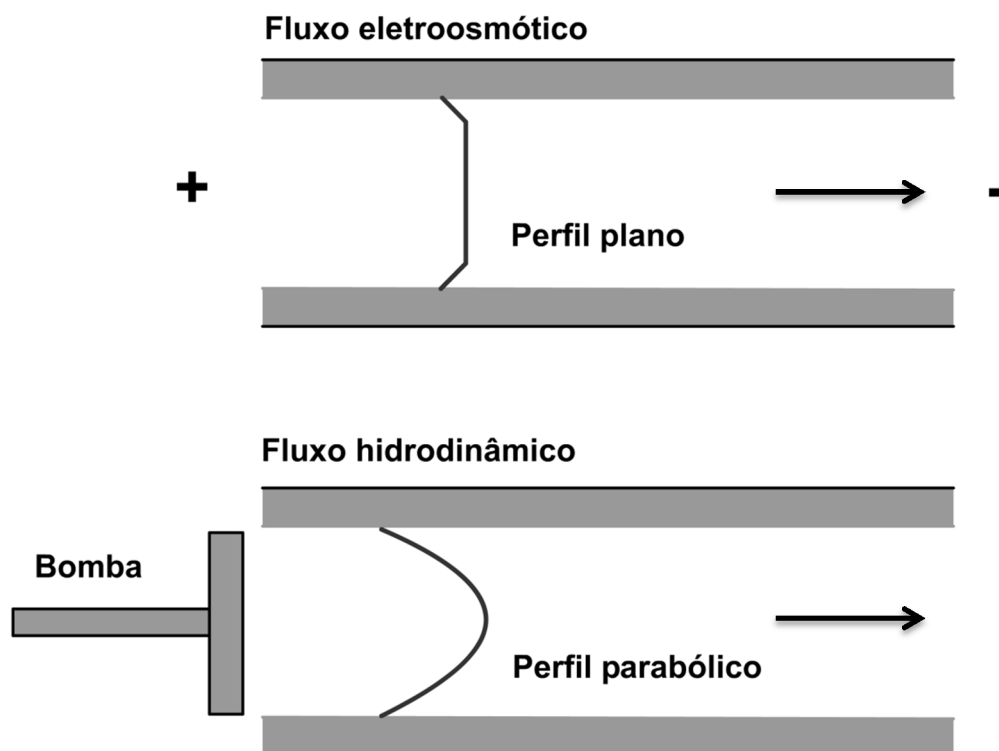


Figura 3. Representação dos perfis dos fluxos eletroosmótico e hidrodinâmico.

1.1.7 Mobilidade

A *velocidade aparente* ou *observada* de um analito v_{obs} é a soma vetorial das *velocidades efetiva* (ou eletroforética) – movimento próprio do analito – e *eletroosmótica* – movimento do FEO, ou seja:

$$\vec{V}_{obs} = \vec{V}_{ef} + \vec{V}_{feo} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: \vec{v}_{ef} é o vetor de velocidade eletroforética do analito;

\vec{v}_{feo} é o vetor de velocidade do FEO.

Uma maneira de expressar o quanto um analito se movimenta considerando-se o campo elétrico envolvido é através do conceito de mobilidade eletroforética, μ_{ef} , dada pela Equação 2:

$$\mu_{ef} = \frac{v_{ef}}{E} = \frac{v_{ef} L}{V} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: v_{ef} é a velocidade eletroforética do analito;

E é o campo elétrico aplicado;

V é a voltagem aplicada;

L é o comprimento total do capilar.

Da mesma maneira se calcula a mobilidade eletroosmótica, μ_{feo} . A relação da mobilidade eletroforética de um soluto com sua carga e seu raio é dada pela expressão:

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

Onde: q é a carga do soluto;

r é o raio do soluto;

η é a viscosidade do eletrólito.

Desta expressão, é possível entender que, em função da carga, a mobilidade eletroforética de cátions será positiva, a de ânions será negativa e a de compostos neutros será nula. Dependendo da magnitude de μ_{feo} , é possível que determinados analitos sejam arrastados no sentido injeção-deteção, mesmo que tenham tendência em migrar no sentido contrário (analitos que possuem carga de mesmo sinal do eletrodo da extremidade da saída), ou seja, se μ_{feo} for maior do que o módulo de μ_{ef} . Dessa forma, numa mesma corrida eletroforética é possível, de maneira ilustrativa, analisar ânions e cátions, com uma única banda de compostos neutros (caso houver) no centro do eletroferograma, juntamente com o sinal do fluxo, entre o grupo de cátions e o grupo de ânions.

Uma vez que todas estas características instrumentais, combinadas com as propriedades cinéticas de analitos e eletrólitos podem ser exploradas de diversas formas, existem diferentes modos de EC, tais como: eletroforese capilar de zona,

cromatografia eletrocínética micelar, isotacoforese, focalização isoelétrica, eletroforese em meio não aquoso, além da eletrocromatografia capilar, alvo deste trabalho.

1.1.8 Alternativas em EC

A limitação primária do método convencional de EC – isto é, eletroforese capilar de zona (ECZ), na qual o capilar é apenas preenchido com eletrólito, geralmente tamponado – está na impossibilidade de separação de compostos neutros entre si (TAVARES, 1997), pois todos migram juntamente com o FEO, sem serem discriminados. Uma alternativa elegante para a separação de substâncias neutras por eletroforese é a cromatografia eletrocínética micelar (CEM), introduzida por Terabe e colaboradores (TERABE *et al.*, 1984). Nesta modalidade de EC, tensoativos iônicos são adicionados ao eletrólito condutor em quantidades propícias a formarem micelas. Estas micelas formam uma fase diferenciada denominada *fase pseudo-estacionária*, que são agregados esféricos onde as caudas (apolares) das moléculas de tensoativo estão voltadas para dentro e as cabeças (polares) estão voltadas para fora, em contato com o eletrólito. Pelo fato de possuírem a superfície esférica carregada, as micelas apresentam mobilidade. Moléculas neutras de analito apresentam interações de partição diferenciadas com as fases de eletrólito (hidrofílica) e *pseudo-estacionária* (hidrofóbica), o que possibilita a separação.

Entretanto, a CEM possui algumas desvantagens que limitam a sua utilização. Em geral, é complicado se trabalhar com solutos muito apolares, pois estes são completamente retidos pela fase micelar, sem haver uma separação. Além disso, esta técnica possui limitada capacidade de picos (ou janela de separação), isto é, o intervalo de tempo entre o soluto não retido e o soluto totalmente retido pela micela. Dessa forma, todos os analitos envolvidos na separação devem ter seus tempos de migração entre a janela de separação. Outra dificuldade da CEM está na utilização de tensoativos, que podem comprometer os sistemas de detecção por espectrometria de massas (LI; FRIES e MALIK, 2004).

1.2 ELETROCROMATOGRÁFIA CAPILAR

Com o intuito de se somar as características relevantes da CLAE e EC em um formato único, surgiu, no início dos anos 90, a eletrocromatografia capilar (ECC). ECC é um termo usado para descrever o modo de separação em EC envolvendo o uso de uma coluna capilar contendo uma FE, pela qual percola a FM bombeada por eletroosmose (DITTMANN e ROZING, 1996; HILDER; SVEC e FRÉCHET, 2004). Esta associação possibilita, por exemplo, estabelecer condições de contorno para alguns efeitos indesejáveis tanto da CLAE (como a necessidade de altas pressões para bombeamento da FM), quanto da EC (maximização da separação de classes de compostos eletricamente neutros) (SVEC *et al.*, 2000; SIOUFFI, 2003; LI; FRIES e MALIK, 2004; VÉGVÁRI, 2005; FARIA *et al.*, 2006). Uma vez que compostos neutros possuem $\mu_{ef} = 0$, o que justifica as diferentes velocidades de migração entre eles são as suas características de partição entre FE e FM. A Figura 4 mostra o esquema simplificado da ECC. Diferentes moléculas neutras (representadas em amarelo) podem migrar separadamente enquanto percolam pela FE. A parte inferior representa a aquisição de dados através do microcomputador, oriunda do DAD. A passagem de um composto pelo DAD é evidenciada pelo seu espectro de absorção molecular dado em tempo real. No decorrer da análise, o eletrocromatograma vai sendo registrado a partir de um ou mais comprimentos de onda selecionados.

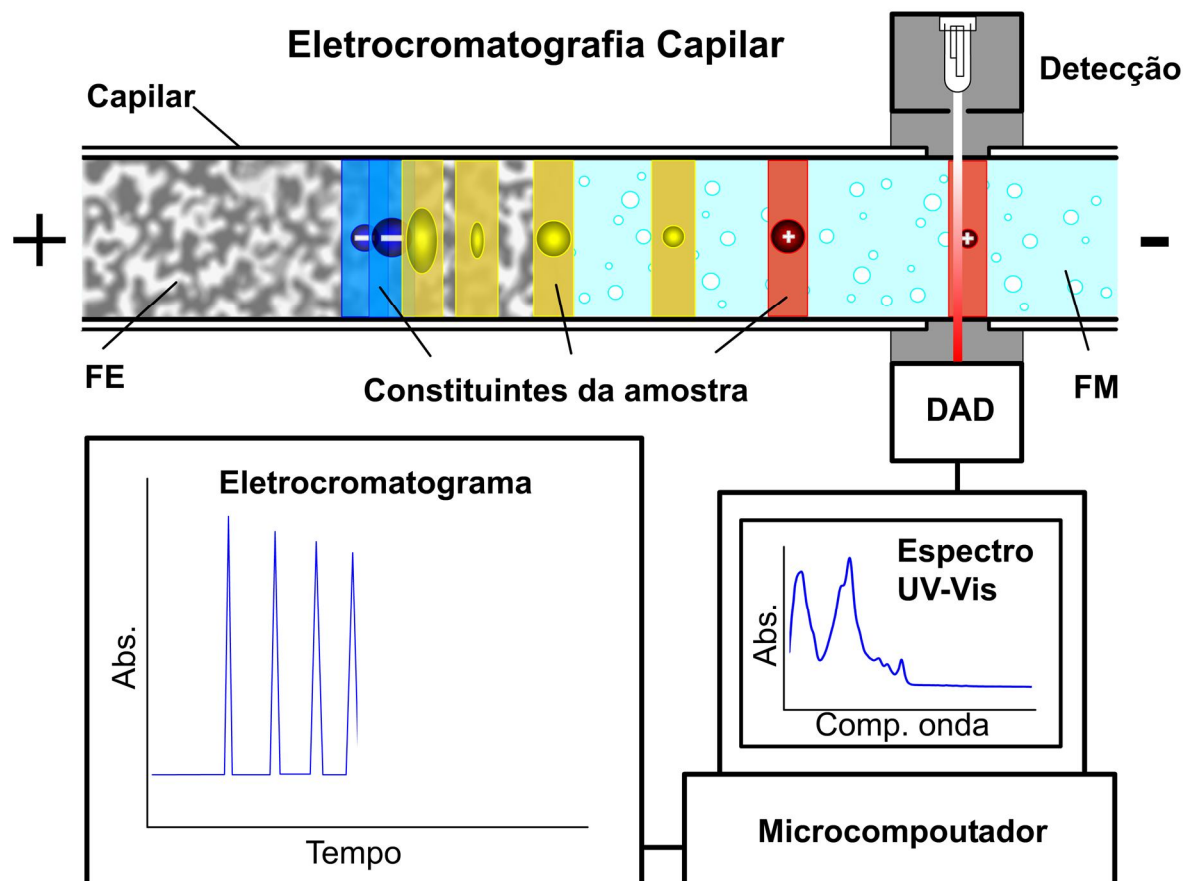


Figura 4. Ilustração de uma corrida de ECC, mostrando alguns componentes instrumentais, a FE e FM no interior do capilar e os constituintes da amostra introduzida.

Embora existam poucos instrumentos exclusivos para ECC, como os da série *PrinCE-C 700*, da Prince Technologies, ela pode ser realizada em qualquer equipamento de EC que contenha um sistema de alta pressurização. O EC da marca Beckman, por exemplo, vem de fábrica com este sistema instalado, enquanto o da marca Agilent, utilizado neste projeto, requer a instalação da chamada pressurização externa. Esta consiste no acoplamento de um cilindro de nitrogênio puro com válvula de controle de vazão.

Como a ECC pode ser realizada num equipamento de EC, ela tem a opção da aplicação de voltagem apenas. Isso é possível, pois a própria voltagem aplicada promove o mecanismo de FEO, conduzindo a FM através da coluna. Esta característica, além de dispensar o uso de bombas mais complexas como as da CLAE, contribui para que o perfil do fluxo da FM seja plano, embora a presença da FE possa interferir neste perfil.

Entre os anos de 1990 e 2000, o crescimento da ECC teve perfil exponencial. Após 2000, o crescimento foi mais modesto com algumas diminuições no número anual de publicações. A Figura 5 mostra um histograma obtido através de software de pesquisas de referências *Scifinder Scholar* com o termo de entrada “*Capillary Electrochromatography*” (ECC), sem incluir patentes. A Figura 6 mostra o histograma para patentes entre 1994 e 2011.

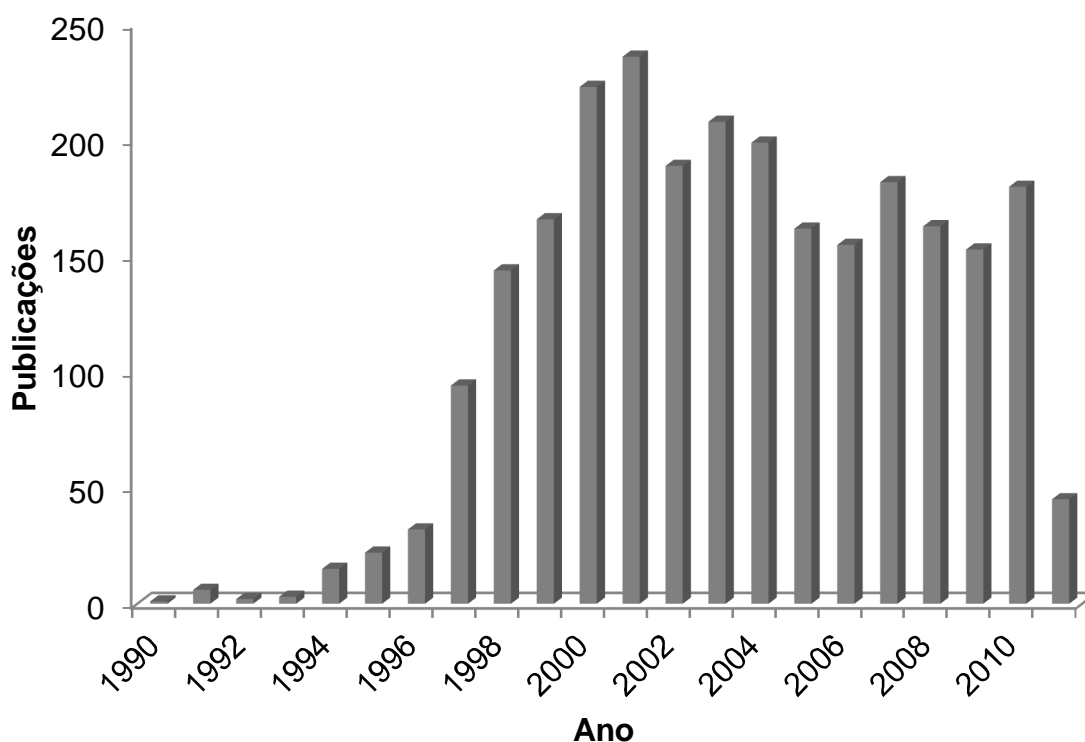


Figura 5. Histograma do número de publicações anuais envolvendo a ECC entre 1990 e 2011. Termo de pesquisa: “*Capillary Electrochromatography*”. Software de pesquisas de referências *Scifinder Scholar* 2007.

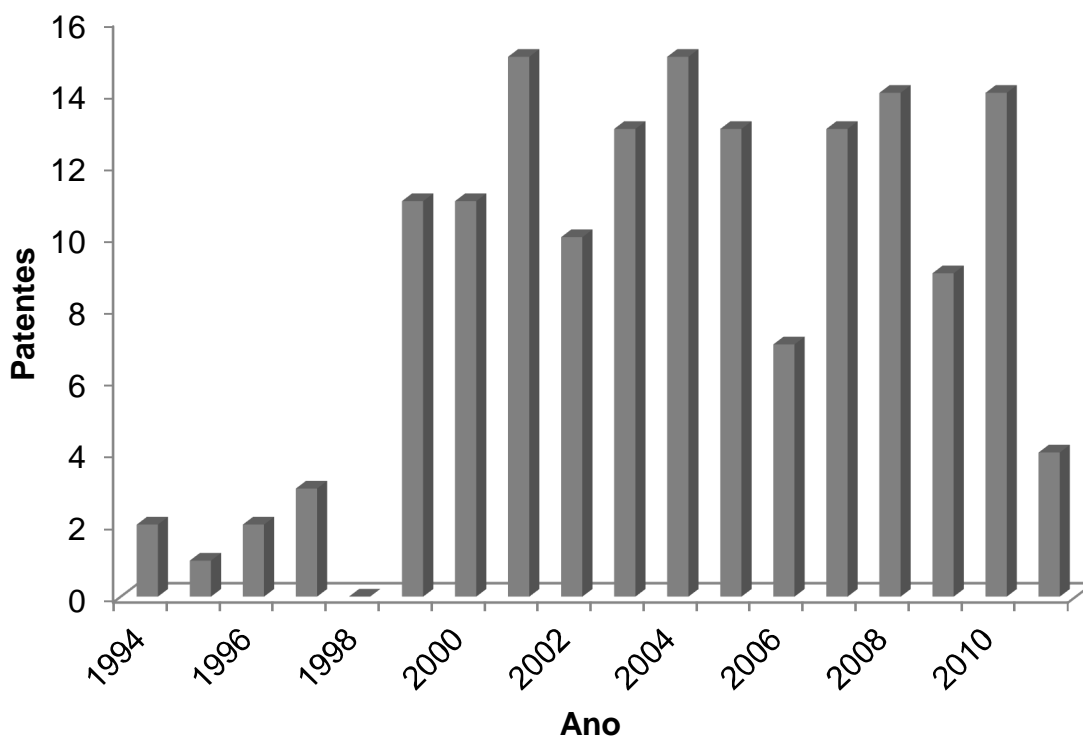


Figura 6. Histograma do número de patentes anuais envolvendo a ECC entre 1994 e 2011. Termo de pesquisa: “*Capillary Electrochromatography*”, refinado para patentes.

Recentemente Svec e Majors publicaram um artigo relatando a situação atual da ECC (SVEC e MAJORS, 2009). Tal trabalho mostra uma breve revisão de literatura, conceitos, aspectos, vantagens e limitações relacionados à ECC, bem como os desafios para o futuro. Possíveis explicações para a ECC não ter alcançado o sucesso previsto há uma década são a falta de equipamentos comerciais exclusivamente dedicados à técnica, o que atrapalha o seu crescimento em contexto industrial e acadêmico; uma aplicação de separação que não é (satisfatoriamente) alcançada por nenhuma outra técnica, tornando indispensável seu uso; e dificuldades em reprodutibilidade. Mesmo assim, uma média entre 150 e 200 artigos e de 8 a 15 patentes por ano indica que pesquisadores estão investigando nesta área.

A ECC já foi utilizada na separação bem sucedida de várias classes de compostos, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos carbonílicos, fenólicos, ácidos, básicos e quirais, poluentes ambientais, explosivos,

pesticidas, herbicidas, produtos naturais, lipídios, vitaminas, drogas ilícitas, fármacos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos entre outros. Além de aplicações em separação, a ECC também já foi utilizada para pré-concentração de vários analitos (LI; FRIES e MALIK, 2004).

1.2.1 Modos de análise em ECC

Ultimamente, grandes esforços têm sido realizados para se diminuir o tempo de análises químicas para atender demandas cada vez maiores em todas as áreas. Na ciência de separações não é diferente. Kennedy publicou um artigo de revisão reportando novas tendências no que diz respeito ao aumento da rapidez das análises bioanalíticas em EC (KENNEDY, 1999).

Neste contexto, uma nova possibilidade de análise foi experimentada em ECC, sem a adição de qualquer aparato de auxílio. Este novo modo de análise, denominado neste trabalho como *ECC-rápida* e referenciado na literatura como injeção pela extremidade curta (do capilar) ou "*short-end injection*" (EUERBY *et al.*, 1998), consiste na inversão do sentido de percurso do analito numa corrida eletrocromatográfica (Figura 7). Este modo de análise aborda a saída convencional (outlet) do EC como entrada de FM e amostra e trata a entrada (inlet) como saída. Além disso, os parâmetros operacionais como voltagem, sentido de passagem de FM e injeção de amostra são todos invertidos para que se respeite o fluxo considerado. Este modo de análise vem sendo evidenciado tanto em EC quanto em ECC (MESPLET *et al.*, 2001; MESPLET *et al.*, 2002; OHYAMA *et al.*, 2004; ATURKI; D'ORAZIO e FANALI, 2005; MICKE *et al.*, 2009).

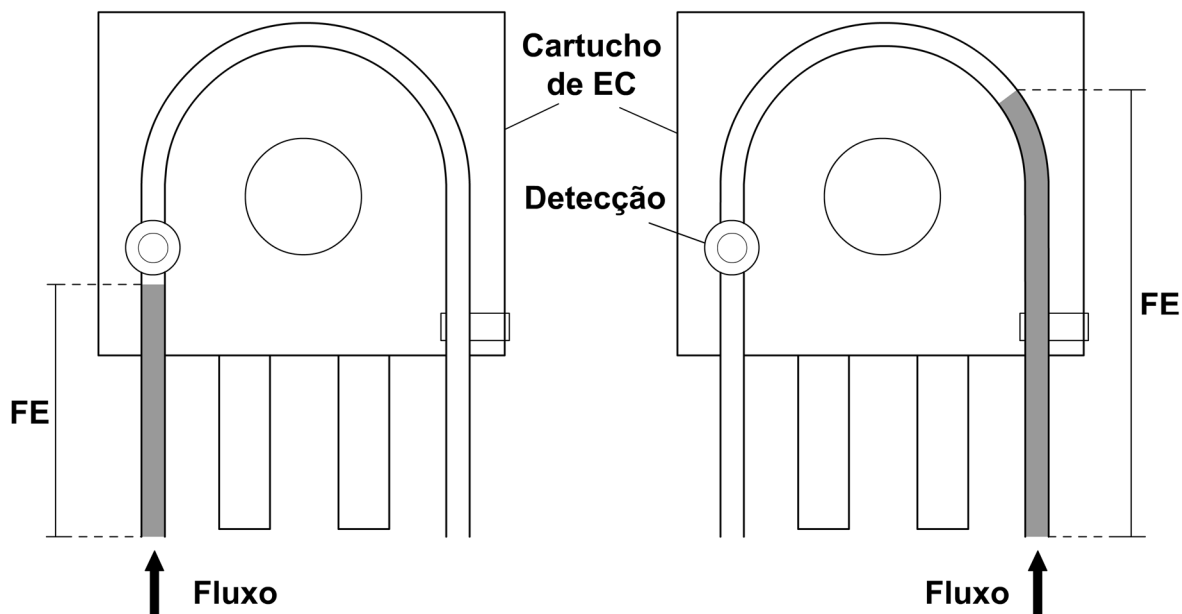


Figura 7. Posições da FE no modo *ECC-rápida* à esquerda e do modo convencional à direita.

Existe um segundo detalhe importante que diz respeito ao modo de análise no equipamento de EC. Uma vez instalado o sistema de pressurização externa, para que este possa ser de fato utilizado, dois modos, o “CEC” (ECC) e o “CE+p” (EC com pressão) devem ser considerados no software Chemstation. O primeiro trabalha de forma que, além da voltagem, uma pressão assistida de 2 a 12 bar é sempre aplicada durante as corridas no reservatório de entrada, de saída ou em ambos. O segundo trabalha como o modo convencional “CE” durante as corridas, ou seja, somente com aplicação de voltagem, mas permite a aplicação de altas pressões nos condicionamentos das colunas (Figura 8). É interessante se trabalhar sem auxílio da pressão durante as corridas, principalmente quando se utiliza detecção por espectrometria de massas. Algumas colunas pouco permeáveis requerem a aplicação de pressão durante as corridas, assim como as FEPE C-8 e C18. Neste caso, as análises feitas sem a pressão assistida chegam a durar mais de meia hora com o pico do marcador de fluxo, a tiouréia, saindo em 20 minutos, numa coluna de 8,0 cm.

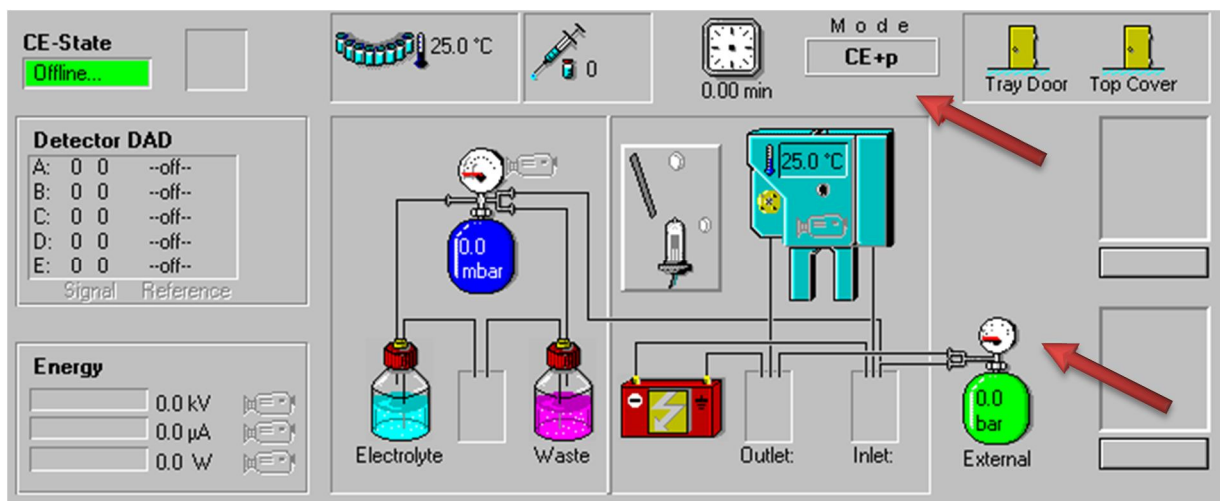


Figura 8. Parte do layout do software Chemstation 6.0. As setas indicam as diferenças quando se trabalha nos modos CEC ou CE+p. Quando estes modos não são utilizados, o cilindro verde, que representa a pressão externa, se torna ausente.

1.2.2 Fases estacionárias utilizadas em ECC

Uma vez que a tecnologia de fabricação de colunas é crucial para o desenvolvimento de novos métodos e a tecnologia de separação (WU *et al.*, 2008), este Item é dedicado aos principais tipos de FE utilizadas em ECC.

Existem três tipos principais de FE cromatográficas em ECC. O primeiro tipo é constituído de uma coluna recheada com material esférico e poroso, ou fase estacionária particulada esférica (FEPE), preenchendo o capilar até a janela de detecção (SCHMEER; BEHNKE e BAYER, 1995; DITTMANN e ROZING, 1996; NORTON; ZHENG e SHAMSI, 2003). O segundo se refere à fase estacionária tubular aberta (FETA), onde o material cromatográfico consistindo de um filme polimérico poroso permanece ancorado na superfície interna do capilar (XIE *et al.*, 2001). E por último, a chamada coluna monolítica ou fase estacionária monolítica (FEM), a qual é baseada no preenchimento tridimensional do interior do capilar com material polimérico poroso. A Figura 9 ilustra os detalhes estruturais dos três modos principais de colunas capilares utilizadas em ECC.

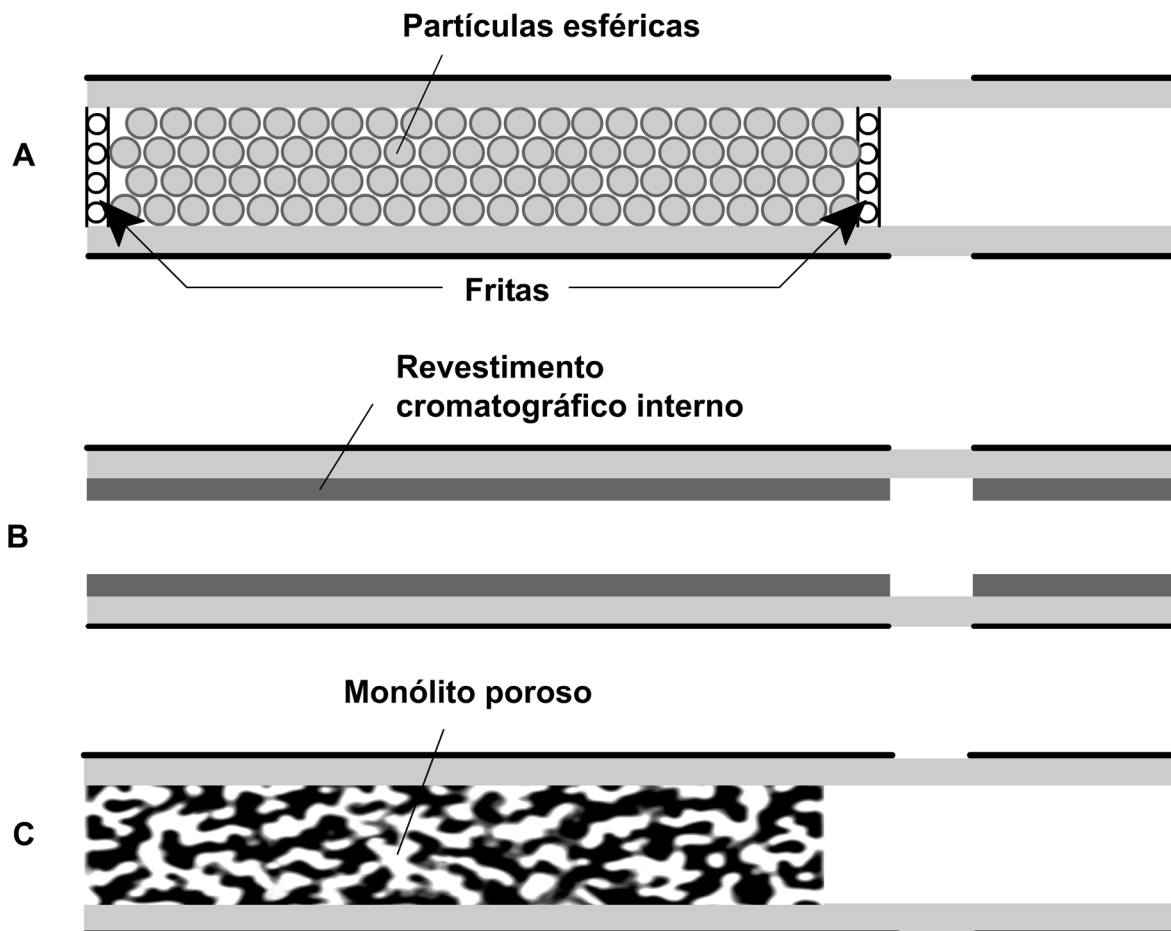


Figura 9. Representação de três tipos de colunas usadas em ECC: A) fase estacionária particulada esférica; B) fase estacionária tubular aberta; e C) fase estacionária monolítica.

1.2.2.1 Fase estacionária particulada esférica

A maioria das colunas utilizadas em ECC está contida neste grupo onde partículas sólidas micrométricas são utilizadas como FE para preencher o capilar (DITTMANN e ROZING, 1996; HILDER; SVEC e FRÉCHET, 2004). As etapas de confecção, mostradas na Figura 10, consistem nos itens abaixo:

- Obtenção da 1ª fritas (do inglês frit), que é uma tampa porosa usada para reter as partículas no interior do capilar. A fritas é frequentemente obtida pela queima de material particulado a base de sílica;

- b) Preenchimento do capilar com partículas a base de sílica;
- c) Obtenção da 2ª frita no final do preenchimento;
- d) Obtenção da janela de detecção.

O item mais problemático destas colunas está na necessidade do uso das fritas. Elas contribuem para inúmeras características indesejáveis, como perda de desempenho e formação de bolhas numa análise, influência imprevisível sobre o FEO, além da dificuldade na preparação (JIANG *et al.*, 2001; ZOU *et al.*, 2002).

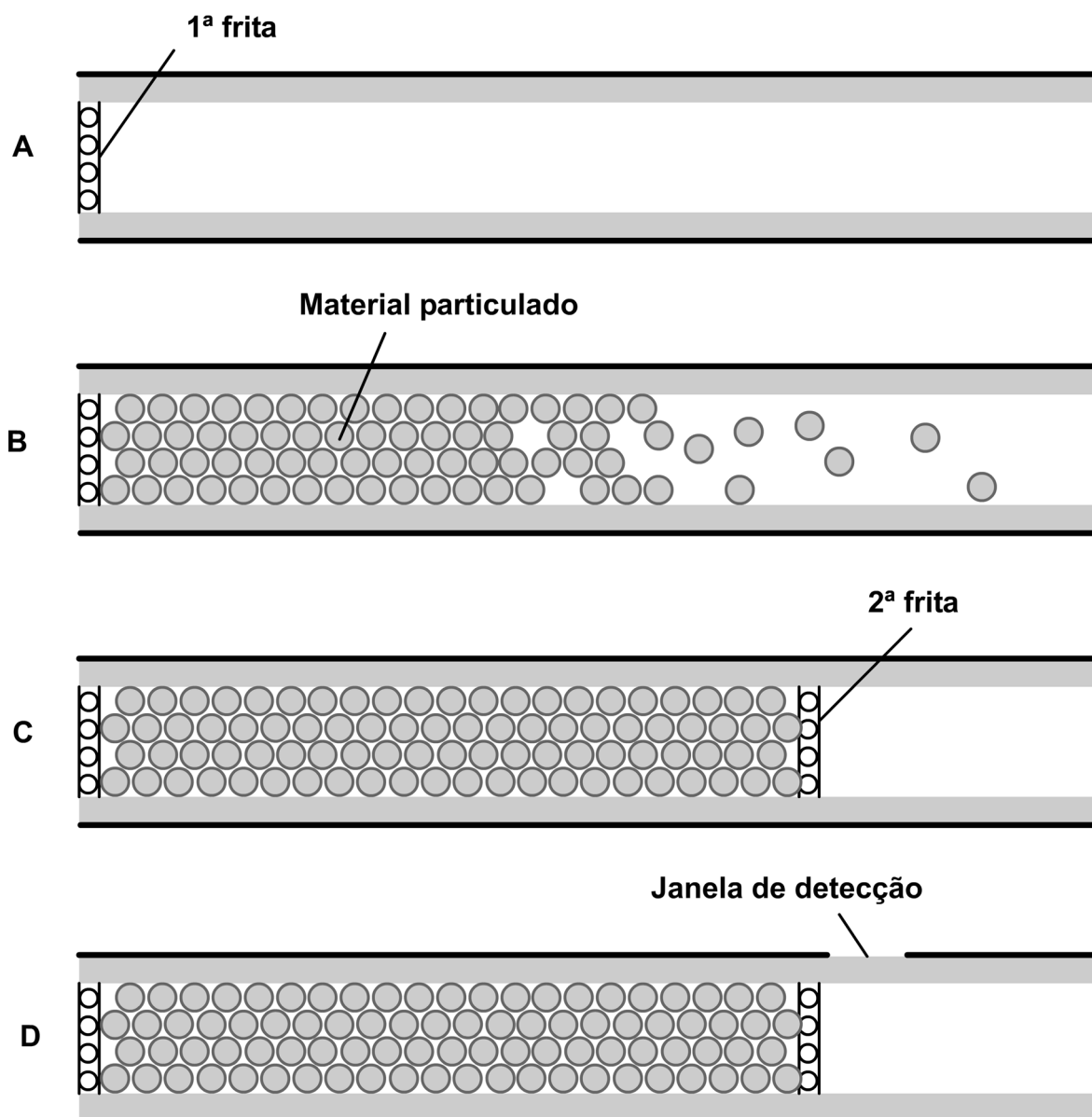


Figura 10. Etapas da preparação de uma FEPE. A) obtenção da primeira frita; B) preenchimento do capilar com as partículas esféricas (geralmente os diâmetros são menos regulares do que mostrado); C) obtenção da 2ª frita; D) obtenção da janela de detecção.

1.2.2.2 Fase estacionária tubular aberta

No formato de tubos abertos uma camada de FE é ligada quimicamente na superfície interna do capilar (CHEN, 2010). A preparação de uma FETA é uma etapa crítica, pois esta deve possuir área superficial o suficiente para originar

características de retenção e capacidade de amostragem (XIE *et al.*, 2001; LIANG XU, 2008). Este tipo de FE não requer o uso das fritas. Conforme mostra a Figura 11, os passos para a confecção de uma coluna tubular aberta compreendem:

- a) Limpeza e pré-tratamento do capilar, deixando a superfície interna mais concentrada com grupos silanóis, que funcionam como âncoras para prender a FE;
- b) Preenchimento do capilar com uma fase líquida denominada “sol”, que permanece em repouso por um determinado período para permitir a formação de uma camada ligada à parede interna;
- c) Aplicação de pressão para remover os componentes que permaneceram em solução, com posterior pós-tratamento da camada formada;
- d) Obtenção da janela de detecção. A ausência de FE nesta região pode ser obtida com uma máscara que impeça a formação de FE.

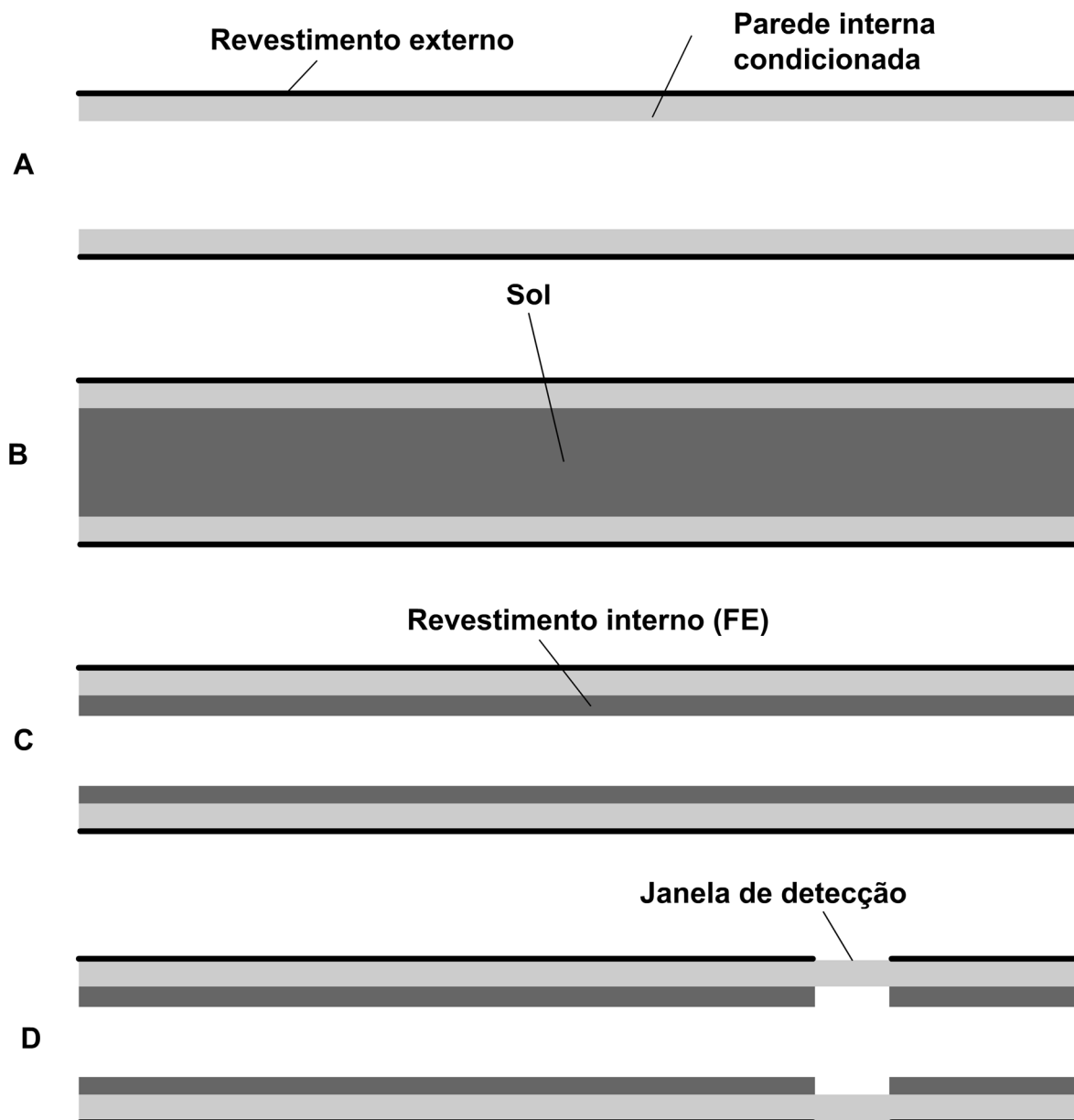


Figura 11. Etapas da preparação de uma coluna tubular aberta, mostrando A) o capilar pré-tratado; B) o preenchimento do capilar com o sol; C) a camada de FE ligada à superfície do capilar com posterior pós-tratamento e D) a obtenção da janela de detecção.

1.3 FASE ESTACIONÁRIA MONOLÍTICA

Segundo Gusev *et al* (GUSEV; HUANG e HORVÁTH, 1999) uma FEM é definida como “uma estrutura contínua, unitária e porosa preparada por polimerização *in situ* ou consolidação no interior do tubo e, se necessário, com a superfície funcionalizada para convertê-la em um sorvente com as propriedades cromatográficas de ligação desejadas”. Em termos práticos, uma FEM consiste de uma barra fina e porosa, com certa rigidez, cujo diâmetro é igual ao diâmetro interno do capilar que neste reside. O capilar, por sua vez, pode ser o mesmo utilizado em EC, como o de sílica fundida ou qualquer outro suporte oriundo da técnica em que for utilizado.

As colunas monolíticas foram desenvolvidas como alternativas para as FEPE, devido à dificuldade na preparação das fritas e outros problemas operacionais. A Figura 12 mostra os histogramas para o número de publicações de trabalhos (incluindo patentes) que envolvem o desenvolvimento e/ou aplicação de FEM para ECC e para outras técnicas. É possível observar o crescente uso das FEM fora de aplicações envolvendo ECC. Tais aplicações incluem a CLAE (IKEGAMI e TANAKA, 2004) em maior parte, a microextração em fase sólida, a cromatografia por bioafinidade, a cromatografia por injeção sequencial (FARIA *et al.*, 2006), a cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) (WALCHER *et al.*, 2002) entre outras.

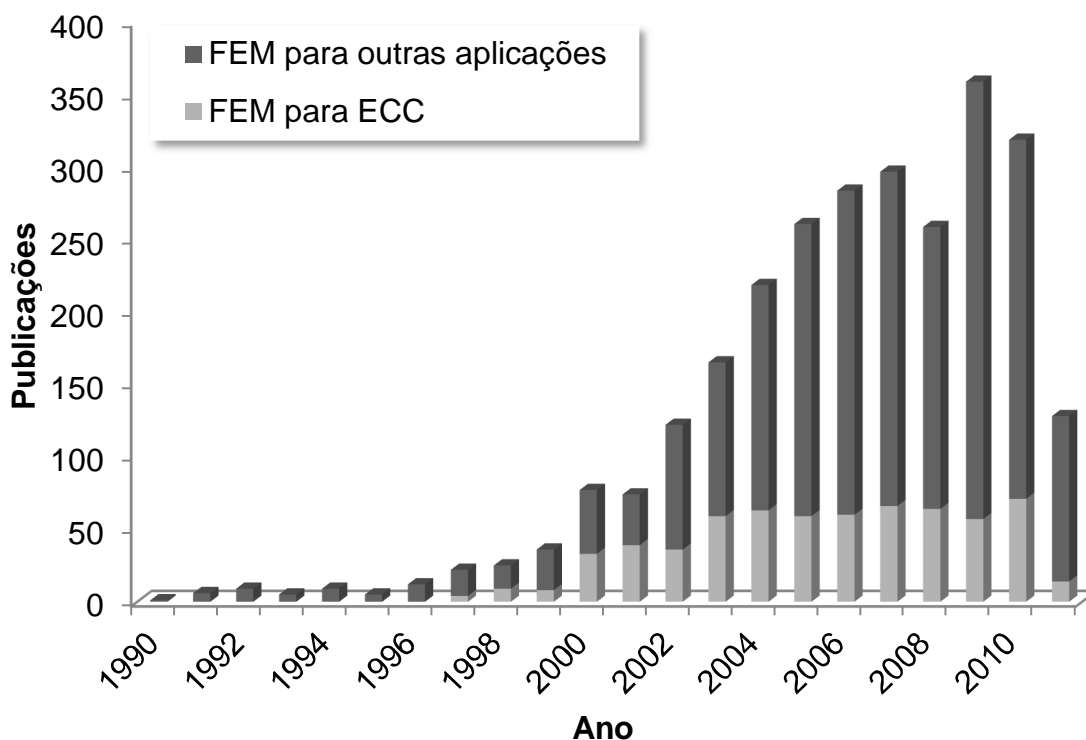


Figura 12. Histogramas do número de publicações anuais envolvendo as FEM, entre 1990 e 2011. Termos de pesquisa: “*Capillary Electrochromatography*”, refinada com “*Monolithic columns*” para publicações envolvendo FEM para ECC; “*Monolithic columns*” subtraído os valores de FEM para ECC, para publicações envolvendo FEM para outras aplicações.

1.3.1 Macro e mesoporos

Uma característica importante é a presença dos *macroporos* e *mesoporos* na estrutura monolítica. De acordo com as dimensões definidas pela *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC* (ROUQUEROL *et al.*, 1994), os macroporos são poros com dimensões maiores que 50 nm e são os grandes responsáveis por uma alta permeabilidade de FM mesmo com a aplicação de baixas pressões ou aplicação de voltagem. Já os mesoporos possuem dimensões entre 2 e 50 nm e são grandes responsáveis pela interação entre a FE e os analitos, pois a área superficial de um material mesoporoso é relativamente elevada. A Figura 13 mostra uma seleção de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (GUSEV;

HUANG e HORVÁTH, 1999; SMITH, 2002) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (AMATANI *et al.*, 2005). A MEV possibilita a visualização dos domínios (estrutura sólida) e macroporos, enquanto a MET permite a visualização dos mesoporos.

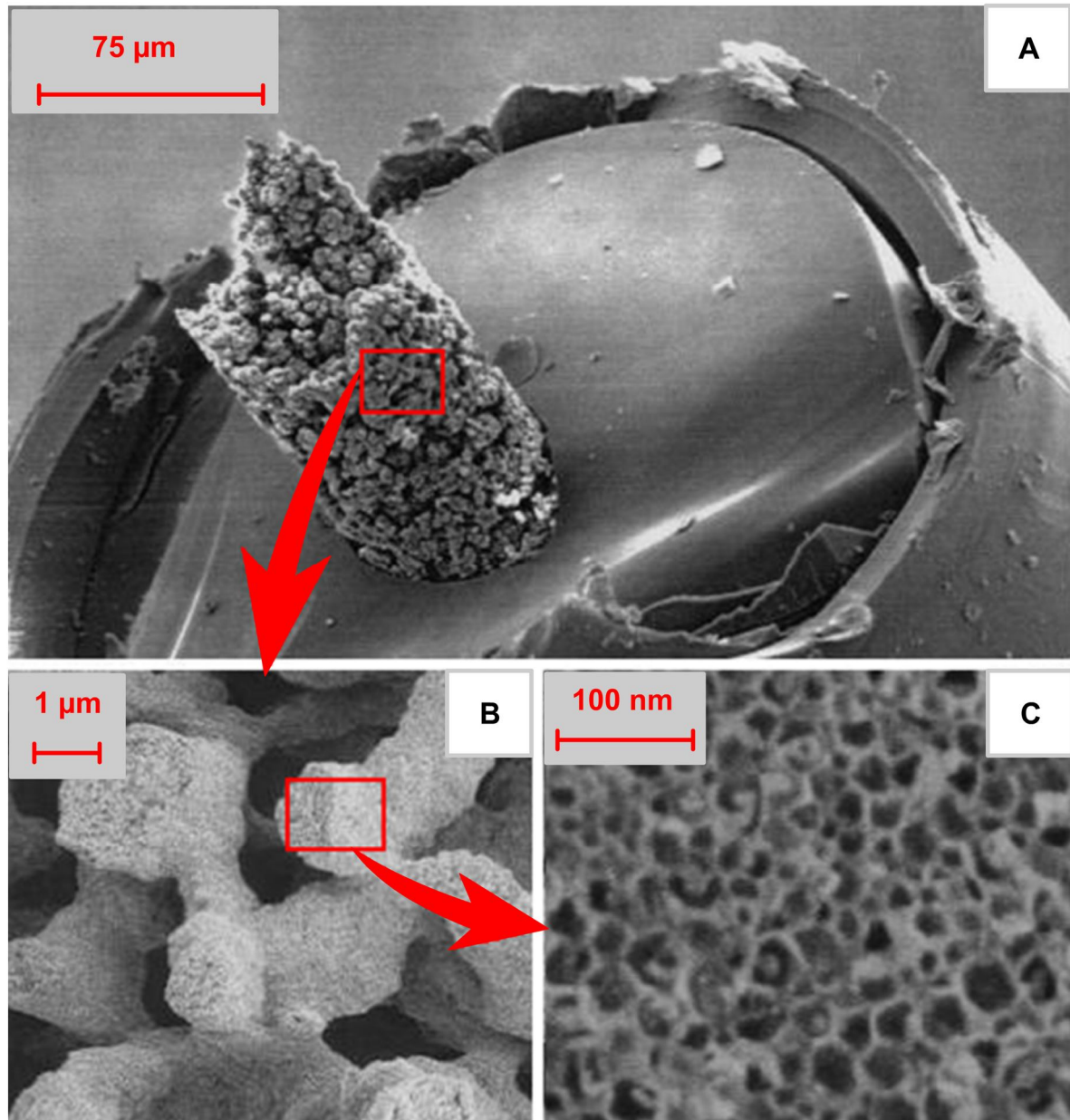


Figura 13. Fotografias de FEM obtidas por MEV (A e B) (GUSEV; HUANG e HORVÁTH, 1999; SMITH, 2002) e por MET (C) (AMATANI *et al.*, 2005).

1.3.2 Modos de obtenção dos monólitos

De maneira geral, as etapas de construção desta coluna (Figura 14) são as seguintes:

- a) Preenchimento do capilar (pré-tratado) com o sol por um determinado segmento. O ponto até onde o sol é inserido pode ser definido por simples visualização em capilares revestidos com poliacrilato (ou qualquer outro revestimento transparente) ou por ajustes do tempo e pressão de injeção no equipamento de EC;
- b) Polimerização fotoiniciada do(s) precursor(es) polimérico(s) no interior do capilar (polimerização *in situ*);
- c) Remoção do solvente e resíduos da polimerização por aquecimento ou aplicação de pressão no capilar, limpeza e condicionamento do monólito;
- d) Obtenção da janela de detecção.

Uma FEM que tem despertado bastante interesse em ECC (HILDER; SVEC e FRÉCHET, 2004) é comumente obtida através de polimerização via o processo *sol-gel*, onde uma solução na fase líquida denominada sol, contendo reagentes específicos, perde sua fluidez pelo aumento da viscosidade, se tornando um gel (BRINKER e SCHERER, 1990; HILDER; SVEC e FRÉCHET, 2004). Além de precursores poliméricos, é necessária a presença de um solvente que atua como *porogênio*, de forma que, após a polimerização, este é removido juntamente com resíduos de reação química, restando no capilar apenas o polímero poroso e seco (monólito). O processo de polimerização *in situ* pode ser de três tipos:

- a) Termo polimerização, onde o capilar contendo o precursor polimérico é submetido a um condicionamento térmico que possibilite a formação do polímero;
- b) Polimerização termo iniciada, onde um reagente termo iniciador se decompõe quando aquecido, liberando radicais que provocam a polimerização do precursor;

- c) Polimerização fotoiniciada, que consiste em incidir radiação eletromagnética com comprimentos de onda definidos ao longo do capilar contendo o precursor polimérico e o fotoiniciador até a formação do polímero.

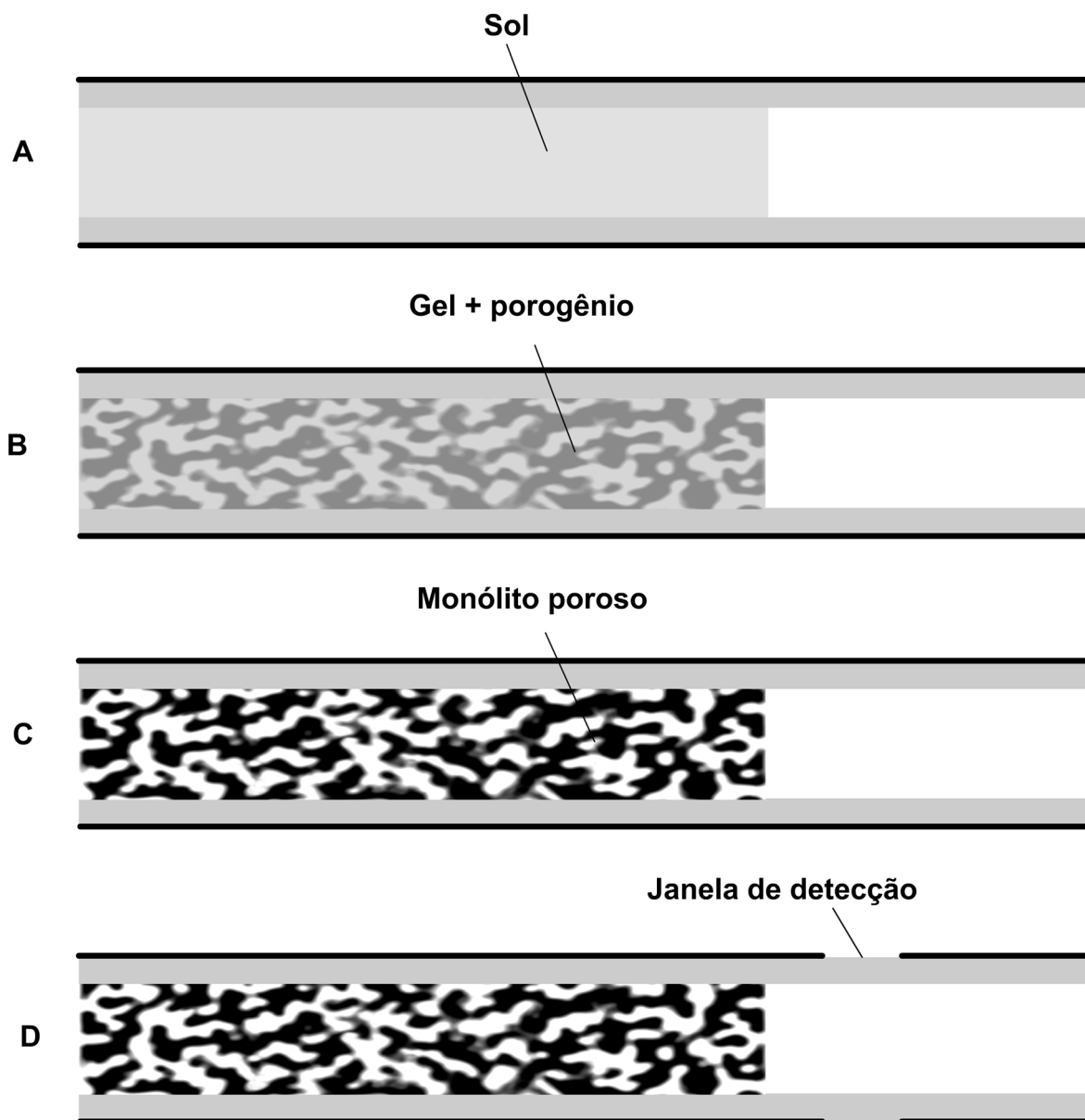


Figura 14. Etapas da preparação de uma coluna monolítica, mostrando A) o capilar preenchido com um sol; B) a polimerização fotoiniciada *in situ*, formando-se o gel; C) a remoção do solvente utilizado como porogênio com posterior pós-tratamento e D) a obtenção da janela de detecção.

FEM preparadas por procedimentos distintos podem possuir diferentes características cromatográficas e eletroforéticas. A escolha dependerá, além da disponibilidade de reagentes, das características físico-químicas do revestimento externo do capilar. O revestimento de poliimida, comumente empregado nos capilares para EC, absorve luz no UV e em certa faixa do visível permitindo apenas a termo polimerização ou polimerização termo iniciada de uma FEM. Embora a remoção deste revestimento, para se realizar a fotoiniciação, já tenha sido proposta (KATO *et al.*, 2002) deve-se ressaltar que este ato torna a coluna capilar extremamente frágil e, de certa forma, inutilizável.

O capilar revestido com teflon já foi citado como sendo uma opção para fotopolimerização, porém não muito atraente, uma vez que é considerado frágil e de difícil manuseio (TANG e LEE, 2000).

Uma alternativa interessante para a preparação do monólito é através da polimerização fotoiniciada em capilares revestidos com poliacrilato. Este polímero é transparente à radiação utilizada no preparo da FEM e, desta forma, não é necessária a remoção do revestimento. Esta é uma característica chave, já que a flexibilidade e resistência mecânica do capilar são mantidas (TAVARES, 1996).

Atualmente, todo material empregado como colunas em técnicas de separações é importado, exceto onde a *Microtube* (empresa brasileira voltada para fabricação de capilares e fibras ópticas) disponibiliza colunas capilares para pesquisadores em alguns centros de pesquisa no Brasil e no exterior (BALESTEROS; FARIA e OLIVEIRA, 2007; BALESTEROS *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2007; FILHO e MICKE, 2007b; a; RAMMOUZ *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; SANTHIAGO *et al.*, 2008; VAZ *et al.*, 2008a).

Assim, todo o processo de otimização do preparo de colunas monolíticas polimerizadas por fotoiniciação, o qual é o foco principal deste trabalho, pode ser realizado utilizando-se capilares revestidos com poliacrilato.

1.3.3 Vantagens das FEM

Em função do avanço tecnológico e pelo fato de apresentarem relevantes vantagens sobre as outras FE, as FEM vêm despertando grande interesse científico

e estão sendo amplamente utilizadas em técnicas de separação como a ECC, CLAE e micro-LC.

Comparando com as FEPE, as FEM apresentam muitas vantagens como a facilidade de confecção (a polimerização é realizada *in situ*), a ausência das “fritas”, o que elimina problemas operacionais causados por estas (como perda de desempenho e formação de bolhas no interior do capilar, o que dificulta a passagem de corrente elétrica e causa influência imprevisível sobre o FEO, além da dificuldade de preparação (JIANG *et al.*, 2001; ZOU *et al.*, 2002)); maior área superficial e alta porosidade da FE, permitindo maior transferência de massa de FM através da coluna.

Em comparação com as FETA, a principal vantagem está no fato de que as FEM são mais concentradas num dado segmento de capilar. Além disso, as FETA apresentam como limitações, durante o processo de preparação, a obtenção de um filme com espessura uniforme de FE ao longo da coluna.

O grupo da Profa. Dra. C. H. Collins (UNICAMP) publicou excelente artigo de revisão sobre FEM para separações cromatográficas, abordando tópicos a respeito do processo de preparação de FE, características e aplicações (FARIA *et al.*, 2006). Este trabalho mostra com grande clareza a relevância das FEM para o crescimento da área de separação no cenário analítico, chamando atenção para o aumento da versatilidade, seletividade e eficiência através do uso das FEM em técnicas como a CLAE e ECC.

1.3.4 Caracterização da porosidade do monólito

A caracterização do grau de porosidade de um monólito é extremamente importante para uma coluna, pois permite identificar e distinguir os poros maiores ou macroporos (necessários para a transferência de massa de analitos e FM) dos poros menores ou mesoporos (responsáveis pela grande área superficial da coluna, geralmente entre 5 e 50 m^2g^{-1}), que estão relacionados com a eficiência de separação analítica. A determinação da área superficial geralmente é feita de acordo com método de BET (BRUNAUER; EMMETT e TELLER, 1938). A isoterma de adsorção BET é mostrada na Equação 4.

$$\frac{P}{V_a(P^0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \times \frac{P}{P^0} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: P é a pressão absoluta de trabalho;

P^0 é a pressão de saturação (pressão máxima alcançada na análise);

V_a é o volume de gás adsorvido na pressão P ;

V_m é o volume de uma monocamada do gás cobrindo toda a superfície;

C é uma constante relacionada exponencialmente com a energia de adsorção da camada adsorvida.

Se um gráfico de $P / [V_a(P^0 - P)]$ versus a pressão relativa (P/P^0) for construído, os valores de V_m e C podem ser encontrados através do intercepto e inclinação da regressão linear. Se a região escolhida (normalmente de 0,05 a 0,3 de pressão relativa) para construção do gráfico sugerir linearidade e C for um valor positivo, V_m pode ser utilizado na equação de Clayperon (Equação 5) para se encontrar o número de moléculas (de N_2) adsorvidas na superfície. Supondo que cada molécula ocupa uma área média ($0,1620 \text{ nm}^2$ – valor fornecido no equipamento), a área total da superfície do monólito pode ser facilmente encontrada.

$$\frac{PV_m}{RT} = n \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: P é a pressão na qual se forma a monocamada de N_2 ;

V_m é o volume da monocamada;

T é a temperatura de trabalho;

n é o número de mols de N_2

Uma vez obtida a área, esse valor é dividido pelo peso da amostra para determinar a área específica de superfície.

1.4 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) constituem uma classe de compostos caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados, formados por átomos de carbono e hidrogênio. Estas substâncias são poluentes orgânicos de importância ambiental e toxicológica, pois muitos apresentam propriedades carcinogênicas e mutagênicas para homens e animais e por terem ampla distribuição, sendo encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; NETTO *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2004).

1.4.1 Ocorrência dos HPA

Os HPA são produzidos pela combustão incompleta e são emitidos por fontes naturais, como por exemplo, vulcões ou por fontes antropogênicas, como os incêndios de florestas, queima de carvão, madeira, gás de carvão, alcatrão da fumaça de cigarro, motores de exaustão a gasolina e a diesel, superfície dos alimentos defumados, flambados e queimados, resíduos industriais e muitos outros processos térmicos (MAGALHÃES; BRUNS e VASCONCELLOS, 2007; COTTA; REZENDE e LANDGRAF, 2009). Atividades petroquímicas como o refino de petróleo e acidentes que envolvem o derramamento direto de seus produtos e derivados em lagos, rios e oceanos, também elevam substancialmente os níveis de HPA (MEIRE; AZEREDO e TORRES, 2007).

Após a emissão, os HPA, que são substâncias lipofílicas e podem ter grande persistência no meio ambiente, distribuem-se nos compartimentos ambientais em proporções que dependem de suas propriedades físico-químicas e das características do ambiente. Devido à sua baixa solubilidade em água e alta afinidade por partículas em suspensão, HPA não são normalmente encontrados em corpos d'água em concentrações elevadas. Sua presença em águas superficiais ou subterrâneas é uma indicação de uma fonte de contaminação. HPA são lentamente

biodegradáveis em condições aeróbias e são estáveis à hidrólise. A Tabela 1 mostra a distribuição de HPA em amostras ambientais.

Tabela 1. Níveis de HPA encontrados em amostras ambientais e biológicas (NETTO *et al.*, 2000).

Tipo de amostra	Concentração
Ar	1,3 a 500 ng/m ³
Solo	0,8 ng/kg - 100 mg/kg
Água	2,5 a 500 ng/L
Plantas	< 150 µg/kg
Alimentos	0,1 a 20 µg/kg

1.4.2 Toxicidade dos HPA

A contaminação de HPA em seres humanos ocorre por diversas vias como a inalação de ar, fumaça de cigarro e poeira, ingestão de água e alimentos e contato com solo contaminado. A preocupação com a contaminação dos HPA no organismo humano deve-se as suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Os HPA são lipossolúveis e prontamente absorvidos no organismo, onde seu metabolismo gera compostos epóxidos, que reagem com o DNA, podendo causar mutações e cânceres no pulmão, no intestino, no fígado, no pâncreas e na pele (NETTO *et al.*, 2000; JACQUES *et al.*, 2010). Estudos recentes indicam que existe uma relação entre a estrutura molecular dos HPA e seus mecanismos de carcinogênese (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; SISINNO *et al.*, 2003). A pele contaminada com HPA, se exposta à radiação solar, pode causar reações tóxicas (fototoxicidade). Devido aos vários anéis aromáticos dos HPA, estes compostos absorvem a energia da luz UV e, alguns, na região do vis, formando espécies reativas e causando danos aos componentes celulares (YAN *et al.*, 2004).

Embora existam centenas de HPA e derivados no ambiente, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”) estabeleceu uma lista de 16 HPA (Figura 15)

considerados prioritários para monitoramento ambiental, em função de sua carcinogenicidade e ocorrência (EPA, 2011).

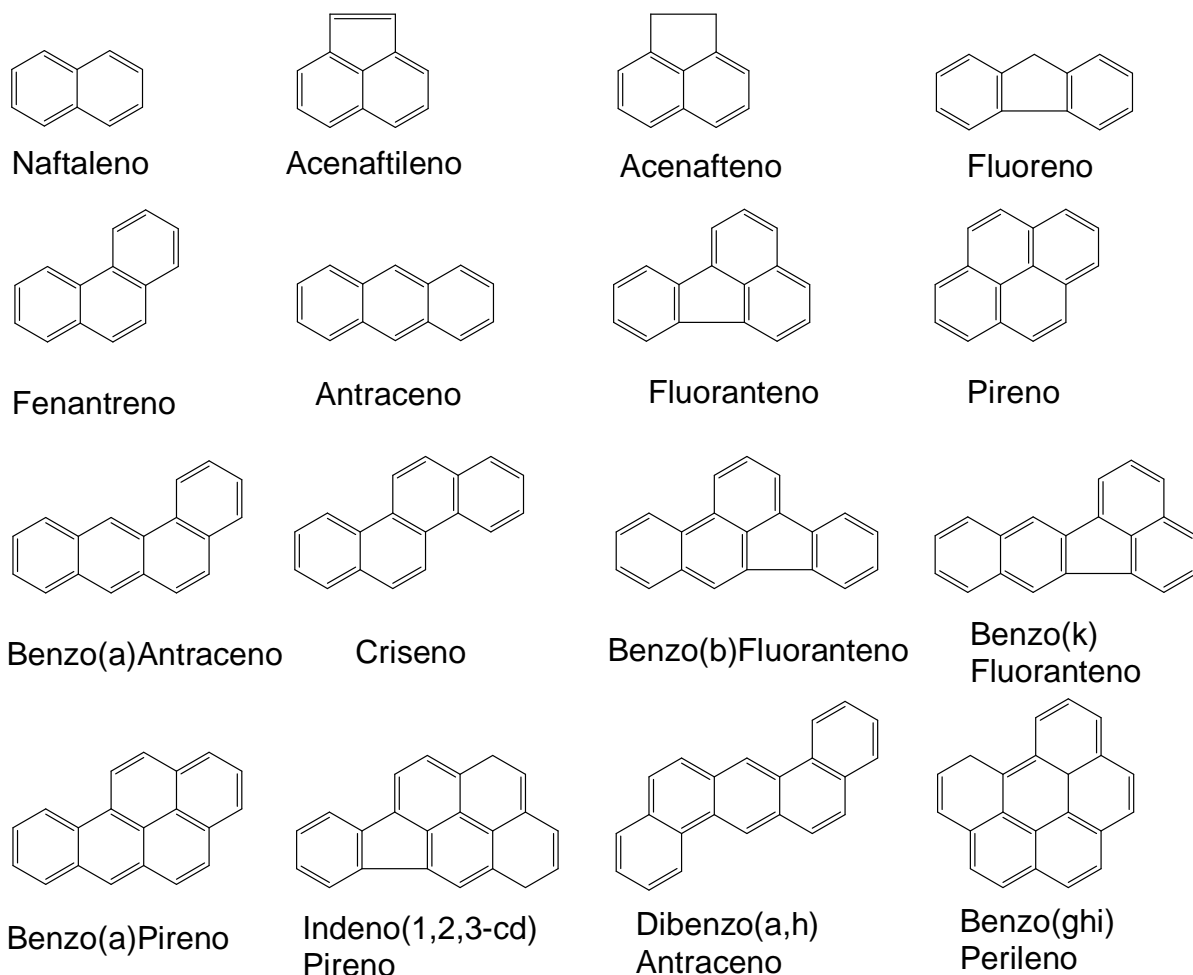


Figura 15. Estruturas e nomes dos dezesseis HPA prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2011).

1.4.3 Técnicas de análise de HPA

Dada a relevância dos HPA quanto à sua ocorrência e toxicidade, inúmeras técnicas estão disponíveis para análise destes compostos e seus derivados em diversas matrizes. As principais técnicas de análise de HPA, recomendadas pela USEPA são a cromatografia a líquido (CL) com detecção por fluorescência e UV e a cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). As etapas de

separação e detecção são descritas para amostras sólidas (métodos 8310 e 8100), água potável (550.1), água residual (610), resíduo sólido (8310) e ar (TO-13), entre outros. Para cada método, uma etapa de extração e concentração é requerida e a principal dificuldade para análise de traços de poluentes orgânicos vem da complexidade e origem das várias matrizes ambientais (POSTER *et al.*, 2006). Outras técnicas de separação também são encontradas, como a CL-EM (CHRISTENSEN; ÖSTMAN e WESTERHOLM, 2005; LINTELMANN *et al.*, 2005), CEM (SHAMSI; AKBAY e WARNER, 1998) e a ECC com FEM (EELTINK *et al.*, 2006), FETA (XIE *et al.*, 2001) e FEPE (DITTMANN e ROZING, 1996; GARGUILO *et al.*, 2000).

Neste trabalho foram empregados padrões de naftaleno, acenafteno, antraceno, fenantreno e fluoreno, pois além de sua importância ambiental e fazerem parte dos HPA prioritários, eles são importantes para caracterizar as propriedades cromatográficas de uma FEM. Estes HPA possuem estruturas neutras similares umas das outras e são largamente encontrados em publicações envolvendo otimizações de FEM.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste trabalho está na preparação de novas colunas monolíticas para serem testadas em aplicações analíticas envolvendo eletrocromatografia capilar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atender o objetivo principal, objetivos mais específicos tiveram de ser estabelecidos, como:

Modificações da câmara fotorreatora *homemade* utilizada para a polimerização das FEM, como uma correção na faixa espectral de trabalho e instalação de dispositivos de segurança tanto para o operador quanto para o sistema elétrico.

Construção de um dispositivo de alta pressurização (DAP) simples e de baixo custo que fornece, além da pressão, grande precisão, garantindo melhor controle de injeção de fases líquidas no interior de tubos com dimensões capilares,

Otimização do preparo de FEM mediante auxílio de planejamento de experimento, com intuito de relacionar o modo de preparo destas com suas características morfológicas e propriedades eletrocromatográficas.

Caracterizações morfológica, espectroscópica e da porosidade das FEM preparadas através de MEV, espectroscopia no infravermelho e analisador das isotermas de adsorção de gases.

Separação de compostos neutros por ECC utilizando as FEM otimizadas.

3. EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPAMENTOS

3.1.1 Infraestrutura local

Foi utilizado um equipamento de EC modelo Agilent CE, equipado com fonte de alta tensão (± 30 kV), DAD, com controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado e programa para controle, aquisição e tratamento de dados ChemStation 6.0. Recentemente foi instalado neste equipamento, um sistema de pressurização externa que permite a aplicação de altas pressões (de 2 a 12 bar) em capilares durante as corridas ou pré-tratamentos. Este sistema emprega gás nitrogênio ultrapuro, cuja pressão de saída é controlada por válvula específica (R-86N), indicada e fornecida pela empresa White Martins, contendo um registro da pressão do cilindro e outro da pressão fornecida.

Espectrofotômetro modelo UV-1601PC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com emissão de duplo feixe simultâneo. Celas de quartzo com caminho ótico de 1,00 cm foram usadas nas leituras.

Espectrômetro de Infravermelho da Bomem, MB-séries.

Espectrofotômetro de Ultravioleta USB 2000, (*Ocean Optics*), equipado com cabo de fibra ótica.

Reator fotoquímico de luz UV construído recentemente (VAZ *et al.*, 2008b); dispositivos de alta pressurização (DAP) para injeção controlada de líquidos em capilares; centrífuga MSC-6000 da Biosan; agitador magnético de cinco pontos da Fisatom; cortador de capilares com lâmina de diamante Shortix, da Scientific Glass Technology.

3.1.2 Infraestrutura externa

Medidas de área superficial, tamanho e volume dos poros foram realizadas através do analisador das isotermas de adsorção de gases, ASAP 2000 (Micrometrics) no laboratório do Grupo Físico-Química de Materiais, situado nas dependências do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP-Araraquara).

Microscópio eletrônico de varredura (MEV) *Field Emission Gun* da JEOL, modelo JSM - 7500F - FEG 100, situado no IQ-UNESP-Araraquara. Este instrumento forma a imagem pela varredura, de uma amostra, com um feixe de elétrons focalizado (SAWYER e GRUBB, 1996). O modo mais comum de formação de imagem é o chamado *secondary electrons imaging*, onde elétrons secundários (elétrons gerados como produtos de ionização) são ejetados da amostra por interações de espalhamento inelástico com o feixe incidente (radiação primária). Dois detectores de imagens foram utilizados: o *Lower Secondary Electron Detector* (LEI) e o *Upper Secondary Electron Detector* (SEI) (siglas adotadas pelo fabricante). No modo LEI, superfícies e margens íngremes tendem a ser mais brilhantes do que superfícies planas, o que resulta em imagens com uma aparência tridimensional bem definida (visão de topografia de superfície). As regiões mais próximas e as mais afastadas do observador são igualmente nítidas (maior profundidade de campo), porém permite menor ampliação. Já no modo SEI, para uma dada ampliação, é possível obter foco em determinada profundidade, enquanto outras áreas ficam desfocadas (menor profundidade de campo). Fornece maior ampliação do que o modo LEI, porém menor visão topográfica.

3.2 CAPILARES

Capilares de sílica fundida com dimensões de 100 μm d.i. e 375 μm d.e. revestidos com poliacrilato foram regularmente obtidos da Microtube, situada no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. O Laboratório de Materiais Fotônicos desta instituição (coordenado pelos Profs. Dr. Sidney J.L. Ribeiro e Dr. Younes Messaddeq) tem em operação fornos e torres de puxamento que permitem a preparação das colunas com liberdade de forma, composição e revestimento externo com diferentes polímeros. Capilares de sílica fundida com dimensões de 100 μm d.i. e 375 μm d.e. revestidos com teflon foram importados da Polymicro Technologies.

3.3 SERINGAS E CONEXÕES

Seringas Gastight de 25 μL (1702 RNR) e 50 μL (1705 TLL) foram obtidas da Hamilton Company, Reno, Estados Unidos. As seringas são acopladas aos capilares pela agulha, com o auxílio de conexões PEEK (polímero PEEKTM, marca registrada de *Victrix* plc.): uniões True-ZDV para micro luvas (P-720); adaptadores do tipo Luer-to-MicroTight (P-662); luvas tubulares do tipo Microtight green Peek (F-185X); luvas tubulares tipo Microtight black Peek (F-186X); conectores padrão para luvas tubulares do tipo Microtight (F-125x) e conectores padrão para tubos de 360 μm de diâmetro, Blue PEEK (F-124Sx).

3.4 REAGENTES E PADRÕES

Os reagentes e solventes utilizados no preparo de eletrólito condutor e na preparação das FEM foram os seguintes: metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPTMS-98%) – Acros Organics (New Jersey, EUA); óxido de bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fenilfosfina (Irgacure 819) – Ciba (São Paulo, Brasil); tolueno (alto grau de pureza) – Beckman (Fullerton, EUA); etanol e metanol – Quimex (Tubarão, Brasil); ácido clorídrico, acetato de amônio, tiouréia e acetonitrila (ACN) (PA) - Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Foram utilizados os seguintes padrões: naftaleno e acenafteno (99,0%) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA); antraceno (99,0%) e fenantreno (97,0%) (Fluka, Buchs, Suíça) e fluoreno (98,0%) (Aldrich, Steinheim, Alemanha); etilbenzeno e propilbenzeno (99%), butilbenzeno e hexilbenzeno (98%) (Fluka, Steinheim, Alemanha).

As soluções foram preparadas com água purificada pelo deionizador Millipore (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.5 PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS MONOLÍTICAS

Geralmente, a fabricação de uma FEM consiste em um pré-tratamento do capilar utilizado como suporte cromatográfico; no preparo do sol, contendo um precursor polimérico, um solvente, um catalisador e água; no preenchimento do capilar com o sol com posterior realização da polimerização *in situ*, quando se forma o gel; na remoção do solvente e um pós-tratamento da coluna. O fluxograma da Figura 16 ajuda a visualizar o processo de confecção das FEM utilizadas neste trabalho.

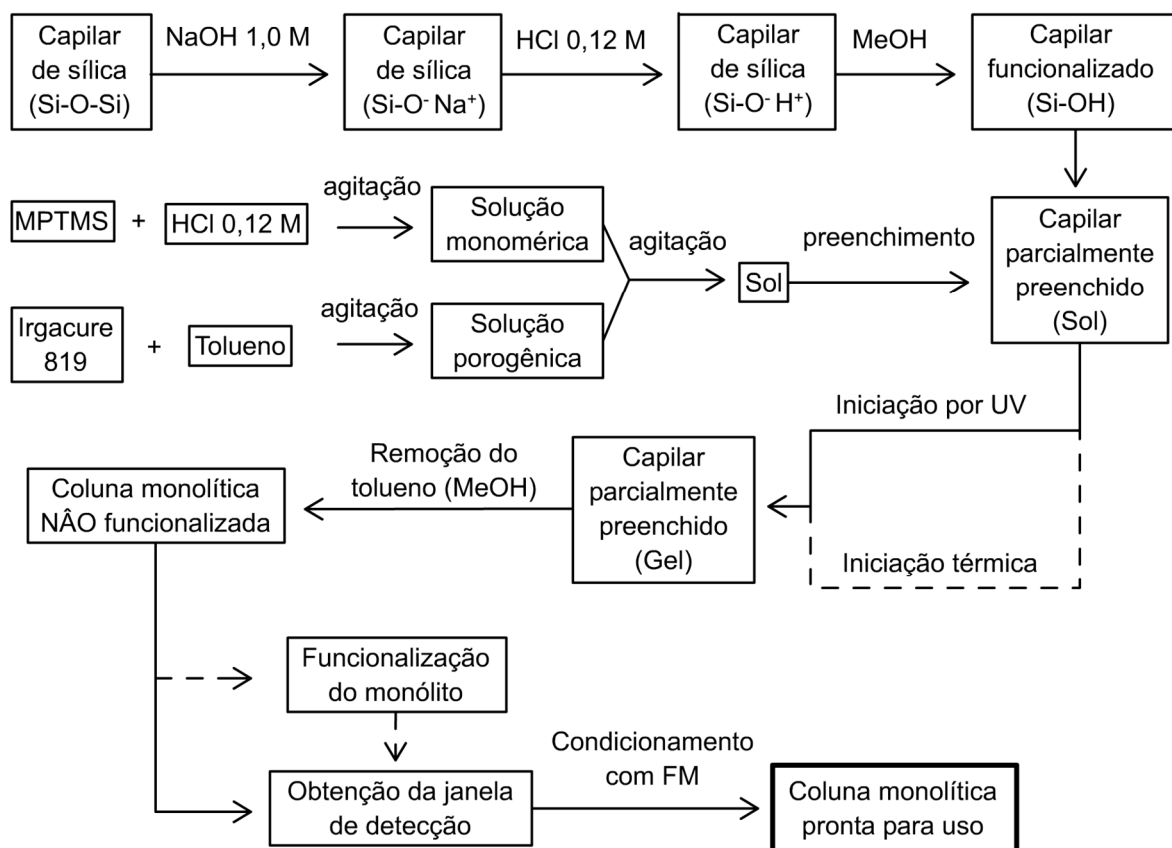


Figura 16. Fluxograma do processo de preparação de uma coluna monolítica. Os caminhos em pontilhado representam processos que não foram realizados.

3.5.1 Pré-tratamento

A finalidade do pré-tratamento do capilar é aumentar a concentração de grupos silanóis em sua parede interna, que representam o principal sítio de ligações e permitem que a FEM criada esteja mais fortemente ligada ao suporte. O tratamento empregado consiste em:

- a) Passagem de fluxo de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol L⁻¹ para ativação da sílica (-Si-O-Si-), onde se formam na superfície grupos Si-O⁻ Na⁺;
- b) Passagem de fluxo de solução de HCl 0,12 mol L⁻¹ para remoção de excesso de NaOH, onde íons Na⁺ são substituídos por íons H⁺, formando-se grupos Si-O⁻ H⁺;
- c) Limpeza com metanol (MeOH), quando a superfície interna do capilar se torna funcionalizada;
- d) Passagem de ar para remoção do MeOH.

Cada etapa foi feita em 30 minutos. Estes processos podem ser realizados em ambos os DAP, embora o DAP-2 tenha sido o mais utilizado, por conveniência. Quando mais de uma coluna estava a ser preparada, o pré-tratamento era feito no capilar inteiro, antes de ser cortado. Foi verificado em trabalho anterior (VAZ, 2007) que, sem este tratamento, as FEM preparadas são expelidas do capilar, sob aplicação de pressões usuais de trabalho, tanto através do DAP, quanto pelo equipamento de EC.

Os capilares pré-tratados foram marcados a caneta de retroprojektor e cortados com comprimento de 40 cm, lembrando que as marcas foram feitas deslocadas 0,5 cm. Este deslocamento, que é corrigido pelo cortador de diamante, evita que a tinta entre no tubo por capilaridade e possa interferir posteriormente na detecção.

3.5.2 Preparo do sol

A solução monomérica é preparada misturando-se MPTMS (Figura 17) como precursor polimérico, com HCl (0,12 mol L⁻¹) como catalisador.

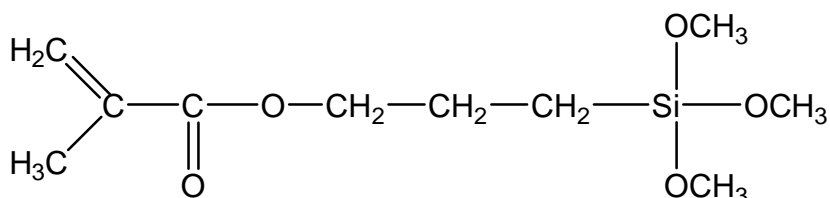


Figura 17. Estrutura química do MPTMS.

Quando a mistura é agitada por alguns minutos (como padrão, 10 minutos) a hidrólise do MPTMS ocorre, liberando MeOH no meio com formação de grupos -OH presos ao silício. Nestas mesmas condições, ocorrerá a condensação do MPTMS hidrolisado pelos grupos -OH, liberando água e formando dímeros e trímeros (DULAY *et al.*, 2001), conforme mostram a Figura 18 e Figura 19.

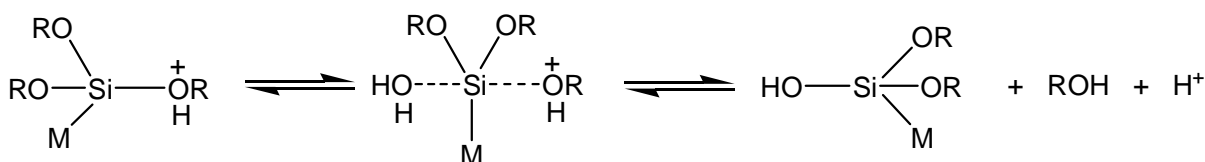
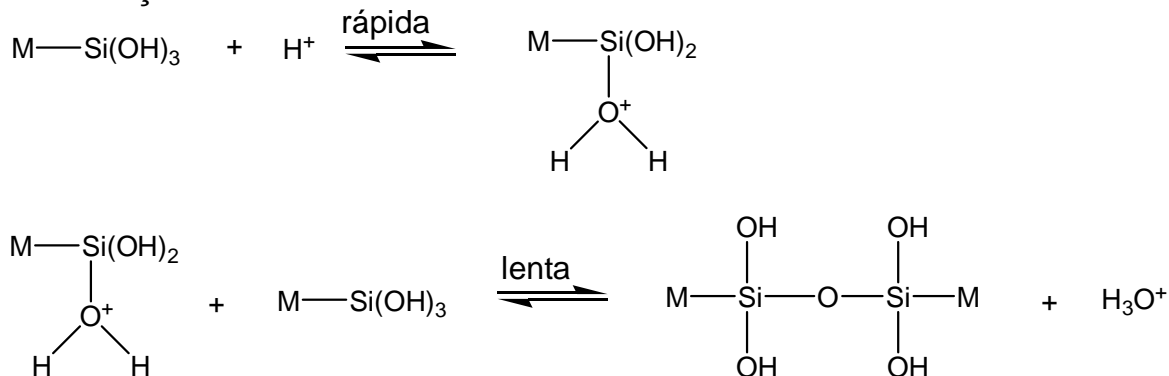
Hidrólise**Condensação**

Figura 18. Reações genéricas da catálise ácida, adaptado de Ribeiro (NASSAR; MESSADDEQ e RIBEIRO, 2002), onde Si(OR)₃M é o MPTMS.

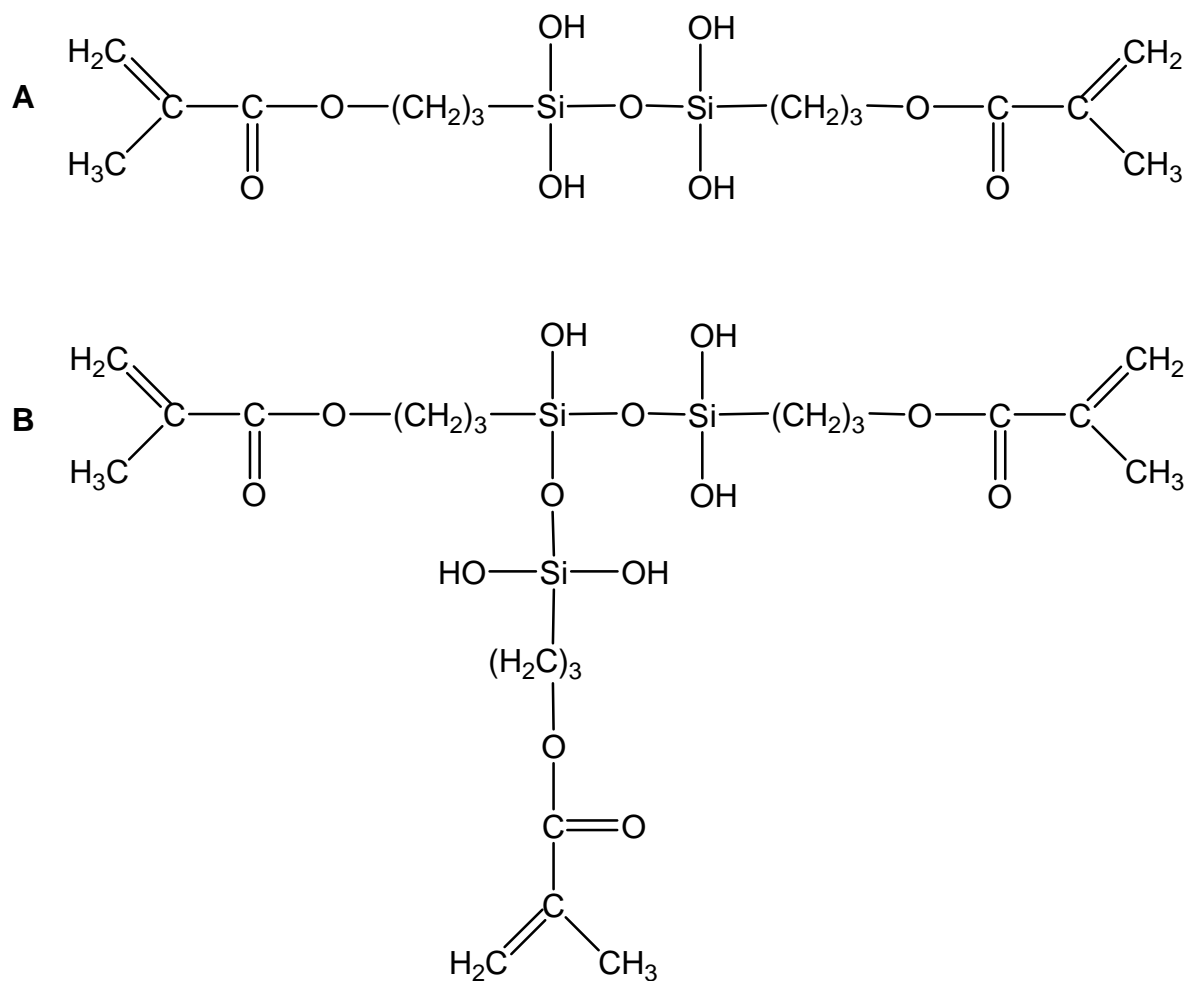


Figura 19. A: dímero e B: trímero, formados pela condensação de duas e três moléculas de MPTMS hidrolisadas, respectivamente.

O porogênio, além de solubilizar os reagentes, tem o papel de servir como modelador dos macroporos (LI; FRIES e MALIK, 2004). Diferentes porcentagens de solução porogênica acarretam em diferentes tamanhos dos poros. O solvente aqui utilizado foi o tolueno. A este foi adicionado o reagente fotoiniciador Irgacure 819. Esta mistura foi agitada por 5 minutos e mantida no escuro.

A solução fotopolimerizável, ou sol, consiste na mistura da solução porogênica com a solução monomérica. Esta mistura foi agitada por 30 minutos no escuro. Dependendo da quantidade de água (solução de HCl) adicionada para a reação de hidrólise, pode haver um pequeno excesso de fase aquosa (F_{aq}) (etapa lenta de condensação, Figura 18) que aparece como uma segunda fase imiscível, quando são misturadas as soluções monomérica e porogênica. Na F_{aq} , foi verificado que não há polimerização, devido à baixa solubilidade dos componentes da reação

nesta fase. Logo, somente a fase orgânica (F_{org}) deve ser aproveitada. Após a agitação, a mistura se apresenta como uma emulsão, tornando necessária, antes do preenchimento, a utilização de uma centrífuga para acelerar a decantação da F_{aq} . Todos os frascos utilizados foram do tipo âmbar e revestidos com papel alumínio.

3.5.3 Preenchimento e obtenção do monólito

Os capilares pré-tratados e cortados foram preenchidos numa distância de 10 cm com o sol e expostos à radiação na câmara UV por tempo determinado (entre 10 e 30 minutos). Neste processo, o fotoiniciador absorve a radiação e se decompõe, formando radicais que se adicionam à dupla ligação dos grupos metacrilato do precursor (Figura 20).

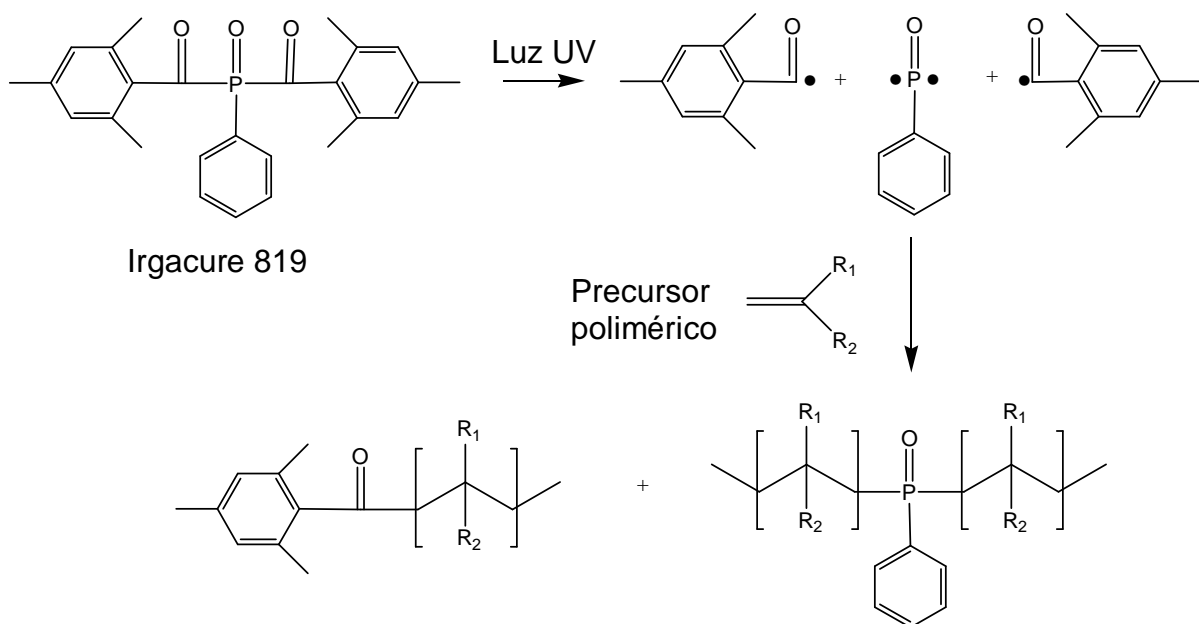


Figura 20. Fotólise do Irgacure 819 e iniciação da polimerização de um precursor polimérico genérico.

Com esta adição, novos radicais são formados e os dímeros e trímeros se adicionam mutuamente, formando-se o polímero tridimensional (JOCKUSCH e TURRO, 1998) (Figura 21).

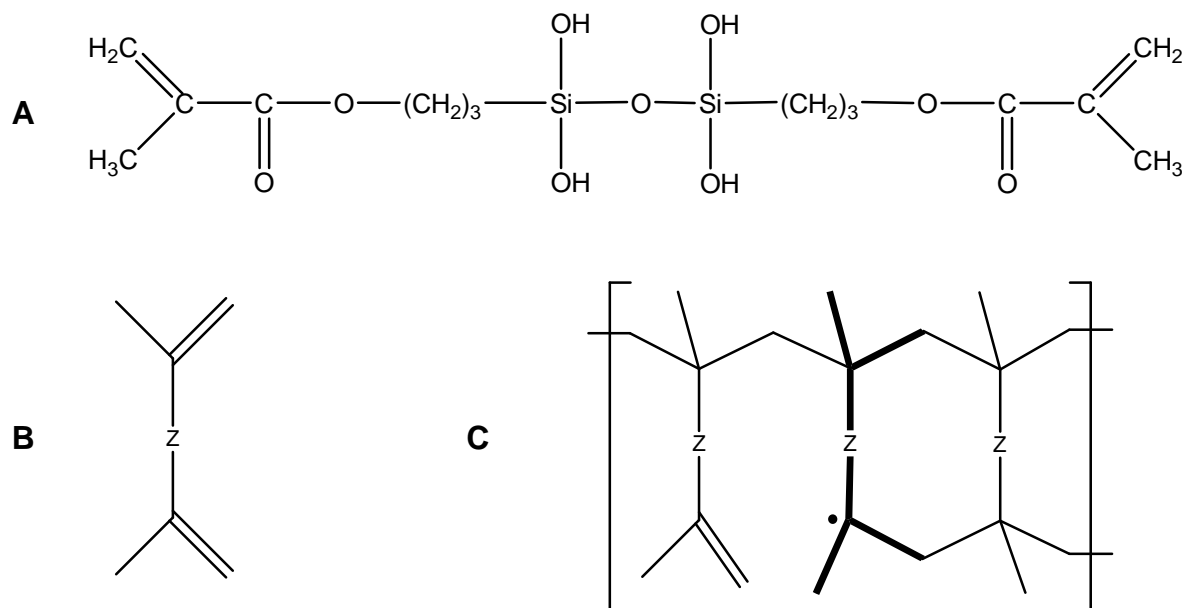


Figura 21. A: dímero de MPTMS; B: representação resumida do dímero (o grupo Z representa todos os átomos de uma carbonila à outra) e C: estrutura simplificada do polímero. As ligações em negrito evidenciam um dímero contendo um radical disponível para formar mais uma ligação. Para visualizar a formação do polímero com os trímeros, basta considerar a direção perpendicular ao plano da Figura.

3.5.4 Limpeza e condicionamento do monólito

Após o preparo da coluna, a FEM foi tratada com MeOH por 5 minutos para remoção de resíduos de reação e do porogênio, através do DAP. Dos 10 cm de FEM, 2 cm da ponta do capilar, geralmente danificado pela conexão, são removidos e eliminados. Uma janela de detecção foi feita, pela remoção do revestimento externo do capilar numa pequena secção (em torno de 0,5 cm), a 8,5 cm do fim do capilar. Em seguida cada coluna foi instalada no cartucho e montada no equipamento de EC, onde foram feitos os testes de permeabilidade com MeOH, o condicionamento com a FM conveniente (fluxo de 30 min a 5 bar e aplicação de voltagem -20 kV por 20 min) e as corridas eletrocromatográficas.

3.5.5 FEM prontas para testes e uso

O preparo descrito acima foi usado como referência para a realização do planejamento fatorial empregado na otimização. Capilares revestidos com poliacrilato e com teflon foram igualmente utilizados para o preparo das FEM.

Uma vez finalizado o processo de preparação da coluna monolítica, esta foi utilizada na separação de analitos teste, como tiouréia (marcador de fluxo) e os HPA acenafteno, antraceno, fenantreno, fluoreno e naftaleno, a fim de se estudar os parâmetros cromatográficos, tais como seletividade, retenção, e eficiência de separação, com respaldo da quimiometria. A Figura 22 mostra uma FEM após o preparo. Embora haja pouco contraste entre a janela de detecção e o capilar vazio, ela está presente entre 8,0 e 8,7 cm da extremidade.

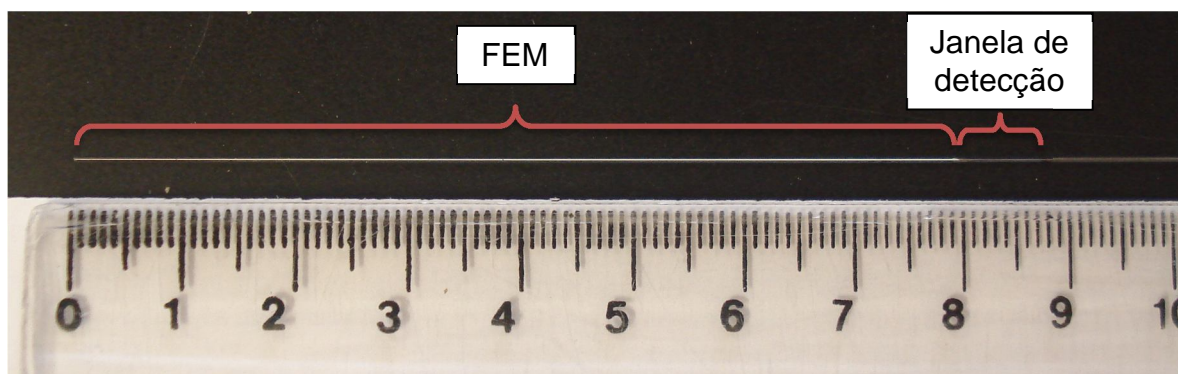


Figura 22. FEM em capilar de 100 μm d.i. revestido com poliacrilato, pronta para uso em ECC.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 MODIFICAÇÕES NA CÂMARA DE LUZ ULTRAVIOLETA

Os equipamentos de emissão de ondas eletromagnéticas, como os reatores fotoquímicos (especificamente na região do UV) disponíveis comercialmente para laboratório apresentam grandes impedimentos para aquisição devido à escassa disponibilidade local (necessidade de importação), custo relativamente alto e eventuais necessidades de adaptação. Como exemplo, uma câmara UV importada, útil para fotopolimerização foi cotada em US\$ 1.650,00 em 2008. Isto torna a construção de um equipamento alternativo com componentes de fácil acesso bastante atraente, quando a utilização deste se torna indispensável. Como exemplos, Duarte *et al* (DUARTE *et al.*, 2005) descreveu a construção e estudos de desempenho de um reator fotoquímico concentrador e luz solar como alternativa para reciclagem de águas residuárias; e Alvarenga *et al* (ALVARENGA; SALIBA e MILAGRES, 2005) mostra a construção de uma câmara de luz UV para visualização em cromatografia plana. Ambos os trabalhos mostram como uma das principais vantagens o baixo custo.

4.1.1 Descrição da câmara

Com o intuito de se obter um sistema seguro de emissão de luz capaz de promover a polimerização fotoiniciada de FEM em capilares revestidos com poliacrilato, ou teflon, foi desenvolvido, em projeto de Mestrado (VAZ, 2007), um reator fotoquímico de baixo custo, que consiste em uma caixa, feita em madeira *medium density fiberboard* (MDF), contendo seis lâmpadas fluorescentes (90 W de potência total). As lâmpadas são conectadas a três reatores elétricos que, por sua vez, são ligados à rede elétrica com (ou sem) o intermédio de um temporizador digital. Para que a energia liberada pelas lâmpadas seja concentrada no interior da caixa e não seja dispersa pela madeira, todas as paredes internas da câmara possuem espelhos planos, os quais favorecem uma distribuição de luz mais

homogênea no espaço interno. Além disso, existe um apoio móvel, também espelhado, que permite posicionar a amostra em diferentes alturas a partir da fonte de emissão.

Para o manuseio da amostra, foi feita uma porta frontal, mais leve e, para manutenção e limpeza, foi feita uma porta superior, contendo os reatores e as lâmpadas (Figura 23). Isto fornece facilidade e segurança para a utilização da câmara. As portas são presas com dobradiças resistentes.

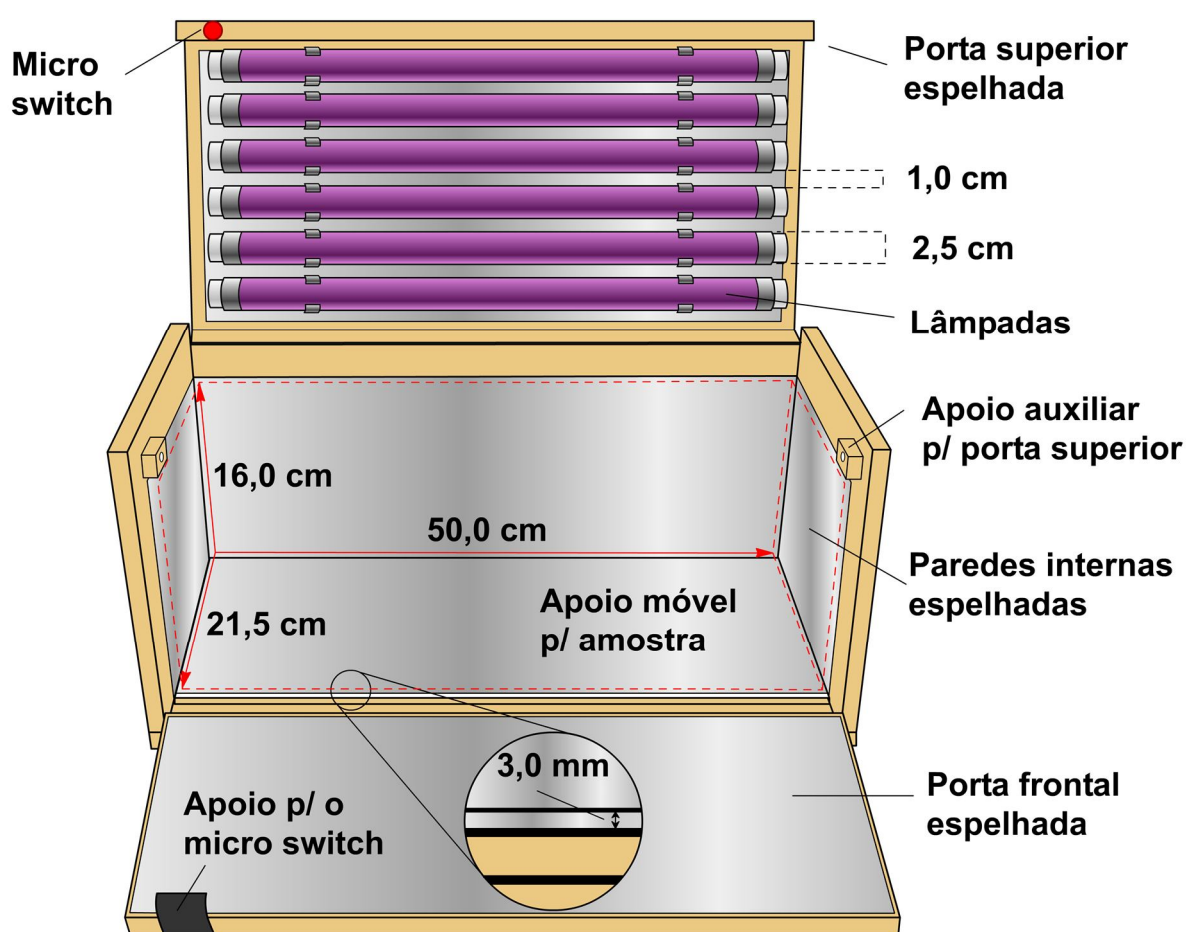


Figura 23. Reator fotoquímico com as portas frontal e superior abertas, mostrando as lâmpadas e o espaço interno disponível para amostras.

Nesta câmara, é possível estender capilares com até 50,0 cm de comprimento sem a necessidade de torção. Além disso, as lâmpadas de 15 W utilizadas têm aproximadamente 46 cm de comprimento, de forma que esta configuração favorece polimerização homogênea ao longo da coluna. A largura

transversal de 21,5 cm foi calculada em função do número de lâmpadas utilizadas, bem como dos espaços entre elas (6 x (2,5 cm de diâmetro + 1 cm de espaço), aproximadamente). A altura de 16,0 cm possibilita a disposição da amostra, no apoio móvel, em diferentes distâncias a partir da fonte de emissão. Isso pode alterar a temperatura de trabalho, devido à influência na dispersão de calor gerado pelas lâmpadas após algum tempo em funcionamento, bem como alterar o tempo de polimerização, devido à proximidade do capilar à fonte de radiação. No caso dos capilares transparentes de sílica, é possível que o material fotossensível seja totalmente exposto à luz sem a necessidade de girá-lo, como mostra a Figura 24.

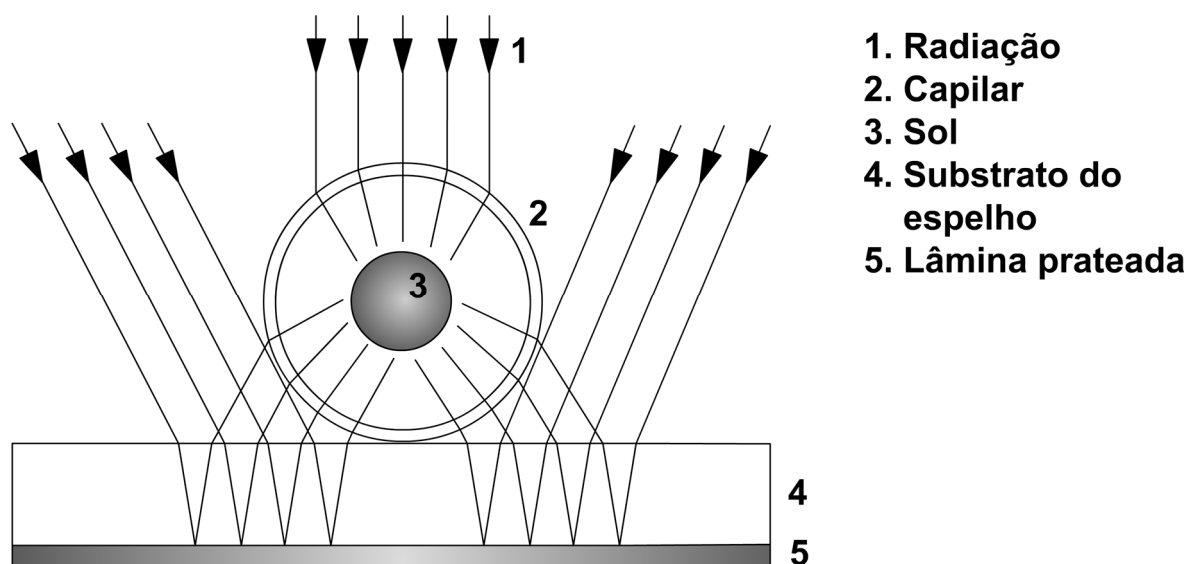


Figura 24. Esquema mostrando diferentes ângulos de incidência da luz sob a solução fotopolimerizável na seção transversal do capilar.

Para o funcionamento das lâmpadas fluorescentes, são necessários três reatores elétricos, um para cada duas lâmpadas, específicos para cada faixa de potência. Como as lâmpadas foram instaladas no teto, a melhor posição para a instalação dos reatores foi acima da porta superior, permitindo maior facilidade na instalação elétrica. Desta maneira, as lâmpadas ficaram separadas dos reatores pelo espelho e pela tampa de madeira de 15 mm. Para evitar aquecimento das lâmpadas sobre os reatores ou vice-versa, o compartimento dos reatores foi perfurado para aumentar a circulação de ar.

4.1.2 Mudança na faixa espectral de emissão

Lâmpadas fluorescentes são tubos de vidro revestidos internamente com um material sólido que absorve a radiação dos átomos de mercúrio excitados, no estado gasoso a baixa pressão. Este revestimento, quando absorve os fótons provindos do mercúrio, emite uma radiação própria de comprimentos de onda na faixa do UV em função da mistura de substâncias que compõe o material. A câmara foi inicialmente configurada, no projeto de Mestrado, com quatro lâmpadas negras e duas brancas com faixa espectral de emissão abrangendo o espectro visível e parte do UV.

A Figura 25 apresenta os espectros de emissão de uma lâmpada negra, uma branca e as duas ligadas simultaneamente, obtidos com auxílio de um cabo de fibra ótica no espectrofotômetro USB 2000. Alguns testes foram feitos com sóis em frascos de 1 mL utilizando-se apenas um tipo de lâmpada. As lâmpadas negras apresentaram uma eficiência nitidamente maior do que as lâmpadas brancas na polimerização. Somente após uma hora, o sol começou a perder viscosidade (obtenção de gel) com as duas lâmpadas brancas. Isto é explicado, pois a potência luminosa da lâmpada branca é distribuída em uma faixa de comprimentos de onda maior (400 a 700 nm) do que a de uma lâmpada negra (350 a 400 nm). Com o uso somente das lâmpadas negras foi possível a obtenção de gel logo em torno de 20 minutos. Assim, a primeira modificação na câmara foi a substituição das duas lâmpadas brancas por mais duas negras.

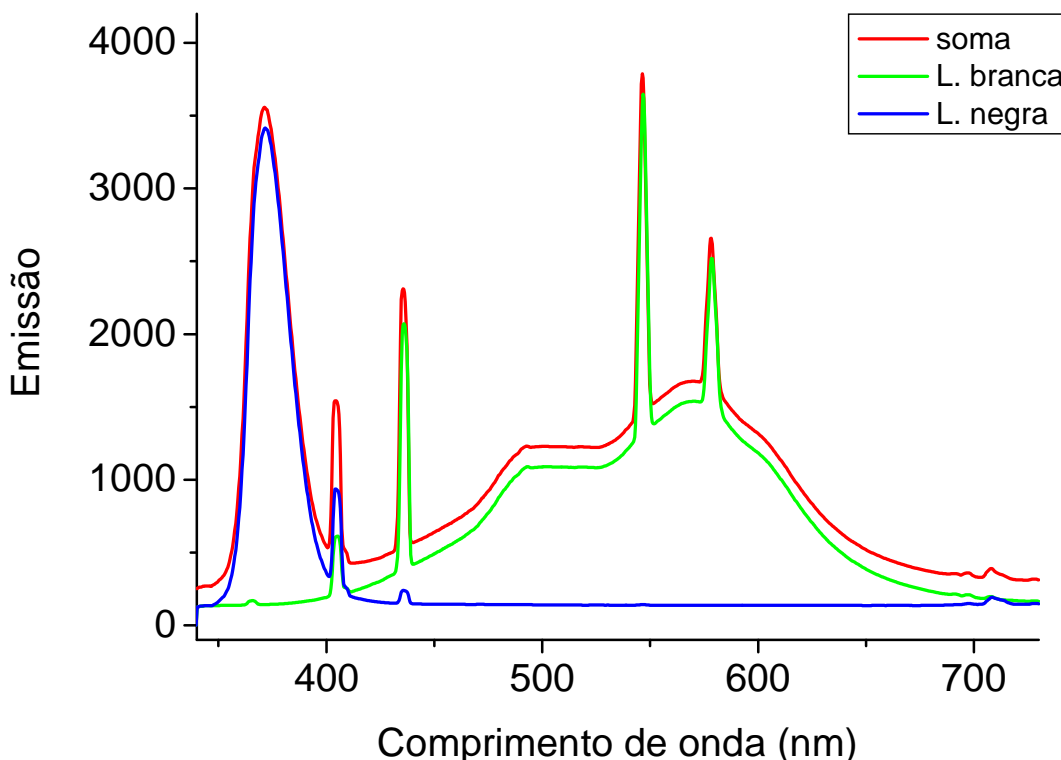


Figura 25. Espectros de emissão de uma lâmpada negra, de uma lâmpada branca e das duas lâmpadas ligadas juntas (soma) no interior da câmara.

Para fins de ilustração, a Figura 26 mostra o espectro de absorbância do fotoiniciador polimérico Irgacure 819, juntamente com o espectro de transmitância de um filme de poliacrilato (300 μm de espessura – caminho ótico) que representa o revestimento de um capilar e o espectro de emissão de uma lâmpada fluorescente negra da própria câmara. Embora não seja possível retirar informações quantitativas destes espectros reunidos, é possível observar uma região crítica, de 350 a 400 nm, na qual o fotoiniciador apresenta grande absorbância (máximo em 375 nm), de forma que pequenas concentrações sejam suficientes para uma polimerização satisfatória; o poliacrilato apresenta certa transparência, lembrando que este espectro foi obtido com um filme de 0,3 mm de espessura, cerca de 10 vezes a mais do que o revestimento do capilar; e a lâmpada negra emite a maior parte de sua luz. A curva de transmitância do poliacrilato pode ser entendida como uma janela através da qual a luz (espectro de emissão) tem passagem para incidir no fotoiniciador (espectro de absorção). Este casamento possibilitou a fotopolimerização das FEM

sem a remoção do revestimento, fato inédito até publicação de artigo descrevendo estes processos (VAZ *et al.*, 2008b).

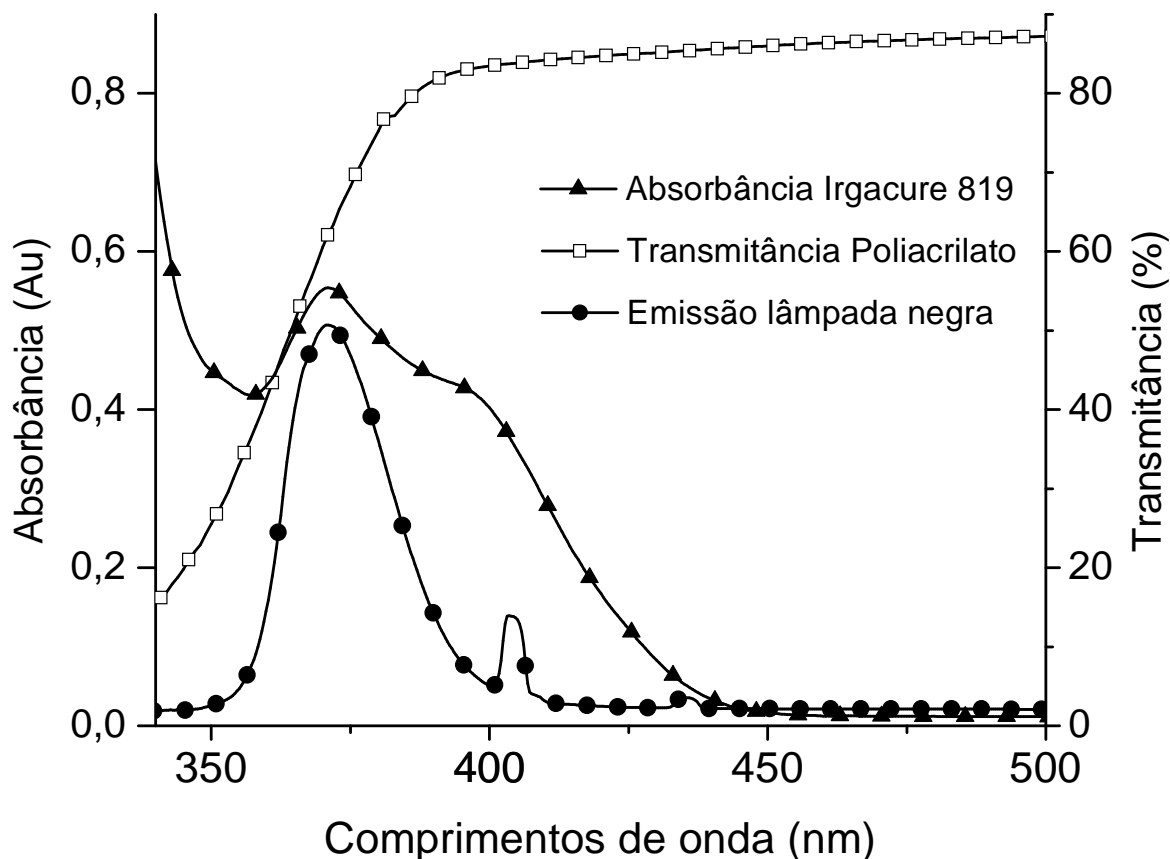


Figura 26. Espectros de absorvância do Irgacure 819 (0,03 % m/v, dissolvido em tolueno); de transmitância de um filme de poliacrilato (0,3 mm de espessura) e de emissão (escala não mostrada) de uma lâmpada fluorescente negra.

4.1.3 Melhorias na segurança

A Figura 27 mostra os detalhes do circuito, que é composto pelo temporizador digital com a função de controlar a chave liga-desliga associado aos três reatores elétricos em paralelo com suporte para duas lâmpadas de 15 W cada. Os reatores utilizados podem operar com voltagem ajustada para 110 ou 220 V. No presente trabalho optou-se por 110 V. Para proteção do circuito e componentes elétricos, foi instalado um fusível de 1,5 A na fase do circuito.

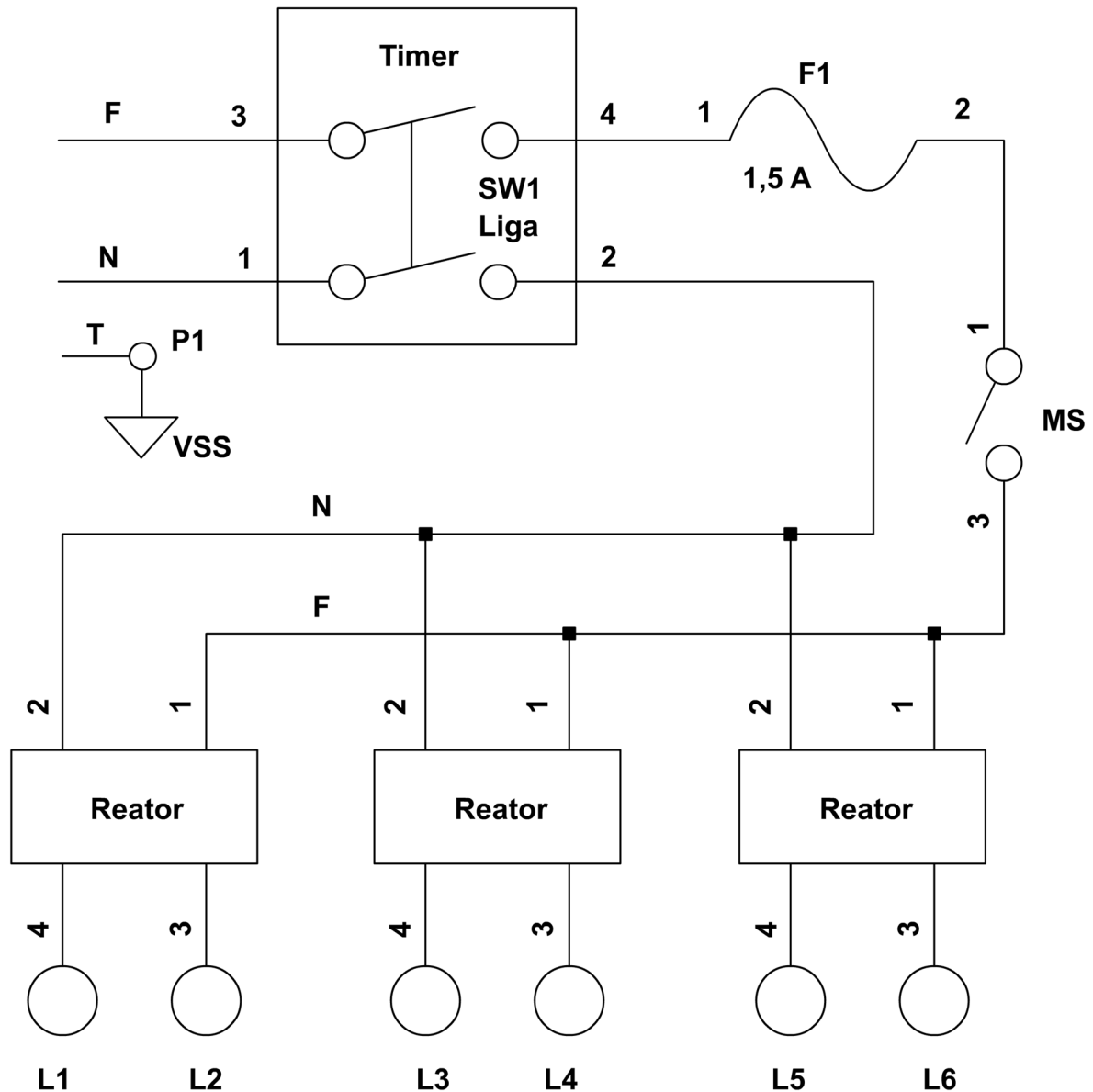


Figura 27. Esquema do circuito de alimentação elétrica utilizado na montagem da câmara. F: fase; N: neutro; T: terra; F1: fusível; MS: micro switch; L1-6: lâmpadas fluorescentes negras.

É importante que o equipamento ofereça segurança, por se tratar de um dispositivo que contém seis lâmpadas negras, que emitem luz na região do UV. Em função disto, entre o temporizador digital e os reatores, foi instalado um *micro switch* na fase do circuito, dispositivo que interrompe a passagem de corrente elétrica, caso as portas sejam abertas (efeito similar ao de um microondas doméstico), evitando que o operador seja exposto à radiação, possivelmente danosa à saúde (Figura 28).

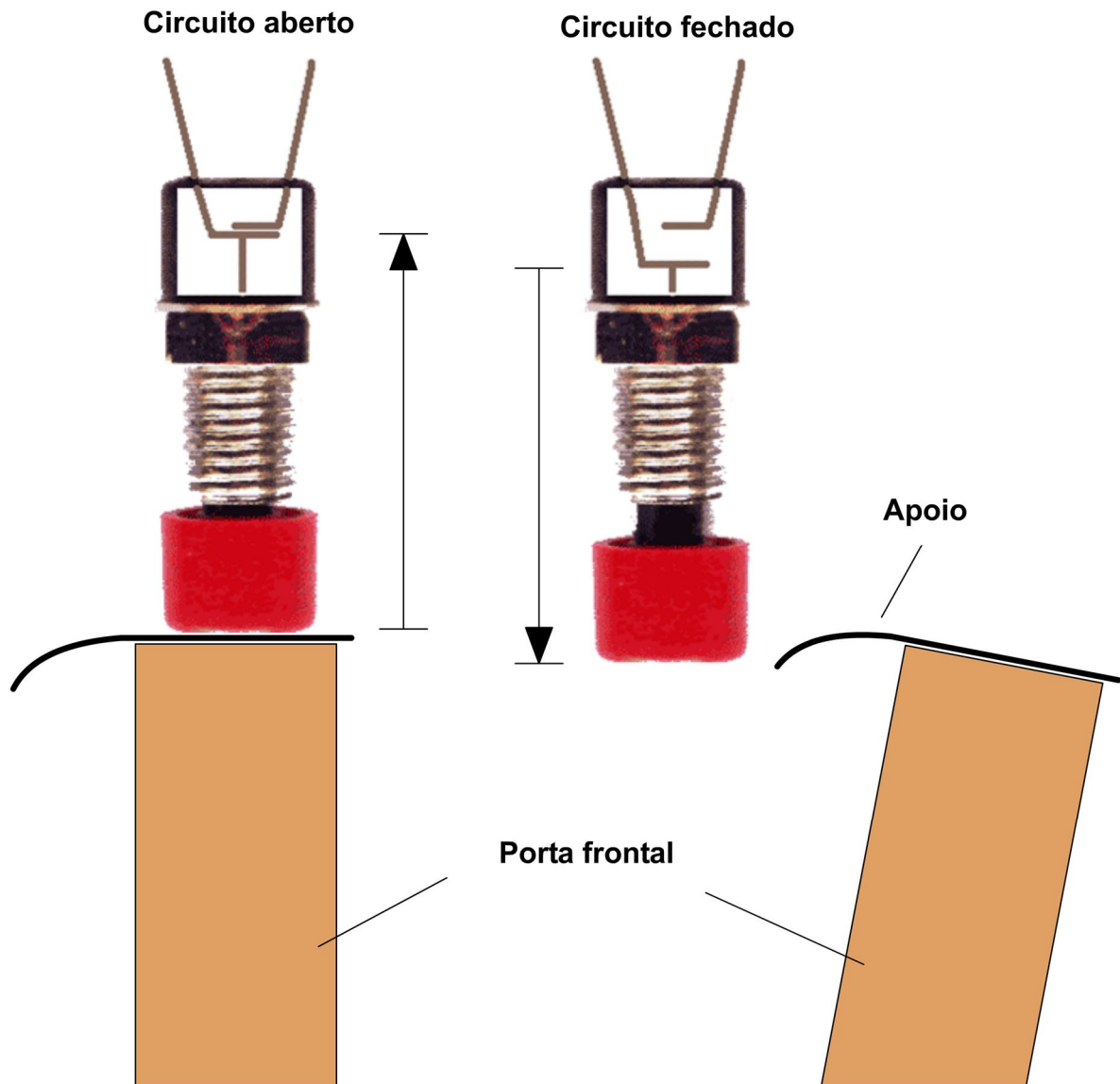


Figura 28. Esquema de funcionamento do micro switch. À esquerda, a porta frontal está fechada e o circuito elétrico está sendo alimentado. À direita, com a porta aberta, o circuito se abre, interrompendo a alimentação.

Em resumo, as modificações feitas na câmara foram indispensáveis para um trabalho mais eficiente, uma vez que lâmpadas brancas, que não contribuíram para fotoiniciação, foram substituídas por lâmpadas negras, que se mostraram muito mais adequadas; mais seguro para o operador, já que foi feita a instalação de micro switch que interrompe instantaneamente o funcionamento da câmara com a abertura da porta; e mais seguro para o próprio sistema elétrico e lâmpadas, após instalação de fusível apropriado.

4.2 CONSTRUÇÃO DE DISPOSITIVO DE PREENCHIMENTO A ALTA PRESSURIZAÇÃO

Para que se tenha um melhor controle na injeção de fases líquidas no interior de tubos com dimensões capilares, é necessária a utilização de um dispositivo que forneça alta pressão com grande precisão, mas, contudo, simples e barato. A Figura 29 ilustra tal dispositivo, que consiste num suporte rígido que prende uma seringa e um parafuso pela rosca de tal forma que ao ser girado, avança em direção à seringa, que expelle o líquido. A seringa, por sua vez, é acoplada ao capilar pela agulha, com o auxílio de conexões do tipo poli(éter-éter-cetona) (do inglês *poly(ether ether ketone)*, PEEK) típicas de equipamentos de CLAE. Seringas de diferentes volumes podem ser utilizadas. Um protótipo deste dispositivo de alta pressurização (DAP) foi construído em conjunto com o Professor José Paulo do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, atualmente da Universidade Federal de São João Del Rei.

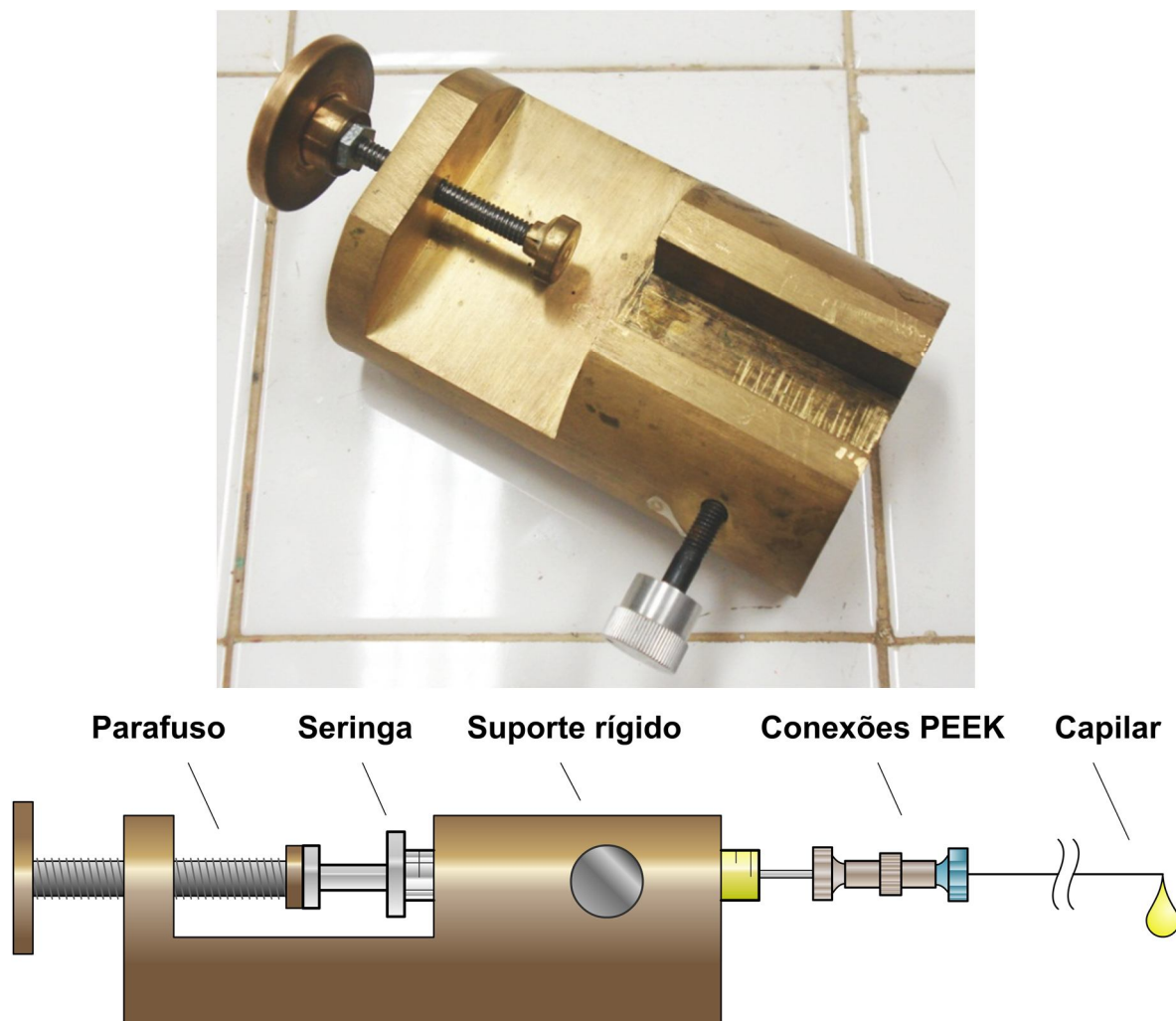


Figura 29. DAP para injeção de líquidos em tubos capilares. O parafuso lateral (parte inferior da foto) funciona firmando a proteção da seringa.

4.2.1 Conexões entre seringas e capilares

Antes da utilização das conexões PEEK vale lembrar que havia uma grande limitação tanto para os pré- e pós-tratamentos quanto para a inserção da solução sol no capilar. Inicialmente era utilizada uma borracha tubular de silicone, em que uma das extremidades era encaixada na agulha da seringa e a outra em uma das pontas do capilar. Porém, durante a passagem das soluções ou solventes, havia vazamentos constantes entre as partes ligadas, além do grande consumo de borracha cujos desgastes encurtam sua vida útil.

As conexões PEEK, por outro lado, são desenhadas com dimensões específicas para encaixar tanto nos capilares quanto na agulha da seringa. Diferentes conexões podem ser utilizadas em função do tipo e tamanho das seringas, agulhas e capilares (Figura 30). Sendo assim, o problema de vazamentos foi eliminado, evitando qualquer tipo de contaminação ou intoxicação dos operadores pelos reagentes e solventes (lembrando que são utilizados solventes orgânicos tóxicos como o tolueno). Entretanto, mesmo que a comunicação entre os ambientes da seringa e do capilar tenha sido mais eficiente e homogênea, ainda persiste outro problema que foi minimizado com o uso das conexões PEEK: o retorno de sol no sentido capilar-seringa, quando é desacoplado o capilar da seringa. Para o preenchimento de sol, que deve ser controlado em uma distância determinada, este problema é relevante. Para contorná-lo, o sol é inserido um a dois centímetros a mais e a FEM em excesso é posteriormente cortada.

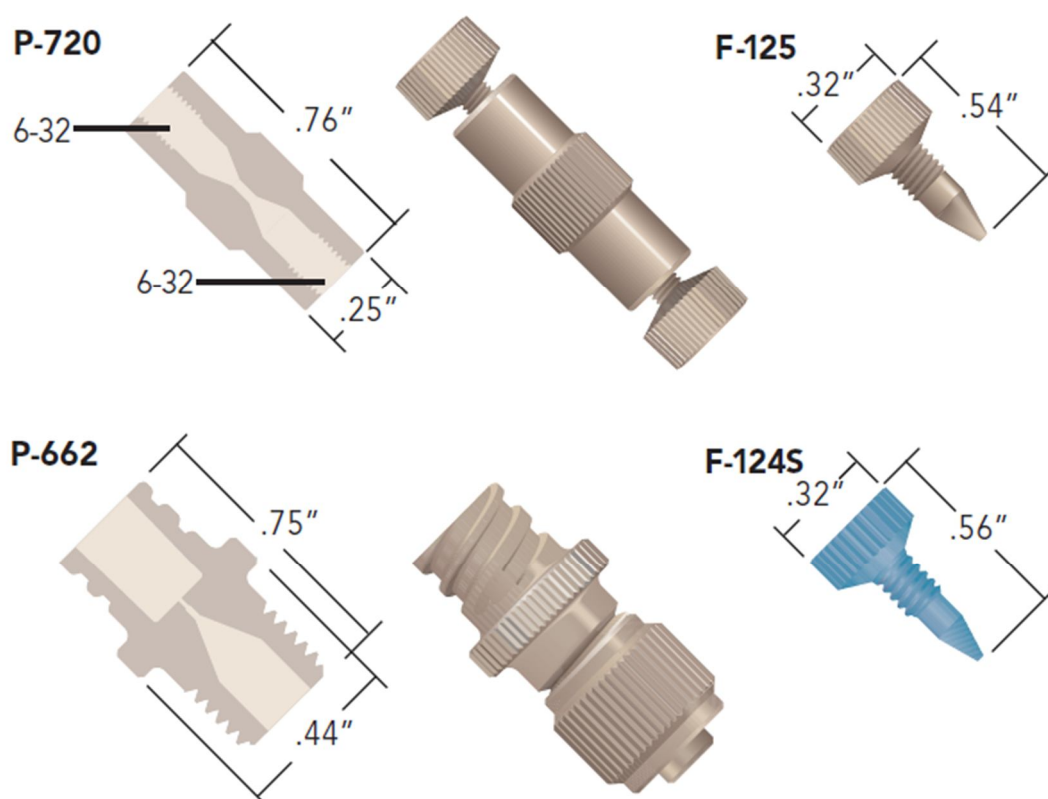


Figura 30. Conexões PEEK. Uniões True-ZDV para micro luvas (P-720); adaptadores do tipo Luer-to-Microtight (P-662); conectores padrão do tipo Microtight (F-125) e conectores para tubos de 360 µm d.e., Blue PEEK (F-124S).

As conexões P-720, juntamente com a F-125 e a F124S, foram utilizadas para conectar o capilar na seringa de 25 μL (Figura 31), útil para preenchimento controlado de sol, uma vez que seu êmbolo mais fino expelle menos líquido. Já a seringa de 50 μL (Figura 32), mais adequada para limpeza e condicionamento da FEM recém-preparada, é conectada ao capilar pela conexão P-662.

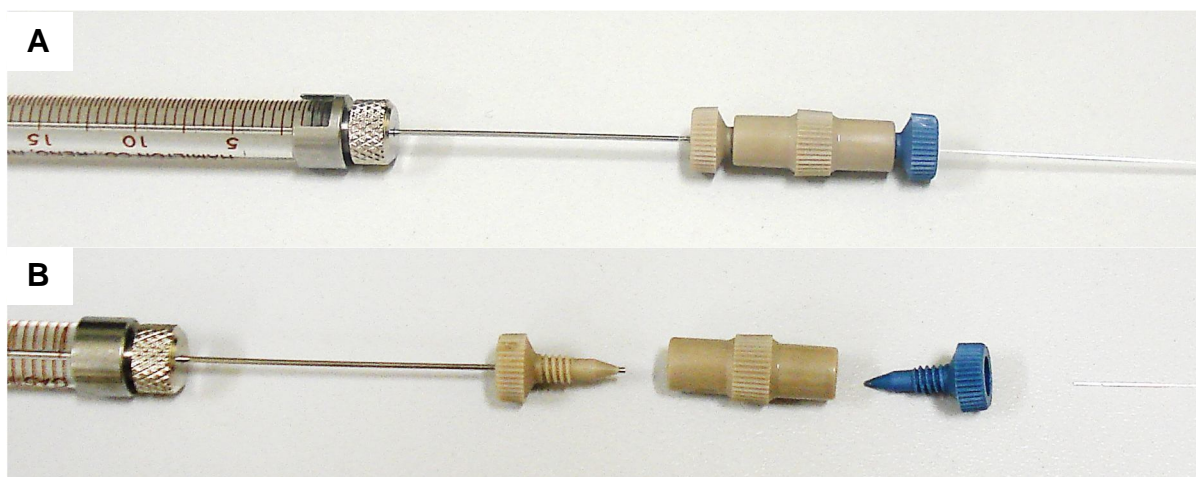


Figura 31. Seringa Gastight de 25 μL com agulha fixa A) acoplada ao capilar e B) desacoplada, mostrando os detalhes da conexão P-720.

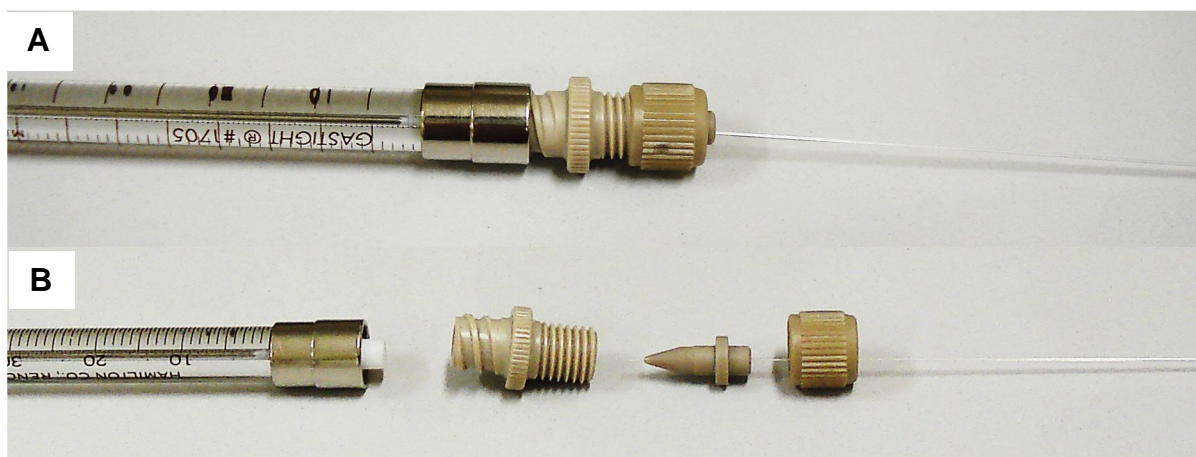


Figura 32. Seringa Gastight 50 μL do tipo luer-lock A) acoplada ao capilar e B) desacoplada, mostrando os detalhes da conexão P-662.

4.2.2 Teste do DAP

Com o sistema DAP e as conexões PEEK é possível, por exemplo, aplicar certa pressão ao êmbolo de seringas de plástico de 1 mL, com abertura do tipo *luer-lock*, de forma que ele mantenha um fluxo contínuo de solvente pelo capilar ou coluna por mais de 10 minutos, tempo suficiente para realizar um pós-tratamento ou um pré-condicionamento do capilar. Como não foi possível medir tal pressão, um treinamento de operação com o sistema ainda é mais indicado.

O DAP foi devidamente testado no que se refere ao avanço. Para cada volta do parafuso (sentido horário), o avanço é de 1,26 mm. Com uma seringa de vidro de 1 mL adquirida em comércio local, por exemplo, este avanço é suficiente para expelir aproximadamente 44,5 mg (44,5 μ L) de água por volta (inclinação da regressão linear da Figura 33). Para verificação da linearidade do modelo de previsão, foi feito um teste de falta de ajuste. O valor de $F = 0,70$, menor do que o valor tabelado ($F_{49,9} = 2,81$) (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2007), indica que o modelo linear $m = 0,0445 \cdot N - 0,0180$ descreve satisfatoriamente os pontos observados, com o nível de confiança de 95 %.

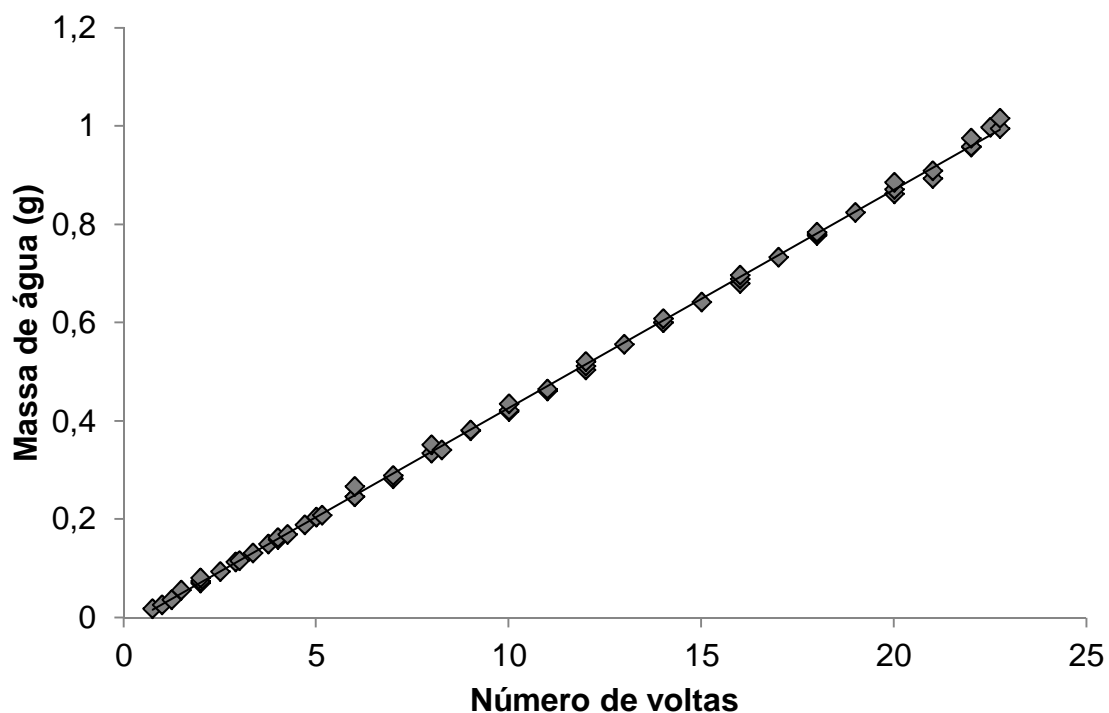


Figura 33. Gráfico da vazão de água em função do número de voltas do parafuso de avanço do DAP com uma seringa comercial de 1 mL. Regressão linear: $m = 0,0445 \cdot N - 0,0180$. $R^2 = 0,9994$. Teste F: 0,70, para $F_{49;9} = 2,81$, (nível de 95 %).

Como o DAP se mostrou bastante robusto do ponto de vista mecânico, os fatores limitantes para um bom desempenho do sistema passaram a ser o diâmetro interno e tipo de seringa (plástico ou vidro), diâmetros da agulha e do capilar. Tendo em vista que seringas de vidro se mostraram bastante quebradiças, melhores resultados foram obtidos com o uso de uma proteção de acrílico e tiras de etil vinil acetato (EVA), que distribuem a tensão entre seringa e o suporte. Algumas colunas foram preenchidas através de seringas de insulina de 30 unidades (300 μ L). Porém, estas requerem o uso dos tubos de silicone entre a agulha fixa e o capilar, o que compromete a precisão do preenchimento. O pequeno diâmetro desta seringa (~3,0 mm) requer um avanço de êmbolo relativamente maior para empurrar certo volume. Isto, na verdade, é uma vantagem, já que o diâmetro do capilar é reduzido (da ordem 0,100 mm). Entretanto é possível mostrar que, com o avanço de uma volta do parafuso do DAP (1,26 mm), o volume expelido da seringa de insulina é suficiente para preencher um metro de capilar com 100 μ m de d.i. Como o preenchimento deve ser controlado na ordem de centímetros, isso motivou a redução do diâmetro

interno da seringa e a obtenção de seringas de injeção para cromatografia a gás (CG), com volumes de 25 e 50 μL .

O mesmo teste foi feito com a seringa modelo Gastight de 25 μL . Com o avanço do DAP de 1,26 mm/volta, a liberação de água foi de aproximadamente 0,5 mg por volta (inclinação das curvas da Figura 34), valor suficientemente baixo para se ter um controle de injeção. Novamente, o valor de $F = 0,48$, ficou abaixo do valor tabelado ($F_{3,10} = 3,71$), confirmando a linearidade do sistema, com o nível de 95 % de confiança.

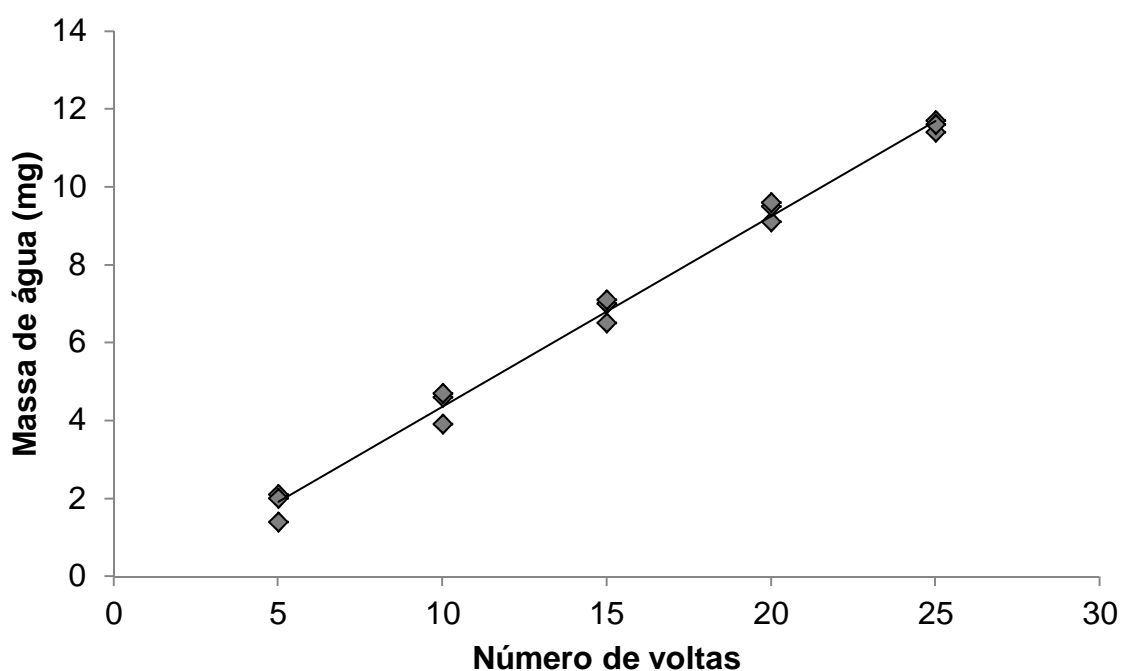


Figura 34. Gráfico da vazão de água em função do número de voltas do parafuso de avanço do DAP com seringa Gastight de 25 μL . Regressão linear: $m = 0,4893 \cdot N - 0,5267$. $R^2 = 0,9933$. Teste F: 0,48, para $F_{3;10} = 3,71$, (nível de 95 %).

Um segundo dispositivo de alta pressurização (DAP-2) proposto foi construído no Laboratório do Núcleo de Espectroscopia de Materiais do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG (Figura 35). Diferentemente do protótipo anterior, o DAP-2 possui duas entradas para seringas, sendo uma menor, para micro seringas e outra maior, para seringas de plástico comerciais. Outra diferença está na forma como o parafuso empurra o êmbolo. O parafuso em si não possui avanço, uma plataforma móvel é que avança ou recua na direção de

percurso do êmbolo, enquanto o parafuso é girado. O avanço da plataforma é de 1,40 mm por volta do parafuso no sentido anti-horário, sendo que com a seringa modelo Gastight de 25 μL , isso equivale à liberação de 0,53 μL por volta (inclinação da curva da Figura 36). A construção deste DAP-2 foi um pouco mais complicada, mas possibilitou o uso de um percurso maior, de 12 cm, o equivalente a 85 voltas. O valor de $F = 0,18$, abaixo do valor tabelado ($F_{2;8} = 4,46$), mostra que este DAP-2 se mostrou linear.

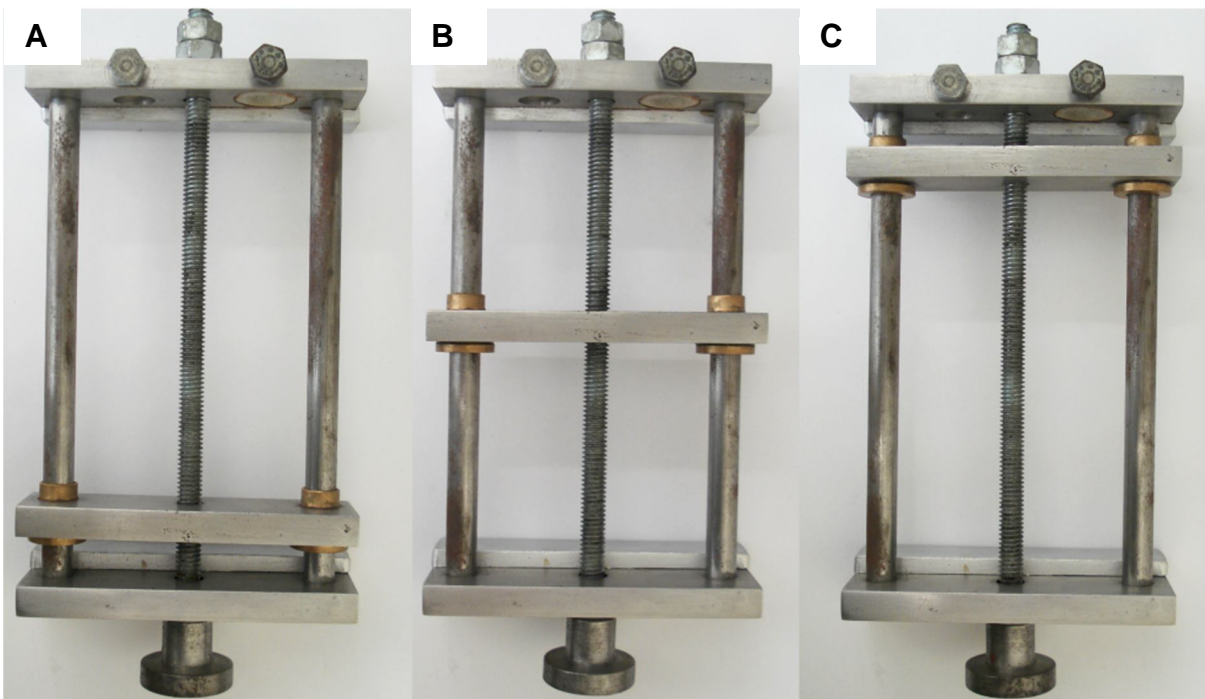
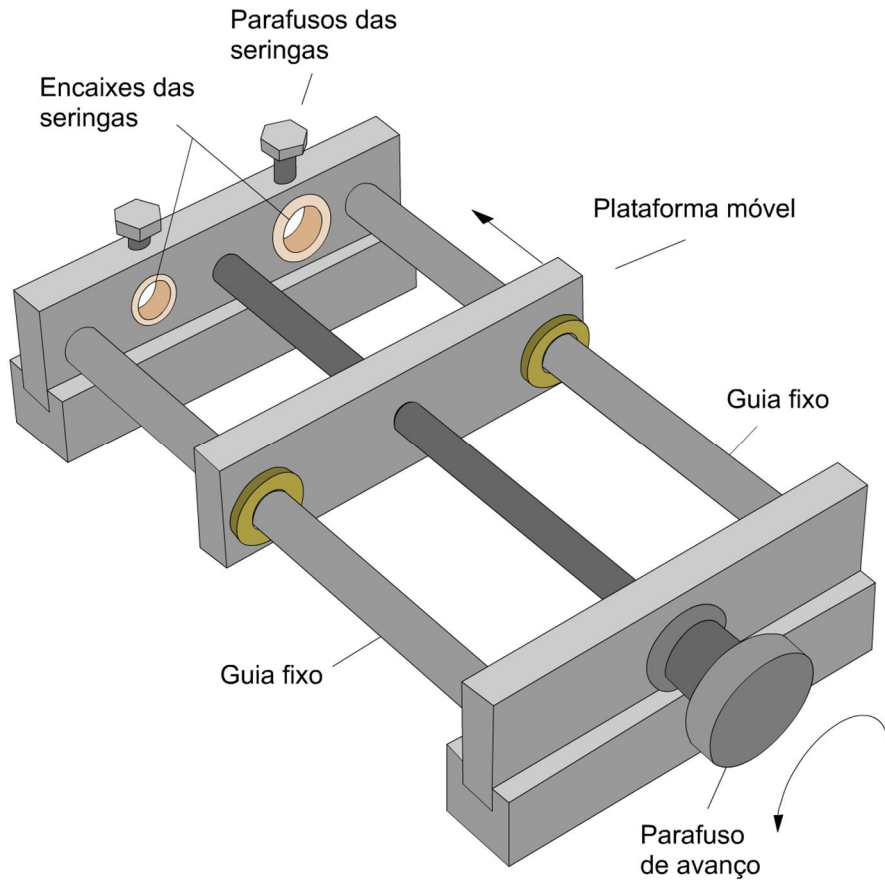


Figura 35. DAP-2 para injeção controlada com capacidade para duas seringas, com a plataforma de avanço nas posições A) recuada, B) intermediária e C), avançada.

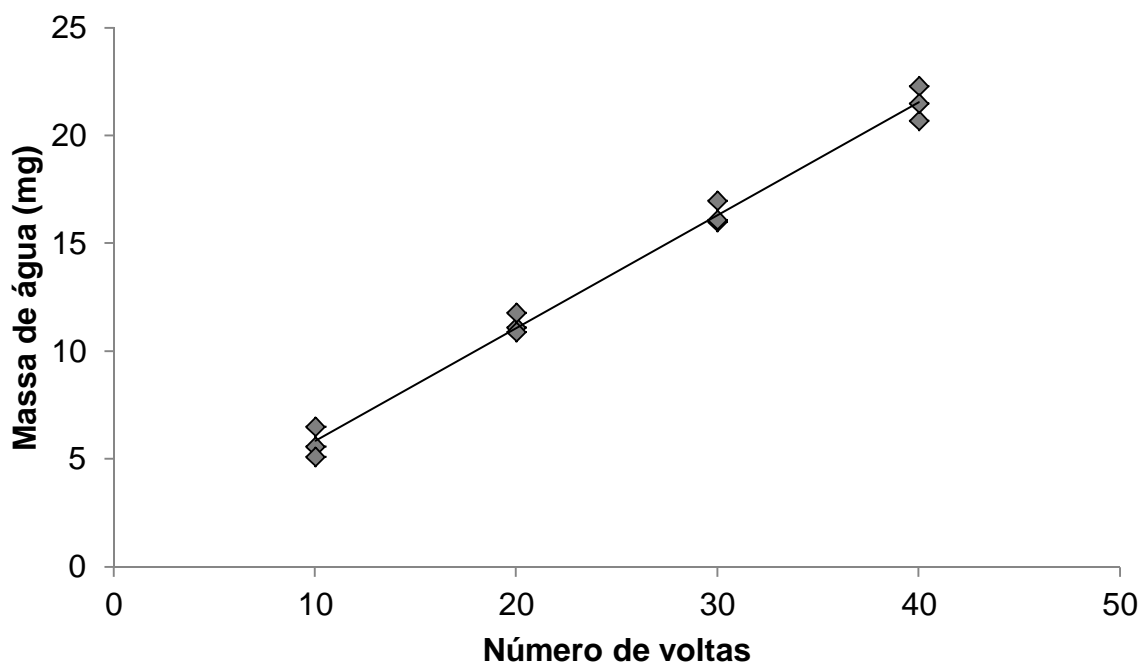


Figura 36. Gráfico da vazão de água em função do número de voltas do parafuso de avanço do DAP-2 com uma seringa Gastight de 25 μ L. Regressão linear: $m = 0,524 \cdot N + 0,617$. $R^2 = 0,9916$. Teste F: 0,18, para $F_{2,8} = 4,46$, (nível de 95 %).

A vantagem dos DAP não está somente na praticidade e controle de injeção, mas também houve grande influencia na homogeneidade e controle do preenchimento e nos resultados finais de separação por ECC, no que se refere à eficiência. Além disso, possui ótima relação custo-benefício, comparado a modelos comerciais. Uma bomba de infusão digital, que poderia ser utilizada para esta finalidade, tem o custo que varia de 300,00 a R\$ 8.000,00, dependendo de modelo, precisão, tipo de seringa entre outros.

Comparando-se os dois DAP construídos, o segundo é muito mais leve e possui proporções mais adequadas para vários tamanhos de seringas. Embora o DAP-2 possua dois encaixes, é desaconselhável o preenchimento simultâneo e controlado de dois capilares. Como o diâmetro interno dos capilares é muito pequeno, a sensibilidade no preenchimento é grande, o que requer uma atenção focada para se obter exatidão. Para operações mais simples de limpeza e condicionamento de capilares ou FEM, não há problemas em relação ao uso simultâneo de duas seringas.

4.3 OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DE COLUNAS COM AUXÍLIO DA QUIMIOMETRIA

4.3.1 Elaboração do planejamento 2^{4-1}

Em geral, costuma-se otimizar métodos de forma uni variada, ou seja, cada parâmetro (ou fator ou variável) do sistema é investigado separadamente enquanto os outros fatores, já avaliados ou não, são mantidos constantes. No entanto, com este tipo de otimização, corre-se o risco de se obter um resultado “ótimo relativo”, que pode ser diferente em outra combinação de condições ou níveis.

A otimização chamada *multivariada*, como o nome sugere, consiste na realização de experimentos com diferentes combinações de níveis e vem despertando interesse tanto em contexto acadêmico quanto industrial. Ao contrário das otimizações uni variadas, uma das principais vantagens em se desenvolver um planejamento de experimentos multivariado é que se torna possível, através de um número reduzido de experimentos, conhecer o sistema de maneira abrangente, isto é, os fatores são analisados simultaneamente (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2007). Esta ferramenta estatística é muito atraente quando se tem pouca informação sobre o sistema a ser otimizado e muitas variáveis.

Como uma otimização de preparo de FEM possui certa complexidade experimental, já que ele envolve o preparo de soluções e misturas, pré-tratamento e preenchimento de capilares e análise eletrocromatográfica, deve-se procurar limitar o número de experimentos, mesmo que as variáveis sejam muitas. Pensando nisso, o estudo quimiométrico empregado neste trabalho, de caráter qualitativo, consistiu na avaliação de quatro fatores envolvidos no preparo da FEM, possivelmente influentes no desempenho eletrocromatográfico. Foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , cujos fatores e seus respectivos níveis estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores e níveis do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

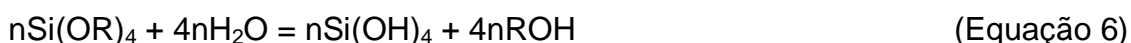
Fatores	Níveis	
	-	+
X ₁ - Tolueno / monômero (% v/v)	80	90
X ₂ - Irgacure 819 (% m/m)	1,5	3,5
X ₃ - H ₂ O (mol _{H₂O} / mol _{MPTMS})	4	5
X ₄ - Tempo de incidência UV (min)	10	30

Onde: X₁: Porcentagem de tolueno sobre a solução monomérica. X₂: Porcentagem da massa de Irgacure 819 sobre a massa de MPTMS. X₃: Razão molar entre a água (da solução de HCl 0,12 mmol L⁻¹) e o MPTMS. X₄: Tempo utilizado para promover a fotopolimerização na câmara de luz UV.

O fator X₁, porcentagem de tolueno sobre monômero, por se tratar de um componente que tem a função de solvente e de porogênio, é de se esperar grande influência na porosidade e resistência física de uma FEM, o que vai refletir nas taxas de transferência de massa de solventes e integridade da coluna de modo geral.

A quantidade de fotoiniciador, expressa em termos de porcentagem de massa de Irgacure 819 por massa de MPTMS, foi baseada na recomendação do fabricante (CIBA, 2003), que seria de 0,1 a 2,0 %, se não fosse a grande quantidade de solvente empregado. Em sistemas onde a porcentagem de solvente chega até a 90%, a quantidade de fotoiniciador deve ser maior para compensar a diluição.

Como a água é fundamental no processo de hidrólise (Figura 18), a quantidade ideal de água deve ser suficiente ou maior do que a calculada nas equações abaixo (KLEIN, 1987):



O tempo de exposição à luz UV é um fator que merece atenção, uma vez que a polimerização fotoiniciada ocorre nesta etapa. Embora o tempo varie entre diferentes autores (DULAY *et al.*, 2001; AUGUSTIN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007;

BERNABÉ-ZAFÓN *et al.*, 2009), este parâmetro precisa ser adaptado em função das características da câmara fotorreatora, dos reagentes e capilar utilizados neste trabalho.

A denominação 2^{4-1} indica que foram realizados 2^3 (oito) experimentos, sendo que, para os fatores X_1 , X_2 e X_3 , todas as combinações possíveis de níveis foram feitas. O fator X_4 foi *confundido* com os três primeiros, ou seja, o valor codificado do nível de um ensaio (-1 e 1) é o resultado da multiplicação dos níveis dos fatores X_1 , X_2 e X_3 do mesmo ensaio. Os níveis da Tabela 2 estão nas vizinhanças dos valores utilizados em experimentos preliminares. Como exemplo, o tempo de polimerização utilizado anteriormente com mais frequência era de 20 minutos. Para se explorar a influência deste fator, 10 e 30 minutos foram então selecionados. As combinações deste e dos demais fatores e seus diferentes níveis são mostradas na Tabela 3 e os valores experimentais relacionados são mostrados na Tabela 4:

Tabela 3. Matriz de planejamento com níveis codificados.

Ensaio	Fatores			
	(X_1)	(X_2)	(X_3)	(X_4)
1	-	-	-	-*
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

Observações: Descrição dos fatores, vide Tabela 2. O fator X_4 ou X_{123} tem como níveis os resultados da multiplicação dos níveis codificados dos outros fatores (X_1 , X_2 e X_3) (*confundimento*). *Exemplo: Nível do fator Tempo para o Ensaio 1 = $(-1) \cdot (-1) \cdot (-1) = -1$, simplificado para o sinal (-), como convenção.

Tabela 4. Valores experimentais correspondentes aos níveis do planejamento 2^{4-1} .

Ensaio	Frasco A*		Frasco B**		Tempo (min)
	Tolueno (mL)	Irgacure 819 (g)	H ₂ O (HCl 0,12 molL ⁻¹) (μL)	MPTMS (μL)	
1	8	0,0240	463	1537	10
2	9	0,0120	232	768	30
3	8	0,0559	463	1537	30
4	9	0,0280	232	768	10
5	8	0,0227	547	1453	30
6	9	0,0113	274	726	10
7	8	0,0529	547	1453	10
8	9	0,0264	274	726	30

Onde: *Frasco A: agitação de 5 min; ** Frasco B: agitação de 10 min. Mistura dos conteúdos dos frascos A e B: agitação de 30 min a 500 RPM.

Os ensaios foram executados de forma que as soluções fossem misturadas em agitador magnético de cinco pontos e os capilares fossem postos na câmara UV simultaneamente, respeitando-se os tempos de polimerização.

É importante salientar que todos os capilares revestidos com teflon que foram utilizados no preparo das FEM se danificaram durante o manuseio, antes ou no momento de instalação destes no cartucho ou mesmo no próprio equipamento de EC, impossibilitando qualquer tipo de teste eletrocromatográfico. A Figura 37 mostra os perfis dos eletrocromatogramas obtidos em cada condição em capilares revestidos com poliacrilato.

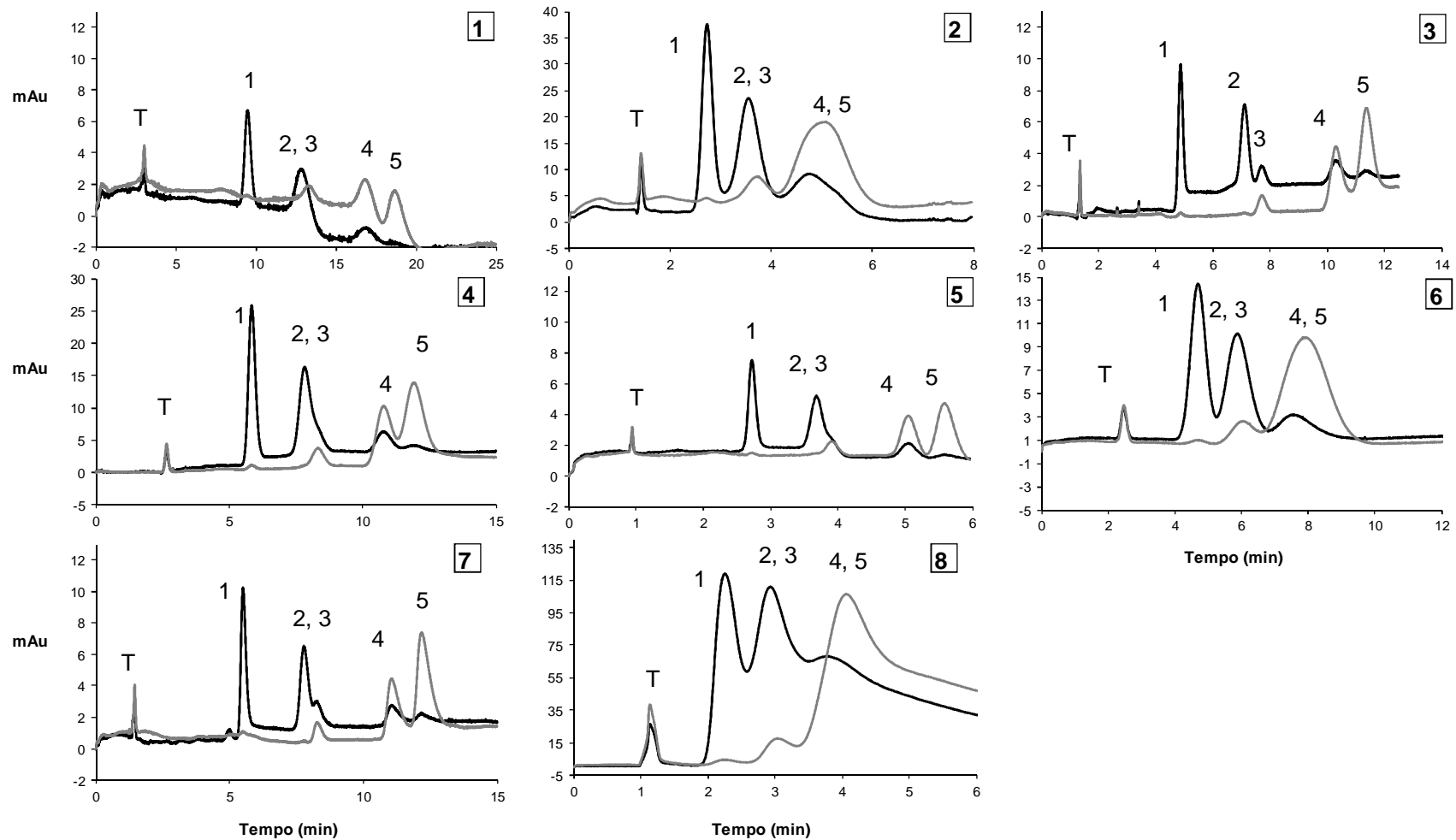


Figura 37. Eletrocromatogramas referentes ao planejamento fatorial 2^{4-1} , obtidos com FEM de 8,0 cm em capilares de 36 cm (27,5 cm efetivos) revestidos com poliacrilato. Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); voltagem: -20 kV; temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: 25 mbar x 5 s; detecção: 220 nm (linha preta) e 250 nm (linha cinza).

4.3.2 Seleção dos comprimentos de onda para detecção

Não foi possível escolher um único comprimento de onda que respondesse satisfatoriamente a todos os analitos empregados. Sendo assim, foi utilizada uma detecção com comprimentos de onda de 220 nm para naftaleno e acenafteno e 250 nm para fenantreno, antraceno e tiouréia. No caso do fluoreno, suas absorbâncias em 220 e 250 nm são bastante próximas, mas somente em 250 nm não há interferência do acenafteno. A Figura 38 mostra o eletrocromatograma da condição 3 em diferentes comprimentos de onda, utilizados para esta seleção e, em detalhe, os espectros UV de cada pico obtidos pelo DAD do equipamento de EC. Outros comprimentos de onda também foram investigados. Abaixo de 210 nm, o ruído da linha-base aumenta significativamente e, acima de 250 nm, o sinal analítico decresce, não havendo mais interesse nesta região.

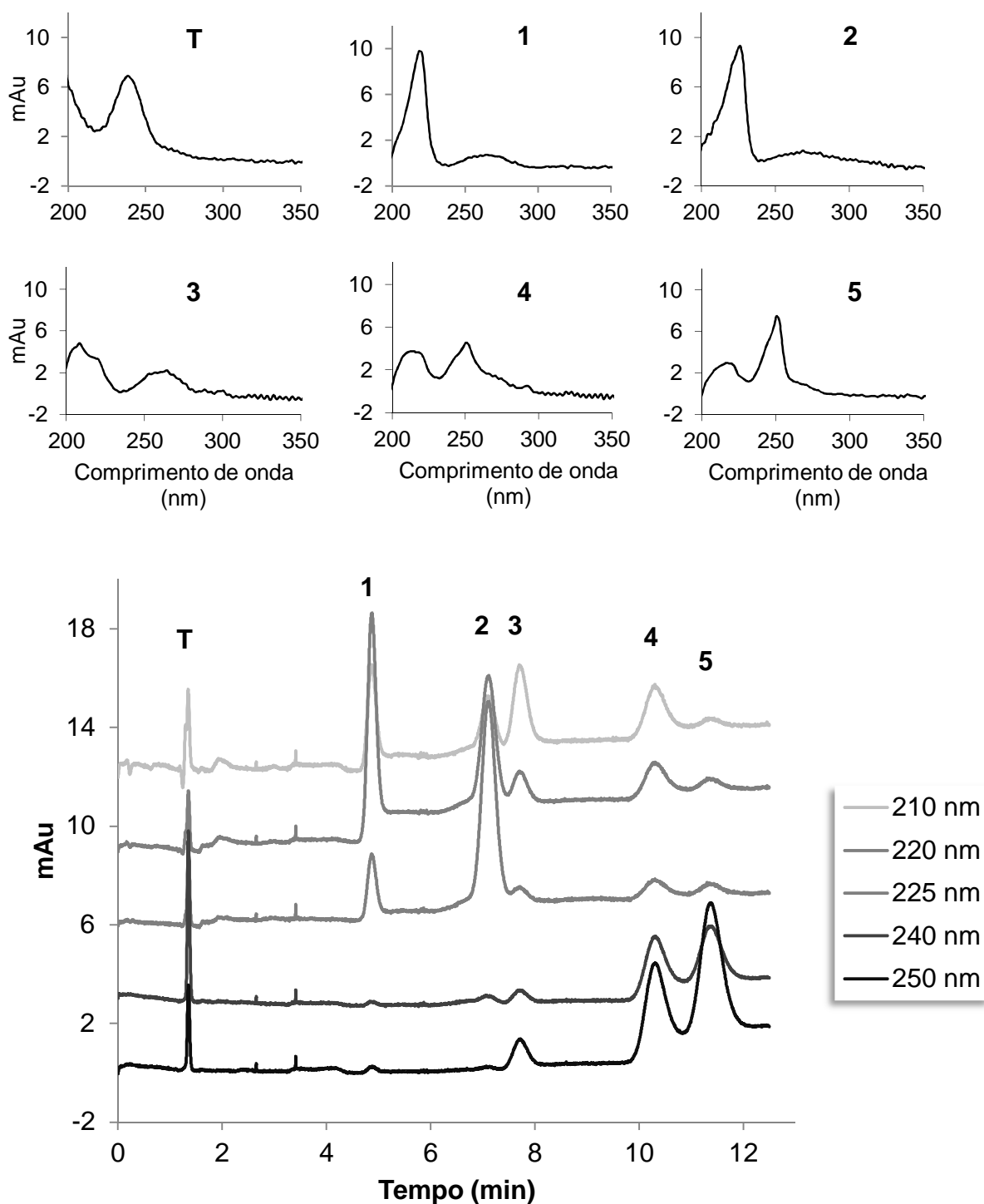


Figura 38. Eletrocromatograma referente à condição 3 do planejamento fatorial 2^{4-1} em diferentes comprimentos de onda e os espectros de cada pico. FEM de 8,0 cm em capilares de 36 cm (27,5 cm efetivos). Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); voltagem: -20 kV; temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: 25 mbar x 5 s.

Os picos dos HPA foram confirmados pela comparação dos seus respectivos espectros UV obtidos nas corridas eletrocromatográficas individuais com os espectros obtidos em solução metanólica no espectrofotômetro UV-vis (Figura 39).

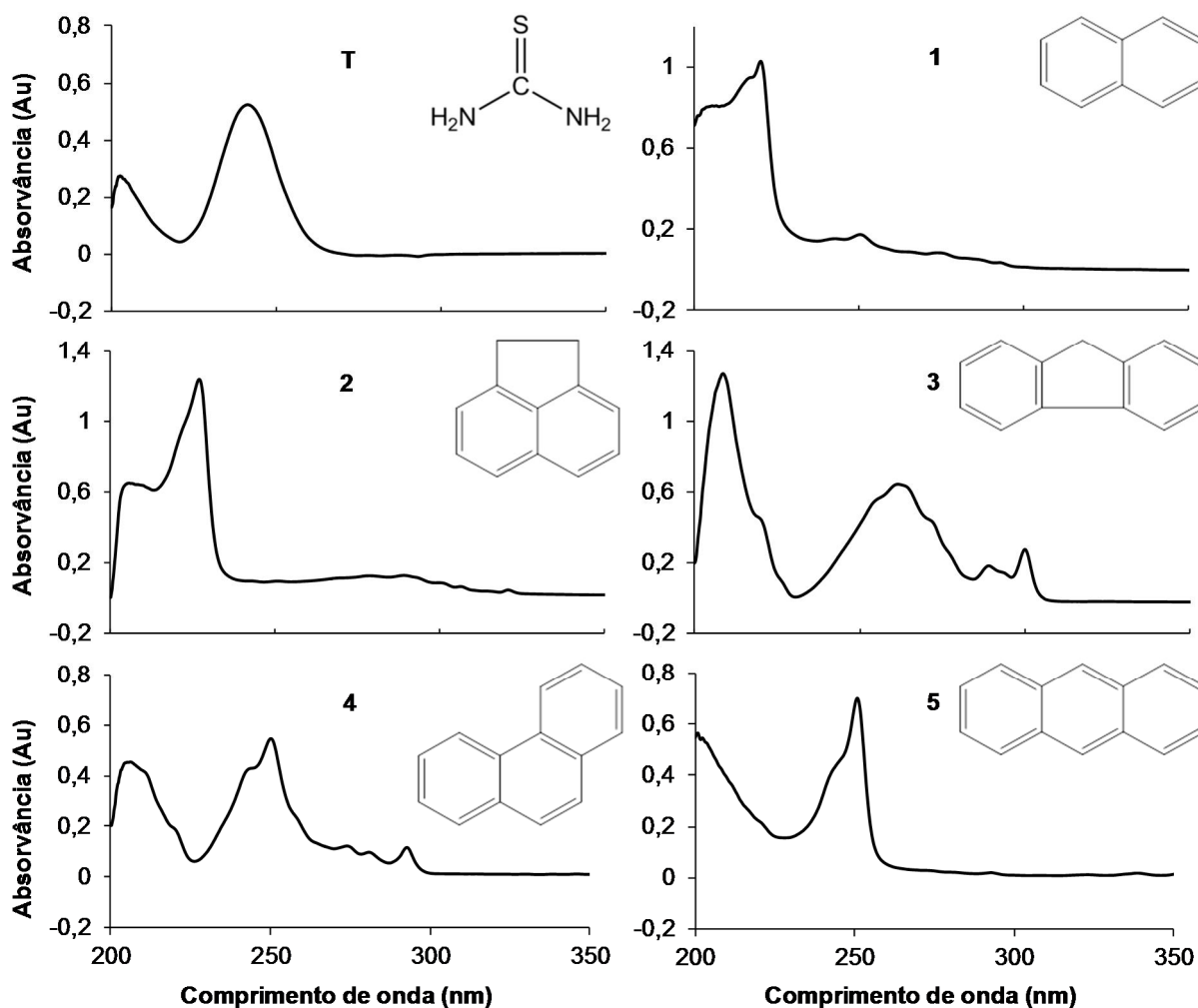


Figura 39. Espectros de absorção molecular no UV dos compostos em ordem de eluição: tiouréia ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), naftaleno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), acenafteno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), fluoreno ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), fenantreno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e antraceno ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), diluídos em MeOH.

4.3.3 Análise das respostas

Aqui, um fator que merece atenção é o tempo de incidência de luz UV para polimerização fotoiniciada. Tanto o grupo de experimentos de nível inferior igual a 10 minutos (experimentos 1, 4, 6 e 7) quanto o grupo de nível superior, de 30 minutos

(experimentos 2, 3, 5 e 8), resultaram em eletrocromatogramas sem distinção brusca entre os grupos. Mesmo que o tempo de 10 minutos fosse insuficiente para polimerização, não haveria nem monólito formado no capilar e muito menos indício de separação dos analitos nos eletrocromatogramas. Esta semelhança entre os grupos de níveis permite não apenas que o tempo de polimerização de 10 minutos seja empregado nos próximos experimentos ao invés de 20 ou 30 minutos, mas também que se aborde este fator como uma constante e não como uma variável. Dessa forma, a coluna X_4 da Tabela 3 pode ser desconsiderada e a matriz de planejamento pode ser simplificada para uma matriz de planejamento fatorial *completo* 2^3 (Tabela 5). Uma grande vantagem disso é que não foi preciso realizar os dezesseis experimentos (2^4) para se chegar a esta conclusão. Caso houvesse alguma diferença relevante entre os dois grupos citados, uma segunda tomada de experimentos (Ensaio 9-16) poderia ser feita, tornando o planejamento 2^{4-1} um planejamento fatorial completo 2^4 (denominado *fração complementar* (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2007)).

Tabela 5. Matriz codificada do planejamento 2^3 , derivada do planejamento 2^{4-1} .

Ensaio	Fatores			Y (respostas)		
	X_1	X_2	X_3	nº picos separados	Vazão	Tempo de análise
1	-	-	-	5	0,3	18,7
2	+	-	-	4	14,4	5,1
3	-	+	-	6	1,4	11,4
4	+	+	-	5	6,9	11,9
5	-	-	+	5	0,8	5,6
6	+	-	+	4	9,4	7,9
7	-	+	+	5	0,5	12,2
8	+	+	+	4	6,2	4,1

Observações: Descrição dos fatores, vide Tabela 2. As respostas compreendem: nº de picos separados; vazão de MeOH (mg/min); e Tempo (min) de migração do último analito (antraceno), tido como estimativa do tempo de análise.

Embora não tenha sido feitos os ensaios de níveis intermediários, chamados de ponto central e utilizados em triplicata para se obter o erro experimental, este planejamento 2^3 possui um caráter mais quantitativo e pode ser avaliado sem o *confundimento*.

As principais respostas (Y) neste estudo são: a separação dos picos dos padrões; a vazão de MeOH pela coluna e o tempo de análise. A separação dos picos foi analisada visualmente nos eletrocromatogramas, de forma que fossem contados o número de picos separados mais o número de grupos de picos coeluentes. Assim, dois ou mais picos coeluentes foram contados como um só.

As vazões foram obtidas aplicando-se pressão constante de 5 ou 8 bar a cada cinco minutos, até vinte minutos. O reservatório de saída, contendo o MeOH escoado, era pesado e retornado ao equipamento de EC para nova pressurização. Os dados deste estudo estão detalhados na Tabela 6.

Tabela 6. Massas (g) correspondentes à vazão de MeOH pelas colunas em função do tempo de aplicação da pressão.

Tempo (min)	Coluna							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0*	2,2466	2,3002	2,2439	2,2651	2,3262	2,3093	2,2507	2,2483
5	2,2476	2,3726	2,251	2,3006	2,33	2,356	2,2532	2,2839
10	2,249	2,4447	2,2589	2,3357	2,334	2,4021	2,2554	2,3085
15	2,2509	2,5162	2,2654	2,3701	2,338	2,448	2,2578	2,342
20	2,2516	-	2,2722	2,4032	2,3426	2,4972	2,2603	2,3747
Vazão*	0,3	14,4	1,4	6,9	0,8	9,4	0,5	6,2
R ²	0,9832	1	0,999	0,9998	0,9988	0,9998	0,9996	0,9976
Pressão*	8	5	5	5	8	5	8	5

*Os valores para o tempo zero correspondem ao peso do reservatório de saída vazio, utilizado para recolher o MeOH. Vazão ($\text{mg}_{\text{MeOH}}/\text{min}$): coeficiente angular da regressão linear dos pontos obtidos com cada coluna; Pressão (bar) empregada para promover o fluxo.

É importante que a vazão de FM nos métodos de separação seja elevada, o que acaba permitindo análises mais rápidas. Porém, são justamente as colunas mais

permeáveis as que têm menos material cromatográfico para propiciar uma separação. Além disso, outro objetivo é conciliar uma boa resistência mecânica a solventes do monólito com sua alta porosidade, que são quesitos inversamente proporcionais. A coluna 3, que teve bom desempenho na separação dos analitos de teste, apresentou uma vazão baixa, porém, mais alta que as demais colunas de mesma porcentagem de porogênio e sem a necessidade de se aplicar uma pressão mais alta de 8 bar. O gráfico da Figura 40 mostra o comportamento da coluna 3 perante a vazão de MeOH no equipamento de EC.

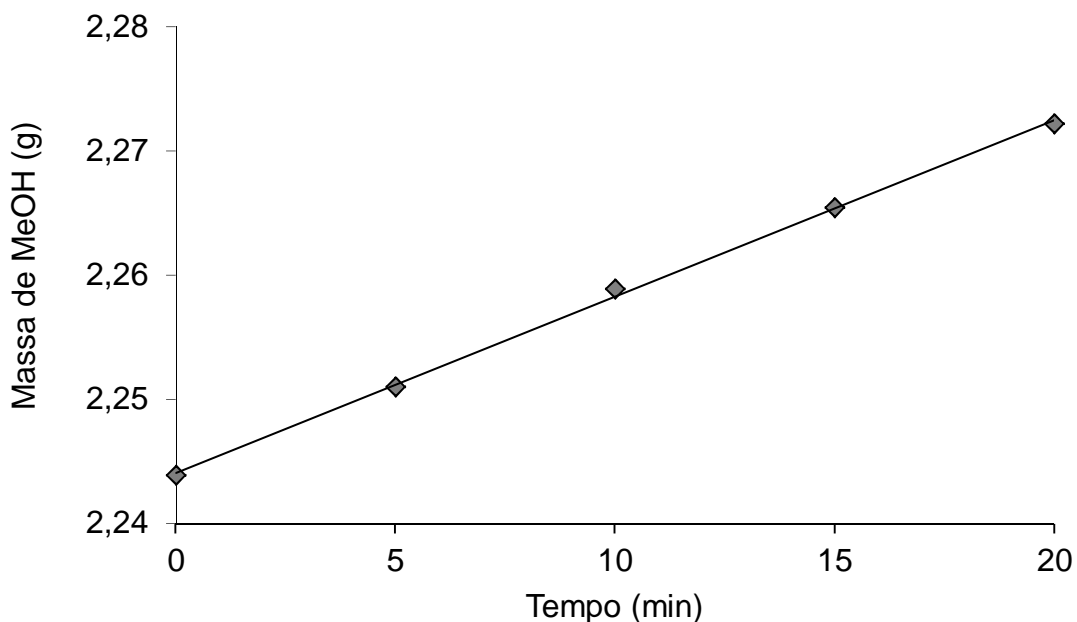


Figura 40. Gráfico da vazão de MeOH pela coluna 3 em função do tempo de aplicação de pressão (5 bar). Regressão linear: $m_{\text{MeOH}} = 0,0014 \cdot t + 2,2441$ (massa do reservatório). $R^2 = 0,9990$.

O tempo de análise foi estimado pelo tempo de migração do último pico, o antraceno. Na verdade, esta é uma aproximação que desconsidera o tempo de preparo de soluções, de condicionamento da FEM e tempo de percurso do analito sendo transportado da janela para o final da coluna.

4.3.4 Análise dos efeitos do planejamento 2^3

O cálculo dos efeitos (b) que os fatores estudados causaram sobre os resultados (respostas – y) neste planejamento 2^3 foi realizado através da equação:

$$X^t y / 2^{k-1} \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde: X é a matriz do planejamento, mostrada abaixo;

y é a matriz de uma das respostas (Tabela 5);

k é o numero de fatores, neste caso, igual a 3.

Matriz de planejamento 2^3 (X).

Ensaio	X							
	M	1	2	3	12	13	23	123
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Onde: M é a coluna utilizada para cálculo da média das respostas; 1, 2 e 3 são os fatores Tolueno, Irgacure 819 e Água; 12, 13, 23 e 123 são as interações entre os fatores (dados pela multiplicação dos respectivos níveis codificados).

A média das respostas (b0 – calculada utilizando-se 2^k , ao invés de 2^{k-1} da Equação 8), os efeitos principais (b1, b2 e b3) e os efeitos de ordem superior (b12, b13, b23 e b123) são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Médias, efeitos principais e efeitos de interação de 2ª e 3ª ordens do planejamento fatorial 2³.

Efeito	nº de picos	Vazão (mg _{MeOH} /min)	Tempo análise (min)
b0 (média)	4,75	4,99	9,61
b1	-1,00	8,48	-4,71
b2	0,50	-2,48	0,56
b3	-0,50	-1,53	-4,34
b12	0,00	-2,88	0,94
b13	0,00	-1,33	1,83
b23	-0,50	0,73	0,80
b123	0,00	1,43	-6,16

Como pode ser observado, o efeito mais relevante aparece quando se produz colunas com diferentes níveis de porogênio (b1). O alto valor positivo de b1 para a vazão significa que o porogênio contribui muito e de maneira positiva com este fator. Valores negativos de efeito indicam que o aumento do nível de um fator causa uma diminuição na resposta.

Com exceção do nº 4, os eletrocromatogramas pares (nível superior de porogênio) apresentam uma separação mais pobre dos analitos. Isso sugere, visivelmente, que se trabalhe com volumes menores de porogênio, embora isso diminua a vazão de FM. Como o porogênio dá lugar aos poros da coluna, ou seja, volumes *sem* o monólito, uma menor quantidade do solvente permite que um maior volume de FE esteja presente para interagir com os analitos. Isso justifica este resultado observado. Entretanto, é possível mostrar que volumes menores que 80 % de porogênio aumentam drasticamente a pressão necessária para se bombear uma dada FM, inviabilizando as análises (VAZ, 2007).

O fator porcentagem de Irgacure 819 apresentou maior expressão na vazão, mas não muito significativo (b2), o que indica que os níveis utilizados neste planejamento foram muito próximos o suficiente para não promover um efeito significativo nas respostas avaliadas. De qualquer forma, sugere-se que o nível utilizado deste fator seja o maior, porque, embora diminua a vazão, contribui para o aumento da separação (número de picos).

Já o fator razão entre H₂O e MPTMS mostrou-se um pouco mais influente no tempo de análise, de forma que uma quantidade maior de H₂O em relação ao MPTMS no preparo da FEM causa uma diminuição no tempo de análise. No entanto, esta diminuição no tempo não compensa a perda de separação e da vazão. Assim, é preferível se trabalhar com o nível inferior.

Comparando-se os eletrocromatogramas, é possível se observar a discrepância dos sinais analíticos através das escalas dos eixos-y. Como as condições operacionais de corrida no equipamento de EC foram idênticas, a explicação para isso advém do fato de que as colunas feitas com quantidades maiores de porogênio, por possuírem maior porosidade, permitem a entrada de quantidades maiores de analito, acarretando no aumento de sinal analítico.

Com estas observações, é possível confirmar que o melhor eletrocromatograma obtido nesta otimização foi o nº 3, cujas condições de preparo da coluna foram: 80 % (v/v) de solução porogênica; 3,5 % (m/m) de Irgacure 819; razão molar H₂O/MPTMS igual a 4 e tempo de polimerização de 30 minutos. Como o fator tempo de incidência de luz UV não se mostrou influente, pode ser adotado o tempo de 10 minutos.

4.3.5 Interpretação geométrica dos efeitos

Os resultados dados na Tabela 5 podem ser interpretados geometricamente (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2007). Para isso, o planejamento é representado num sistema cartesiano tridimensional, sendo um eixo para cada fator onde os níveis codificados são adequadamente indicados. A Figura 41 mostra os resultados de números de picos separados para cada experimento, contido num vértice do cubo.

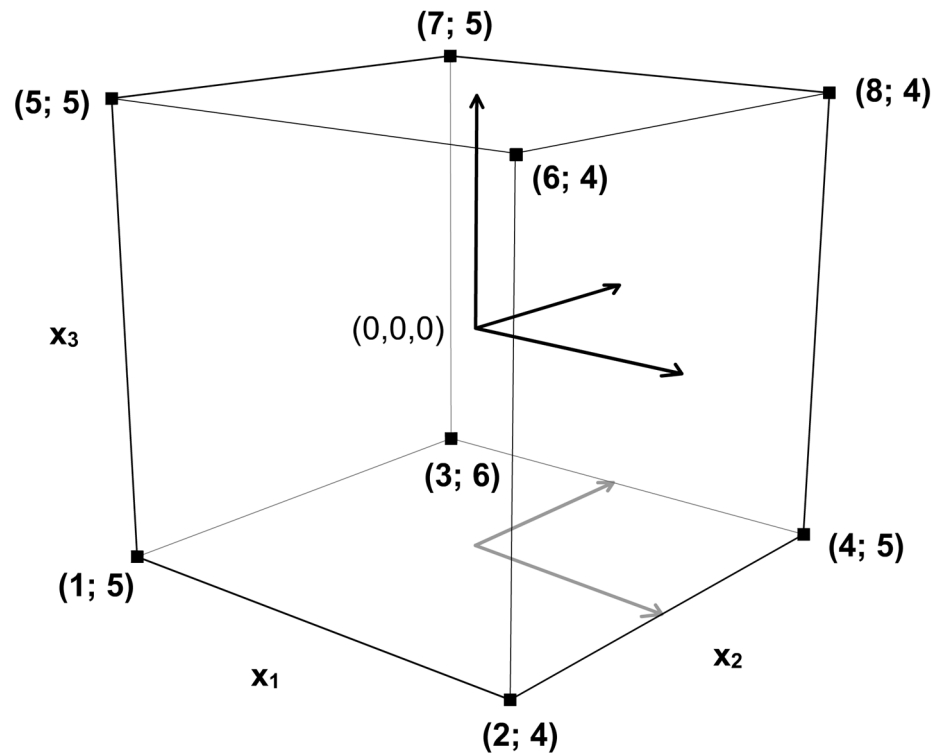


Figura 41. Interpretação geométrica das respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para números de picos separados. O primeiro número das legendas se refere ao experimento, enquanto o segundo é a resposta. A origem do sistema cartesiano $(0,0,0)$ está no centro do cubo. As coordenadas dos vértices são os níveis codificados da Tabela 5.

Para analisar os efeitos do fator X_1 sobre o número de picos separados, por exemplo, basta comparar os resultados dos vértices (experimento 1) com 2, 3 com 4, etc. ou os conjuntos (planos) 1-3-5-7 com 2-4-6-8, como um todo. Neste caso, é possível verificar a diminuição (em média, a rigor) de uma unidade de resposta (um pico), que corresponde ao efeito b1 encontrado na Tabela 7. Este foi o efeito mais significativo.

Para analisar o fator X_2 , basta comparar o plano 1-2-5-6 com o plano 3-4-7-8. Aqui, especificamente, comparando-se os resultados que estão nas arestas 1-2 com os da aresta 3-4 o aumento na resposta é de um pico. Porém, entre as arestas 5-6 e 7-8 não há mudança nas respostas. Estes efeitos específicos não são vistos na Tabela 7, onde somente as médias aritméticas são mostradas.

O fator X_3 é analisado comparando-se os planos 1-2-3-4 contra 5-6-7-8, ou a base contra o topo do cubo. Um resultado semelhante à análise de X_2 foi obtido, porém o efeito médio é negativo.

O efeito de interação de segunda ordem b_{23} , que também apresentou certa significância (-0,5 picos), pode ser analisado no mesmo cubo da Figura 41. Para isso, o plano diagonal 3-4-5-6 deve ser comparado com o plano diagonal 1-2-7-8. Da mesma forma se analisa os efeitos b_{12} e b_{13} , porém comparando-se os planos diagonais 2-3-6-7 contra 1-4-5-8 e 2-4-5-7 contra 1-3-6-8. O efeito de interação de terceira ordem é analisado pela comparação dos tetraedros 1-4-6-7 contra 2-3-5-8.

De maneira análoga, as outras respostas, isto é, vazão de MeOH e tempo de análise, podem ser analisadas conforme mostra a Figura 42 e a Figura 43, respectivamente.

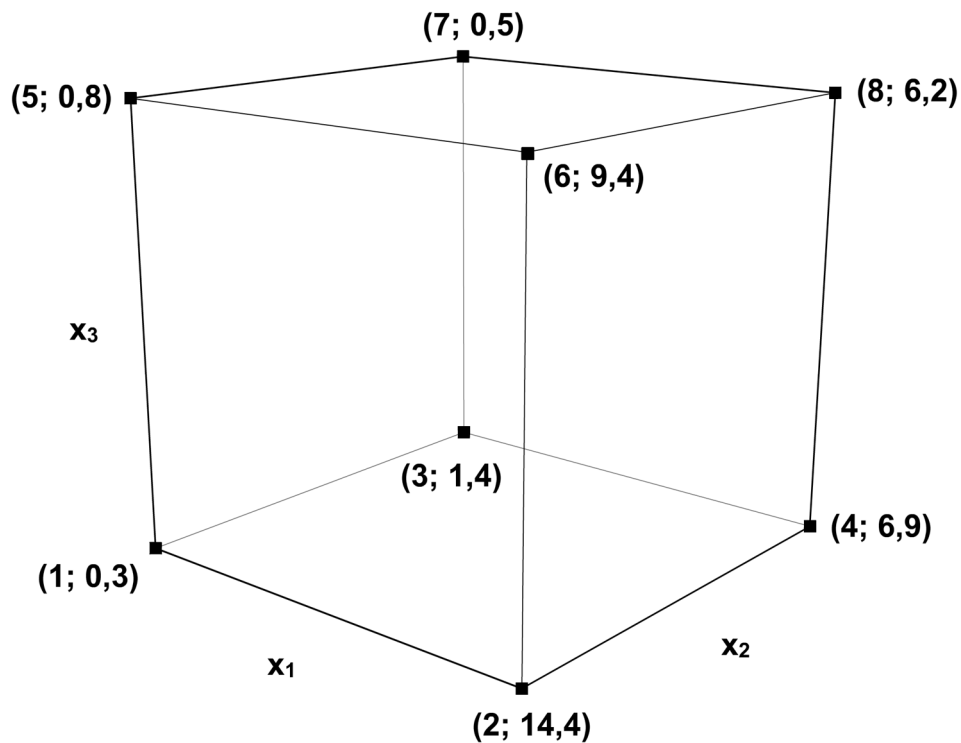


Figura 42. Interpretação geométrica das respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para vazão de MeOH (mg/min). O primeiro algarismo das legendas se refere ao experimento, enquanto o segundo é a resposta.

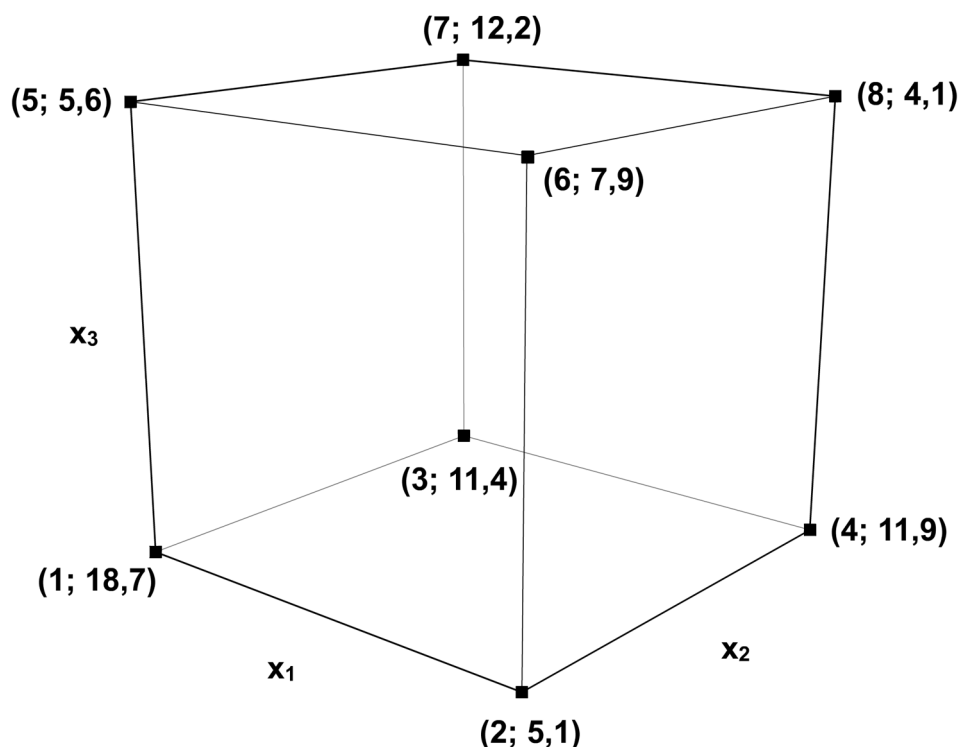


Figura 43. Interpretação geométrica das respostas do planejamento fatorial completo 2^3 para o tempo de análise (tempo de migração/retenção do antraceno, em minutos). O primeiro algarismo das legendas se refere ao experimento, enquanto o segundo é a resposta.

O efeito médio mais significativo para a vazão de MeOH foi o do fator X_1 (planos 1-3-5-7 contra 2-4-6-8, $b_1 = 8,48$ mg/min, Tabela 7 e Figura 42). Com relação ao tempo de análise, os efeitos b_1 , b_3 e b_{123} foram os mais significativos (planos 1-3-5-7 contra 2-4-6-8; e 1-2-3-4 contra 5-6-7-8; tetraedros 1-4-6-7 contra 2-3-5-8, respectivamente, Figura 43).

Em resumo, é possível entender que a otimização do preparo das FEM com o auxílio de planejamento fatorial se mostrou uma ferramenta poderosa, uma vez que ela possibilitou investigar a influência de quatro fatores relevantes através de oito experimentos. Com isso foram poupados tempo e consumo de capilares e reagentes para realizar esta etapa, que possui certa complexidade experimental, já que envolve o preparo de soluções e misturas, o pré-tratamento, o preenchimento de capilares, a polimerização na câmara de luz UV, a análise eletrocromatográfica e os testes de vazão.

4.4 COMPORTAMENTO DAS FEM FRENTE ANÁLISE DE HPA EM ECC

4.4.1 Comparação entre modos de análise

Quando se trabalha com colunas de até 8,5 cm de comprimento, o modo de análise ECC-rápida, através da injeção pela extremidade curta do capilar, é de grande vantagem, pois reduz o tempo de corrida e, conseqüentemente, o alargamento de banda por difusão longitudinal. Assim que o analito atravessa a FEM, é prontamente detectado, diferentemente do modo convencional, onde há um percurso maior até o detector.

A desvantagem deste método está na limitação que se tem da obtenção de diferentes comprimentos de FEM possíveis. Se diferentes analitos têm tempos de retenção muito próximos, se faz necessário o uso de colunas maiores e, portanto, do modo convencional (Figura 7 à direita). Pela Figura 44 é possível comparar os dois modos, através de dois eletrocromatogramas obtidos com FEM, FM e condições de análise idênticas.

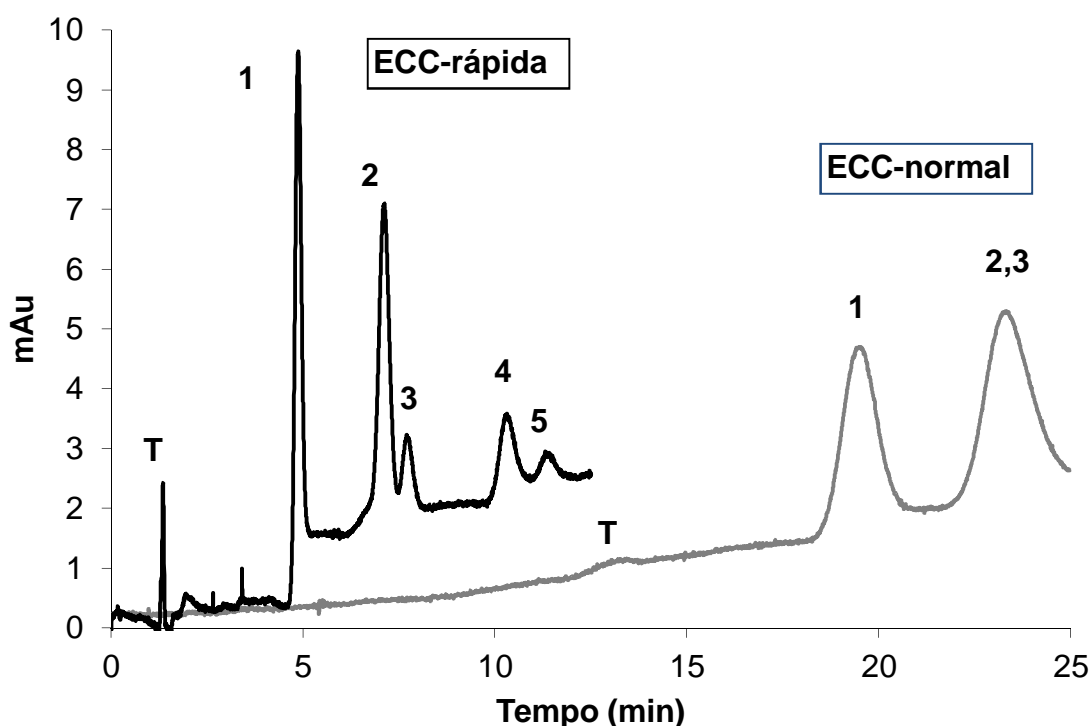


Figura 44. Eletrocromatogramas obtidos nos modos ECC-rápida (linha preta) e normal (linha cinza). Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. Condições: temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção: 220 nm ; FEM: $8,0 \text{ cm}$ de comprimento; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de $100 \text{ }\mu\text{m}$ d.i.; FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH $7,0$ (60%) / ACN (40%); Modo ECC-rápida: voltagem: -20 kV ; injeção: $-25 \text{ mbar} \times 3 \text{ s}$; Modo normal: voltagem: $+20 \text{ kV}$; injeção: $+25 \text{ mbar} \times 3 \text{ s}$.

Neste exemplo, no modo convencional, se observa claramente o quanto os analitos se dispersam, aumentando a largura do pico, diminuindo o sinal e ainda sem contribuir na separação dos picos 2 e 3, já que o tamanho da FEM foi o mesmo. Vale lembrar que o tempo de análise no modo ECC-rápida é consideravelmente menor. Isso encoraja grande investigação neste novo modo de análise.

4.4.2 Repetitividade

A Figura 45 exibe três eletrocromatogramas obtidos em sequência nas mesmas condições, com o intuito de mostrar a repetitividade que pode ser

alcançada. A FEM foi a mesma utilizada na condição 3 do planejamento anterior, porém, em dia diferente.

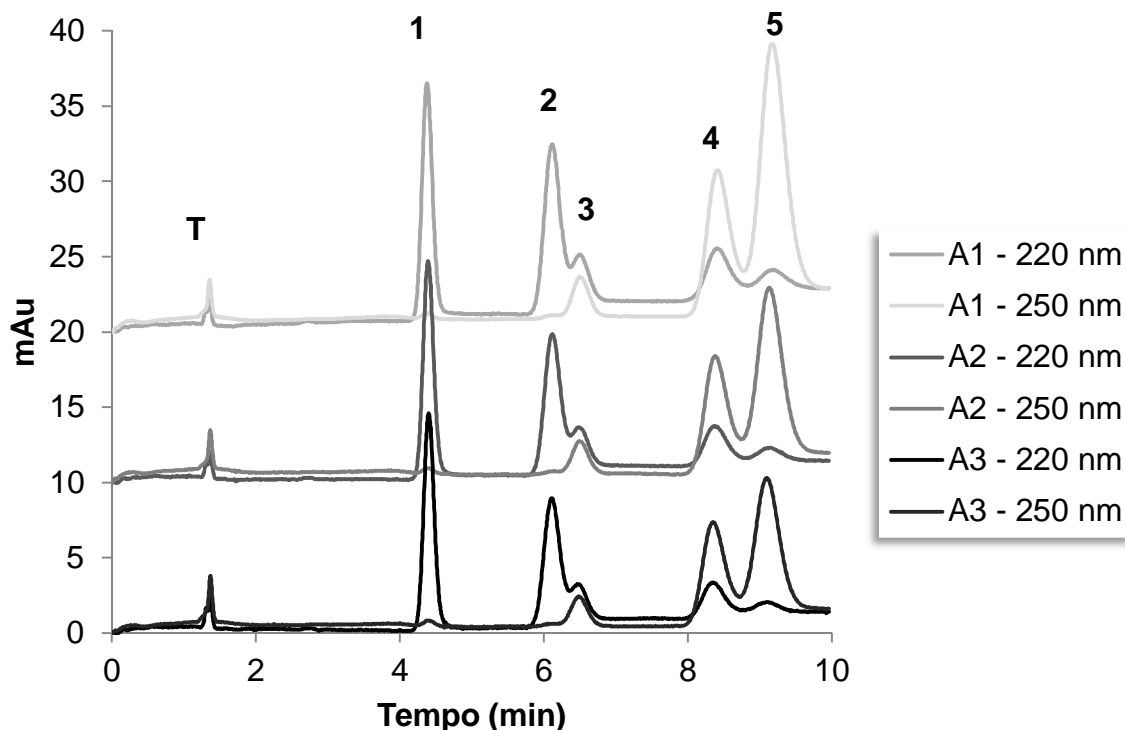


Figura 45. Eletrocromatogramas obtidos numa mesma coluna em triplicatas (A1, A2 e A3). Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteño (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L⁻¹ cada. Condições: temperatura: 20 °C; detecção: vide legenda; FEM: 8,0 cm de comprimento; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de 100 um d.i.; FM: solução de NH₄Ac 16,7 mmol L⁻¹ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); Modo ECC-rápida: voltagem: -20 kV; injeção: -25 mbar x 3 s.

A Tabela 8 resume os resultados de tempo de migração/retenção, área relativa e número de pratos (dado pela Equação 9 (SKOOG; HOLLER e NIEMAN, 2002)) dos picos dos padrões de HPA e tiouréia, obtidos de três FEM preparadas na condição 3.

$$N = \frac{5,54}{L} \cdot \left(\frac{t_{mig}}{w_{1/2}} \right)^2$$

(Equação 9)

Onde: L é o tamanho da FEM, em metros;

t_{mig} é o tempo de migração do analito;

$w_{1/2}$ é a largura do pico do analito à metade da altura.

Tabela 8. Médias e desvio padrão relativo (DPR) para o tempo de migração/retenção (min), área relativa (A_r , valor da área do pico padrão i sobre valor da área da tiouréia) e número de pratos por metro de FEM (N/m) dos picos dos padrões de HPA e tiouréia, obtidos em triplicata, com três FEM distintas (replicatas autênticas).

FEM A	Médias			DPR (%)		
	Tempo	A_r	N/m	Tempo	A_r	N/m
T	1,36	1,00	24054	0,35	-	7,2
1	4,39	3,22	45407	0,22	0,14	4,2
2	6,12	4,49	33561	0,05	0,38	1,3
3	6,49	4,76	38519	0,09	0,44	2,5
4	8,38	6,15	49736	0,30	0,64	26,0
5	9,14	6,70	47719	0,32	0,67	24,6
FEM B						
T	2,04	1,00	28958	0,70	-	14,4
1	5,52	2,71	35771	0,44	0,41	8,1
2	7,56	3,71	21292	0,23	0,77	8,7
3	7,96	3,91	28847	0,92	1,3	3,5
4	10,28	5,05	38811	0,76	1,2	26,1
5	11,19	5,49	41781	0,78	1,3	25,0
FEM C						
T	2,02	1,00	19914	3,3	-	4,3
1	5,30	2,63	49956	2,6	0,70	13,6
2	7,67	3,81	43147	2,1	1,1	0,85
3	8,18	4,06	54251	2,0	1,2	9,3
4	11,06	5,49	44724	1,8	1,5	16,9
5	12,24	6,08	51462	1,7	1,6	11,8

Onde: Padrões em ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5). A FEM A foi aquela utilizada para obtenção dos eletrocromatogramas da Figura 45.

Embora os DPR para tempo de migração/retenção e área relativa tenham sido satisfatórios, variando de 0,05 % (FEM A) a 3,3 % (FEM C) e de 0,14 % (FEM A) a 1,6 % (FEM C) respectivamente, o mesmo não aconteceu para o DPR de N, ultrapassando 25 % em duas das FEM.

4.4.3 Reprodutibilidade

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos de reprodutibilidade através dos DPR das três FEM A, B e C, empregadas no estudo de repetitividade. Como pode ser observado, nenhum resultado foi satisfatório, com DPR variando de 8,6 a 27,4 %, muito distante dos 5 % esperados para se considerar um sistema reprodutivo. Vale lembrar que as FEM foram preparadas e utilizadas em dias diferentes, o que, embora possa justificar, não diminui o ônus deste resultado. Este permanece um dos grandes desafios deste trabalho.

Tabela 9. Médias e DPR para o tempo de migração/retenção (min), área relativa (A_r , valor da área do pico i sobre valor da área da tiouréia) e número de pratos (N) dos picos dos padrões de HPA e tiouréia, obtidos com as três FEM da Tabela 8.

Padrão	Médias			DPR (%)		
	Tempo	A_r	N/m	Tempo	A_r	N
T	1,81	1,00	22879	17,3	-	15,2
1	5,07	2,85	41140	9,7	9,1	13,5
2	7,11	4,00	30745	9,9	8,6	27,4
3	7,54	4,24	38154	9,9	8,8	25,8
4	9,91	5,56	41811	11,3	8,1	10,1
5	10,86	6,09	44223	11,9	8,1	8,5

Onde: Padrões em ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5).

4.4.4 Comprimento das FEM

A Figura 46 mostra eletrocromatogramas obtidos com uma FEM (A) de 8 cm e outra (B) de 7 cm de comprimento. Neste caso, é possível notar que 1 cm de diferença entre os tamanhos das FEM influencia na qualidade de separação, uma vez que a FE é responsável pela retenção diferenciada. Os picos obtidos com a FEM A estão mais eficientes, mais altos e separados. Assim, possivelmente não se alcançaria boas resoluções com FEM menores que 7 cm, para este sistema nestas condições.

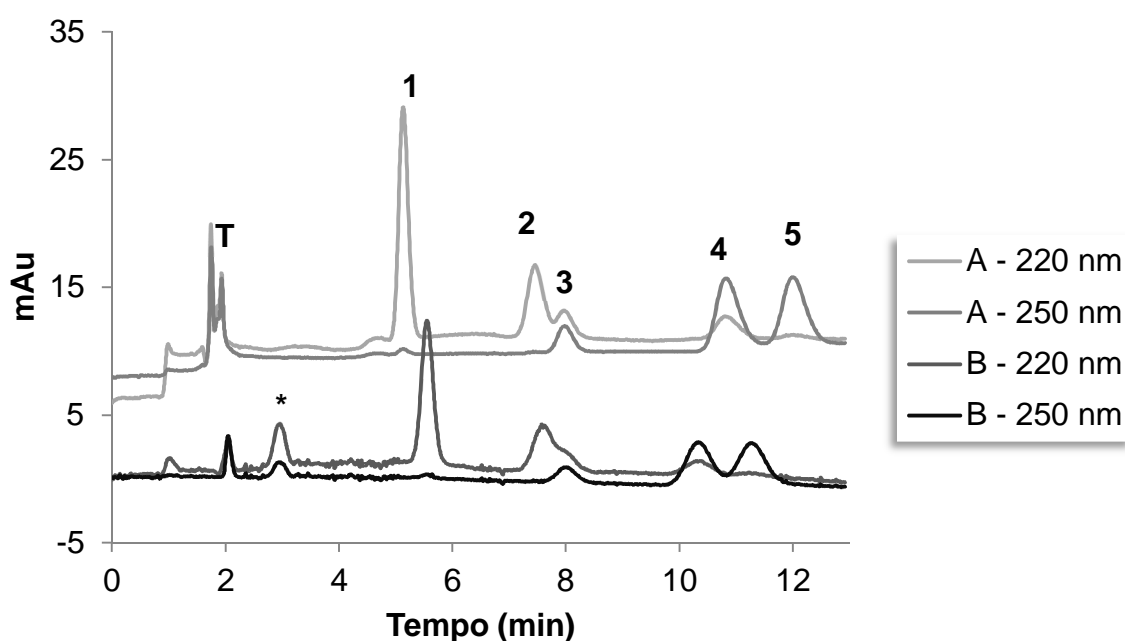


Figura 46. Eletrocromatogramas obtidos em A) coluna de 8 cm de comprimento e B) coluna de 7 cm. Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. (*) pico desconhecido. Condições: temperatura: $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$; detecção: vide legenda; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de $100 \text{ }\mu\text{m}$ d.i.; FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%); Modo ECC-rápida: voltagem: -20 kV ; injeção: $-25 \text{ mbar} \times 3 \text{ s}$.

4.4.5 Variação da voltagem

Na Figura 47 é possível observar o comportamento do perfil de separação de HPA e tiouréia mediante aplicação de diferentes voltagens no modo ECC-rápida. Não há ganho significativo na separação, quando se diminui o módulo da voltagem para 10 kV e o tempo de análise se torna muito grande. Em -30 kV, o nível da corrente se eleva substancialmente, alcançando os limites recomendados no software. Além disso, ocorrem coeluições entre os picos 2-3 e 4-5. Em -20 kV, este sistema eletroforético se comporta melhor, de forma que não há excesso de corrente e as linhas-base permanecem estáveis e previsíveis, sendo adotado como melhor.

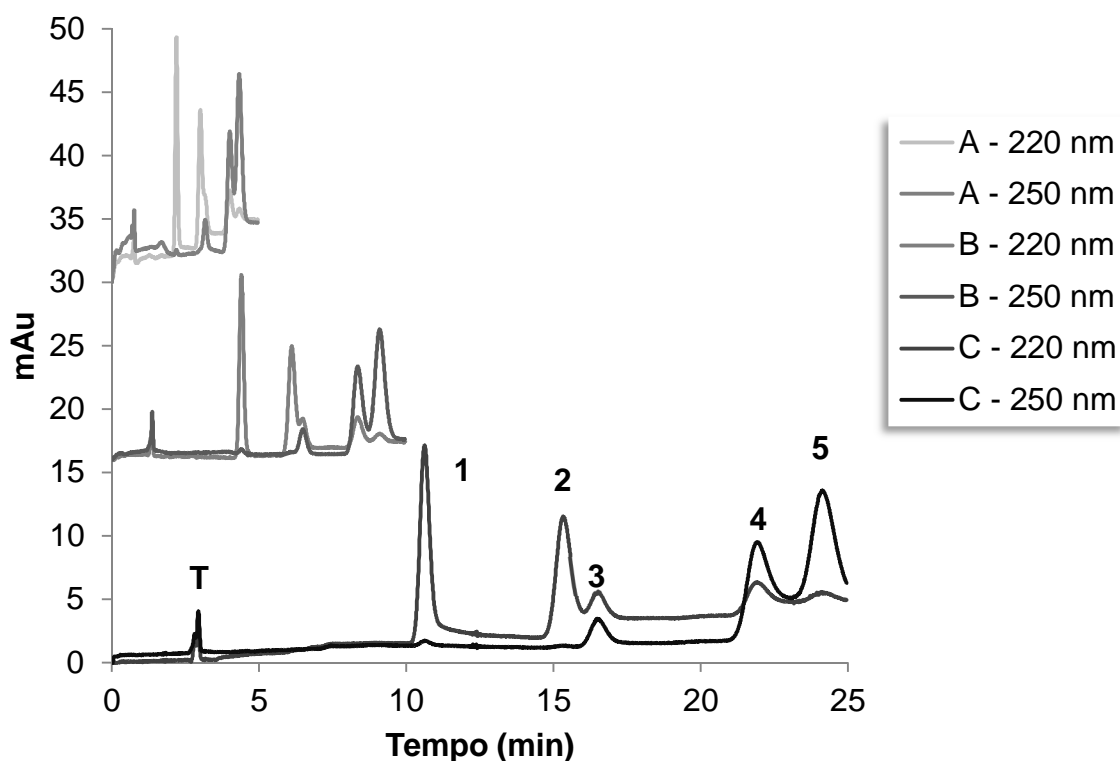


Figura 47. Eletrocromatogramas obtidos com diferentes voltagens aplicadas, no modo ECC-rápida: A) -30 kV; B) -20 kV; e C) -10 kV, em FEM de 8 cm de comprimento. Ordem de eluição: tiouréia (T), naftaleno (1), acenafteno (2), fluoreno (3), fenantreno (4) e antraceno (5), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. Condições: temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; detecção: vide legenda; capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato de 100 μm d.i.; FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%). Injeção: -25 mbar x 3 s.

4.5 COMPORTAMENTO DAS FEM FRENTE ANÁLISE DE ALQUILBENZENOS EM ECC

Etilbenzeno, propilbenzeno, butilbenzeno e hexilbenzeno foram submetidos à análise por ECC, nas mesmas condições de análise de HPA. Inicialmente, algumas corridas não mostraram êxito. A corrente apresentou variações de -66 a -22 μA numa mesma corrida e, em outras, se aproximou de zero. Após inúmeros testes onde se buscou ajustes de voltagem de corrida, tempo e pressão de injeção, tempo de condicionamento entre outros, os picos dos alquilbenzenos foram observados. A Figura 48 mostra o perfil de separação do etil-, propil- e butilbenzeno, bem como as corridas com cada um destes analitos não misturados. O hexilbenzeno não foi observado nestas condições de análise.

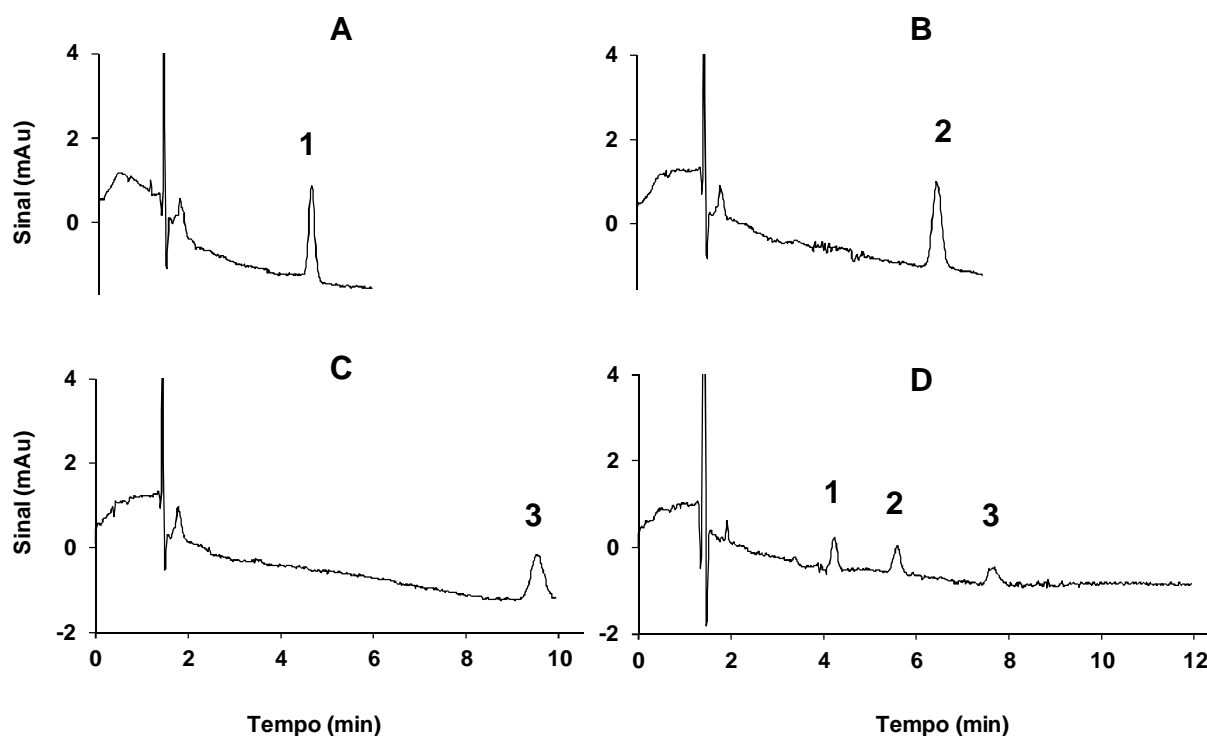


Figura 48. Eletrocromatogramas dos alquilbenzenos: A: etilbenzeno; B: propilbenzeno; C: butilbenzeno e D: mistura dos padrões. FM: solução de NH_4Ac $16,7 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,0 (60 %) / ACN (40%). Modo de corrida por ECC-rápida. Voltagem: -20 kV; temperatura $20 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: -25 mbar por 5 s. FEM de 8,0 cm. Detecção: 210 nm. Ordem de eluição: etilbenzeno (1), propilbenzeno (2) e butilbenzeno (3).

A fim de se obter uma FM mais adequada para a separação dos alquilbenzenos, no que diz respeito à concentração de acetato de amônio e quantidade de ACN, várias misturas foram testadas, de acordo com a matriz de planejamento da Tabela 10.

Tabela 10. Matriz de planejamento com níveis codificados 3^2 .

Ensaio	Fatores	
	(1) [NH ₄ Ac]	(2) % F _{org} /F _{aq}
1	-	-
2	-	0
3	-	+
4	0	-
5	0	0
6	0	+
7	+	-
8	+	0
9	+	+

Onde: 1: Concentração de solução de NH₄Ac (mmol L⁻¹): (-) = 15,0; (0) = 17,5; (+) = 20,0. 2: Porcentagem de F_{org} sobre F_{aq} (%): (-) = 40; (0) = 45; (+) = 50.

As FM foram preparadas no dia da respectiva análise e os ensaios foram executados em ordem aleatória. A Figura 49 mostra os eletrocromatogramas deste estudo, que estão dispostos de forma que, comparando-se os grupos 1-2-3 com 4-5-6 e com 7-8-9, é possível analisar o efeito do aumento da concentração de acetato de amônio de 15,0 para 17,5 e para 20,0 mmol L⁻¹ respectivamente (Fator 1). Não há uma alteração visível no perfil de separação entre estes grupos.

O mesmo é possível comparando-se os grupos 1-4-7 com 2-5-8 e com 3-6-9, onde a proporção de F_{org} cresce de 40 para 45 para 50 %, respectivamente (Fator 2). Neste caso, a diferença de perfis é significativa. Em porcentagens menores, a resolução dos picos é visivelmente grande e decresce com o aumento de ACN. O tempo de saída do último pico (hexilbenzeno) também decresce neste sentido. Além disso, há um ganho considerável no sinal analítico nos níveis de 50 % de ACN (eletrocromatogramas 3, 6 e 9), de maneira que, dependendo da aplicação da

análise (isto é, variedade e concentrações dos analitos na amostra, etc.), pode ser mais apropriado se trabalhar nestas condições.

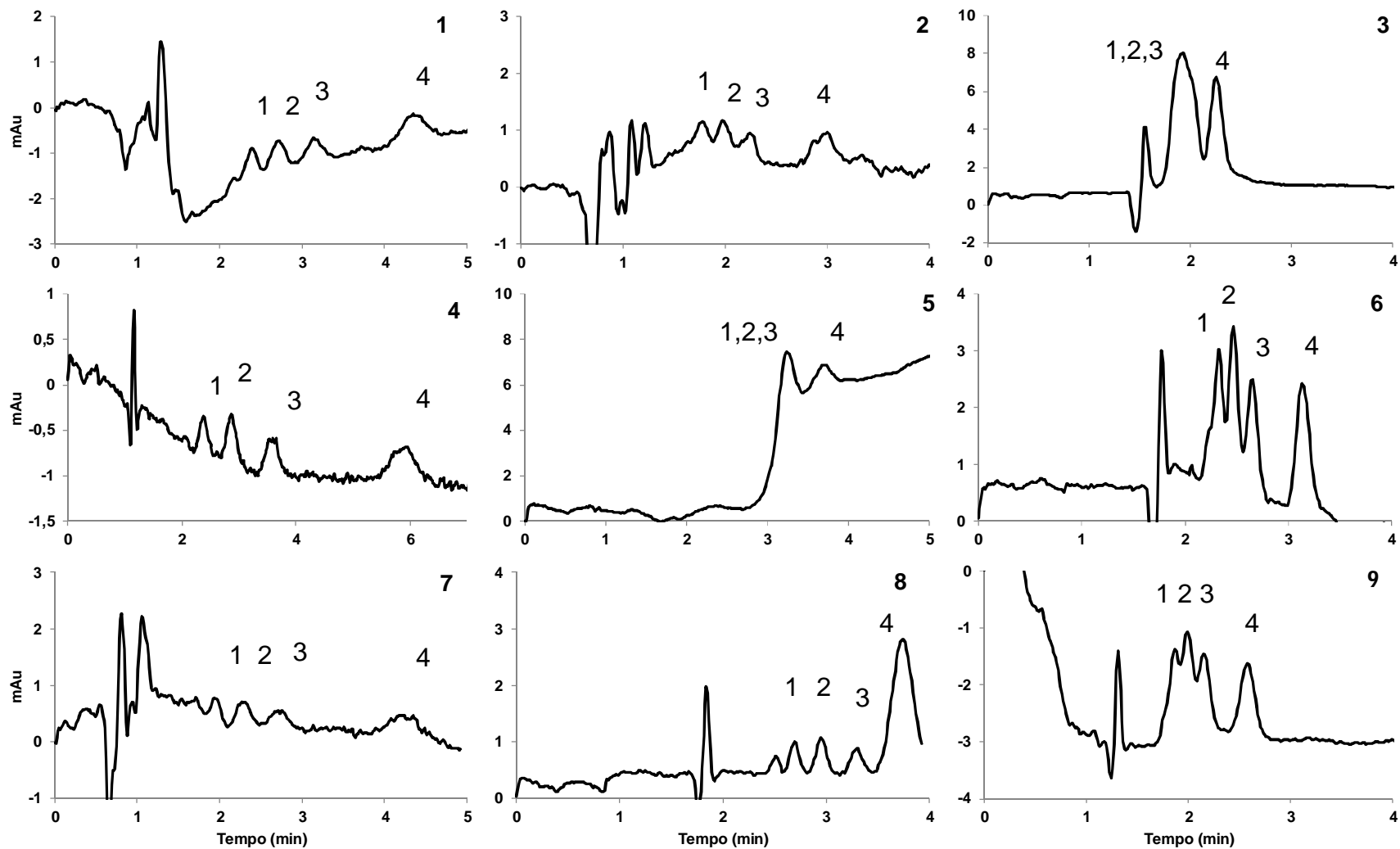


Figura 49. Eletrocromatogramas referentes ao planejamento fatorial 3^2 , obtidos com FEM de 8,0 cm em capilares de 36 cm (27,5 cm efetivos). Ordem de eluição: etilbenzeno (1), propilbenzeno (2), butilbenzeno (3) e hexilbenzeno (4), diluídos em MeOH a 1 mmol L^{-1} cada. FM: vide Tabela 10. Voltagem: -20 kV; temperatura: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: 25 mbar x 5 s; detecção: 210 nm.

Como demonstração de que as baixas resoluções dos níveis superiores de ACN podem ser melhoradas, a voltagem de corrida foi alterada de -20 para -10 kV, a partir da condição 9 deste planejamento. A Figura 50 mostra separação dos quatro alquilbenzenos obtida.

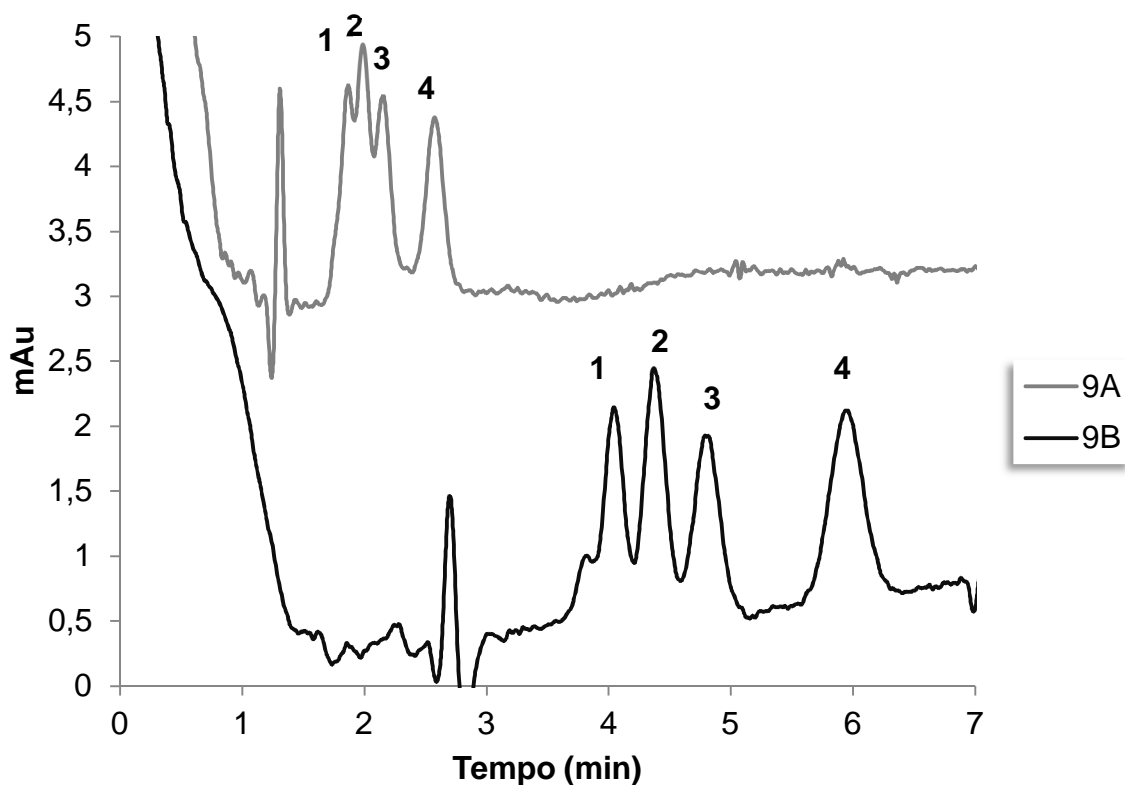


Figura 50. Eletrocromatogramas de mistura dos padrões de alquilbenzenos. FEM de 8,0 cm. Capilar de 100 μm d.i. por 36 cm. Detecção: 210 nm. Modo de corrida ECC-rápida. FM (9): solução de acetato de amônio a 20 mmolL^{-1} (50%) com ACN (50%). 9A: voltagem: -20 kV; 9B: voltagem: -10 kV. Injeção: 30 mbar por 5 s. Ordem de eluição: etilbenzeno (1), propilbenzeno (2), butilbenzeno (3) e hexilbenzeno (4).

Fica claro com estes resultados que as FEM, cuja otimização de preparo foi feita levando-se em conta a análise de HPA, são bastante promissoras para separação dos alquilbenzenos. Isto encoraja maiores investigações neste tema.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS MONÓLITOS

A caracterização morfológica dos monólitos foi realizada em pequenos segmentos (aproximadamente 1,0 cm) removidos dos próprios capilares do planejamento descrito anteriormente, através do MEV. A Figura 51 mostra o suporte onde são posicionados os capilares, com fita de dupla-face e o cartucho que é levado ao MEV. Não foi feito o revestimento com ouro, processo típico em MEV, uma vez que baixas voltagens de operação foram aplicadas.

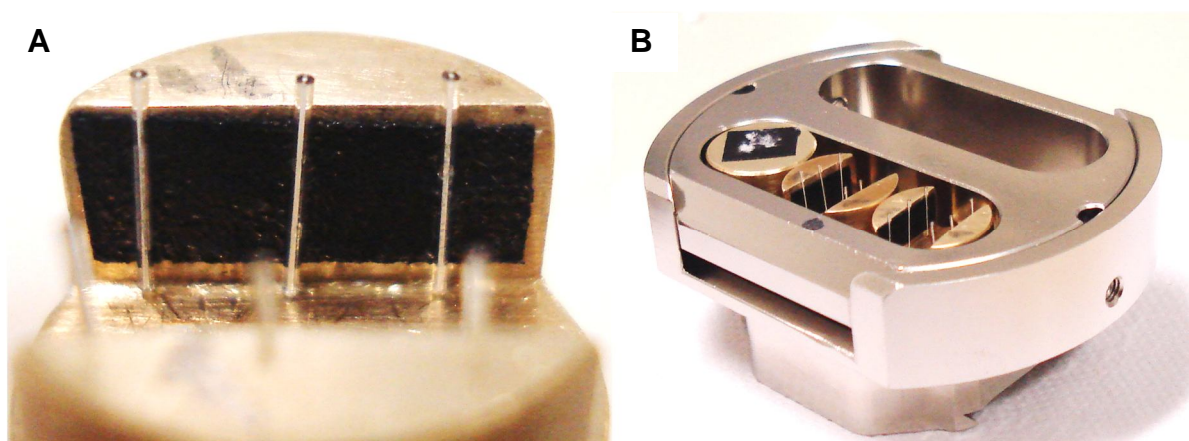


Figura 51. A) Suporte para amostras do MEV, mostrando a fita de dupla-face (preta) e três capilares presos a ela; B) Cartucho onde estão posicionados os suportes.

As próximas figuras mostram imagens obtidas das seções transversais das colunas de 1 a 8, nesta ordem. Na imagem superior de cada figura é observada a estrutura monolítica com menor ampliação que na inferior. A imagem inferior é uma varredura um pouco mais detalhada. A coluna 3 tem suas imagens mostradas em duas figuras consecutivas para melhor detalhamento, por ter apresentado melhores resultados.

Para uma melhor visualização, a maioria destas imagens teve a iluminação alterada em software de edição de imagens (Adobe Photoshop CS2). A alteração consistiu num melhor aproveitamento do histograma (escala de cinza – do preto ao branco) das figuras levando-se em conta contraste e brilho. Como este processo não aumenta o número de cores, mas somente as distribui no histograma, algumas imagens podem ter aparência de chuviscos. Este tratamento de imagens pode ser

empregado para construção de modelos tridimensionais de monólitos em programas específicos (JINNAI *et al.*, 2001; KANAMORI *et al.*, 2003).

Redes poliméricas com estruturas esféricas da ordem de 1 μm interconectadas e algumas estruturas menores podem ser vistas em todas as FEM. A principal diferença nestas colunas (Figura 52 a Figura 60) está na ausência de monólito na região central do capilar para FEM de números pares, devido à quantidade maior de porogênio (90 %). Este fato indica que as estruturas esféricas tendem a se aglomerar com padrões semelhantes, apesar de serem aleatórios, mas possivelmente independente da porcentagem de porogênio. Uma possível explicação é que a formação monolítica se dá da parede interna para o eixo longitudinal do capilar. À medida que o polímero é formado próximo à parede, novos precursores poliméricos (dímeros e trímeros do sol) são requisitados. Se a porção porogênica for elevada, não haverá precursor suficiente para preencher todo o capilar na direção radial. Esta ausência de monólito, que é o material cromatográfico, na região central do capilar justifica tanto a separação pobre dos HPA quanto a elevada vazão de MeOH nos testes realizados neste grupo.

Além disso, é importante observar que as FEM preparadas com 90 % de porogênio (grupo de números pares) lembram (apenas) as FETA, que, por definição, só possuem material cromatográfico na superfície do capilar. Como estes resultados não foram satisfatórios, isto sugere que este tipo de polímero não é adequado, nestas condições, para o preparo de FETA.

Uma alíquota de 1,0 mL de sol da condição 3 foi posta em recipiente de plástico e exposta à radiação UV, por 30 minutos. O monólito resultante foi lavado com MeOH e submetido à análise por MEV, sem revestimento de ouro (Figura 51 – B). É possível observar na Figura 61 as mesmas estruturas esféricas conectadas, cujos aglomerados estão mais espalhados, uma vez que não há o confinamento do capilar. Estas imagens também tiveram correção no histograma.

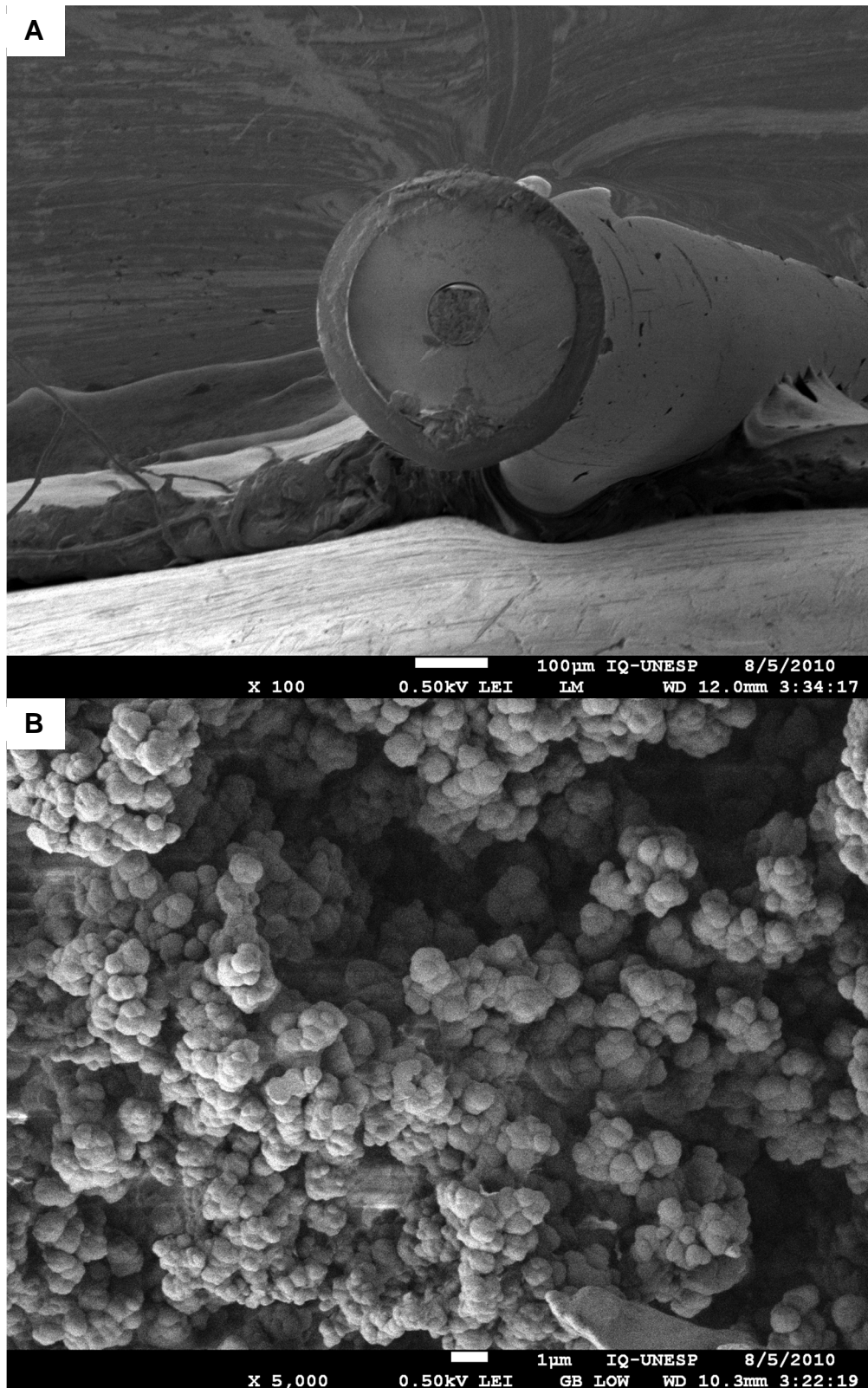


Figura 52. Imagens de MEV da FEM 1. Nas legendas pretas é possível verificar a ampliação, a escala de distância, a voltagem utilizada, o modo de detecção (LEI ou SEI) e a distância de trabalho (WD, do inglês, *working distance*).

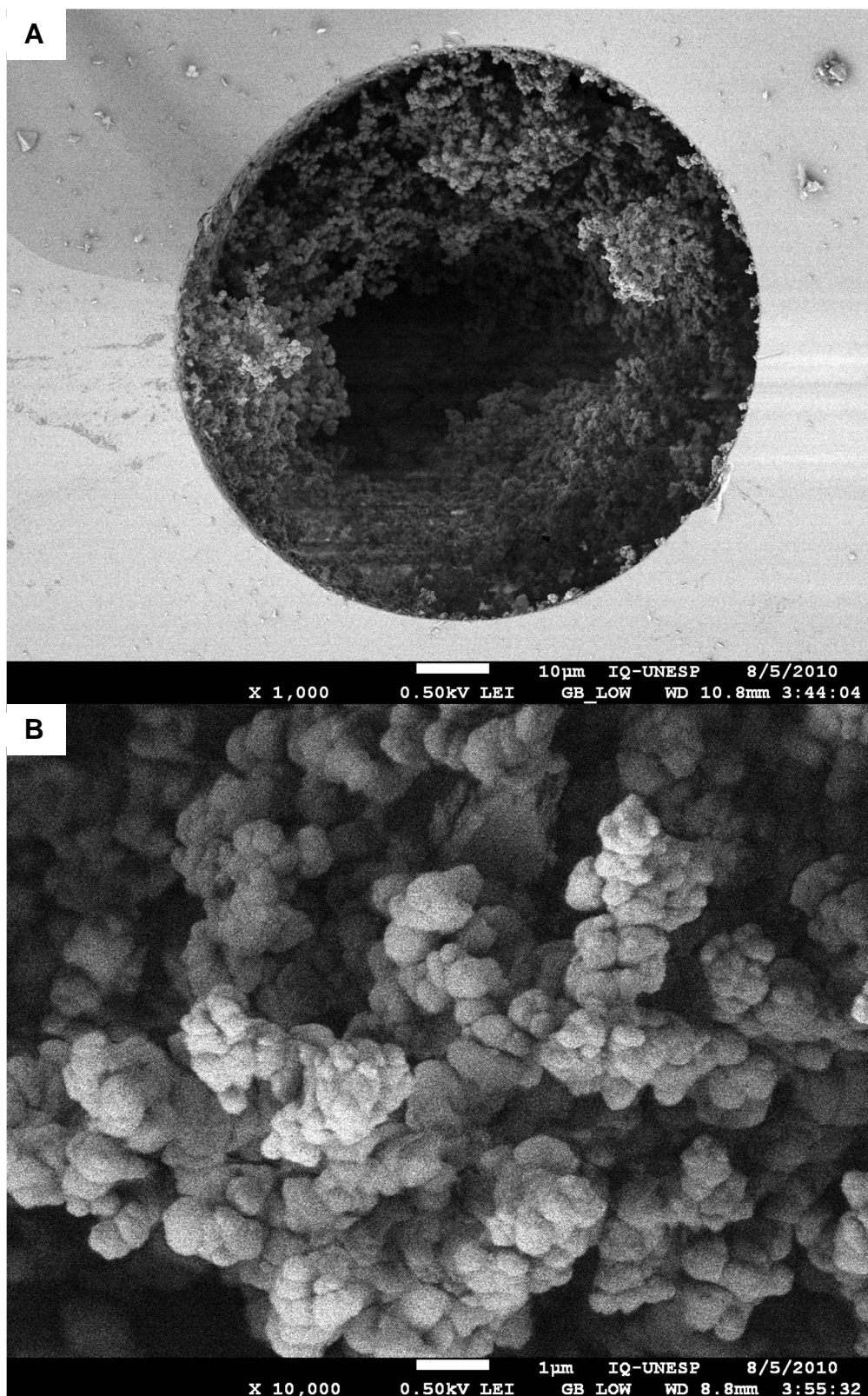


Figura 53. Imagens de MEV da FEM 2.

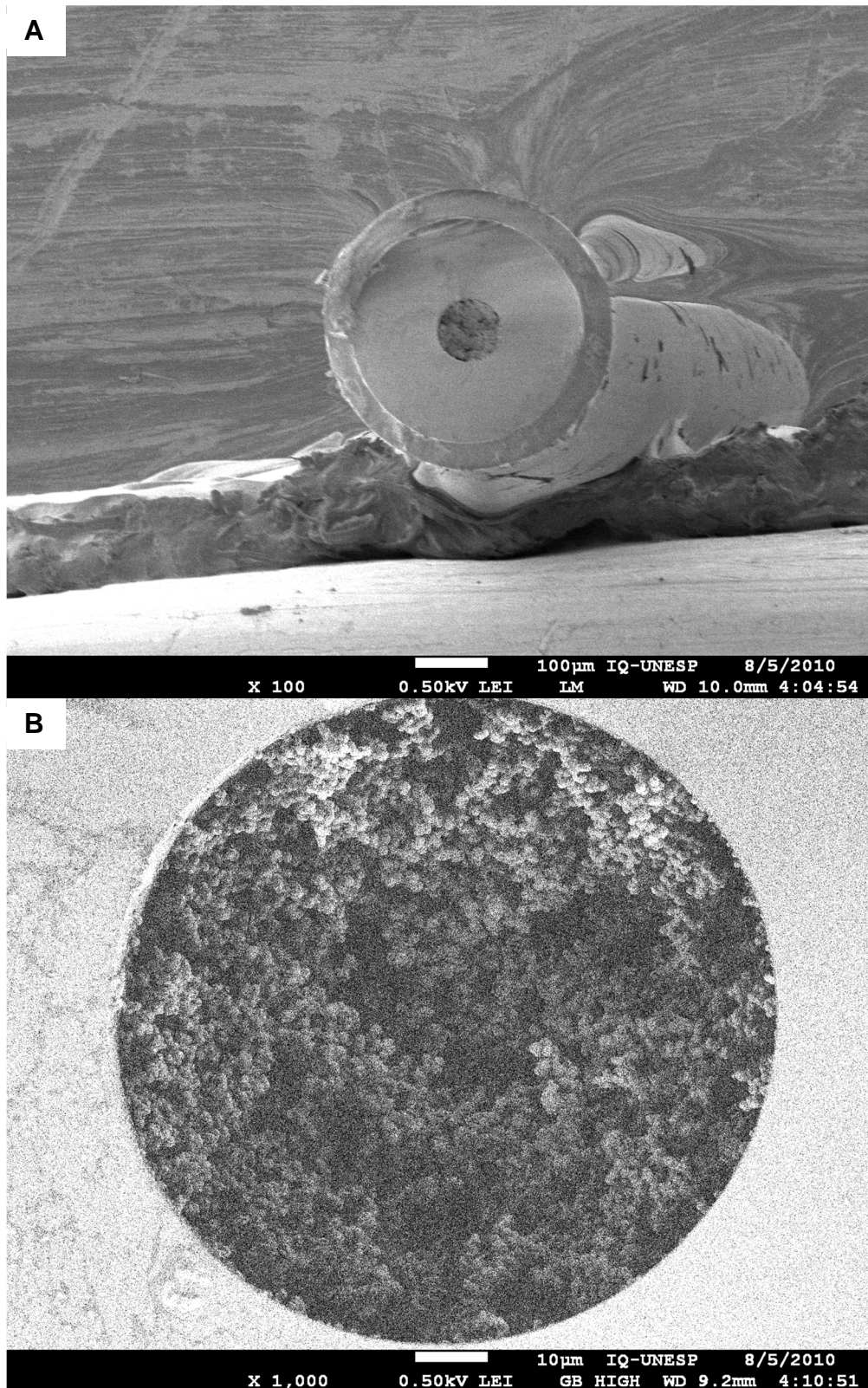


Figura 54. Imagens de MEV da FEM 3.

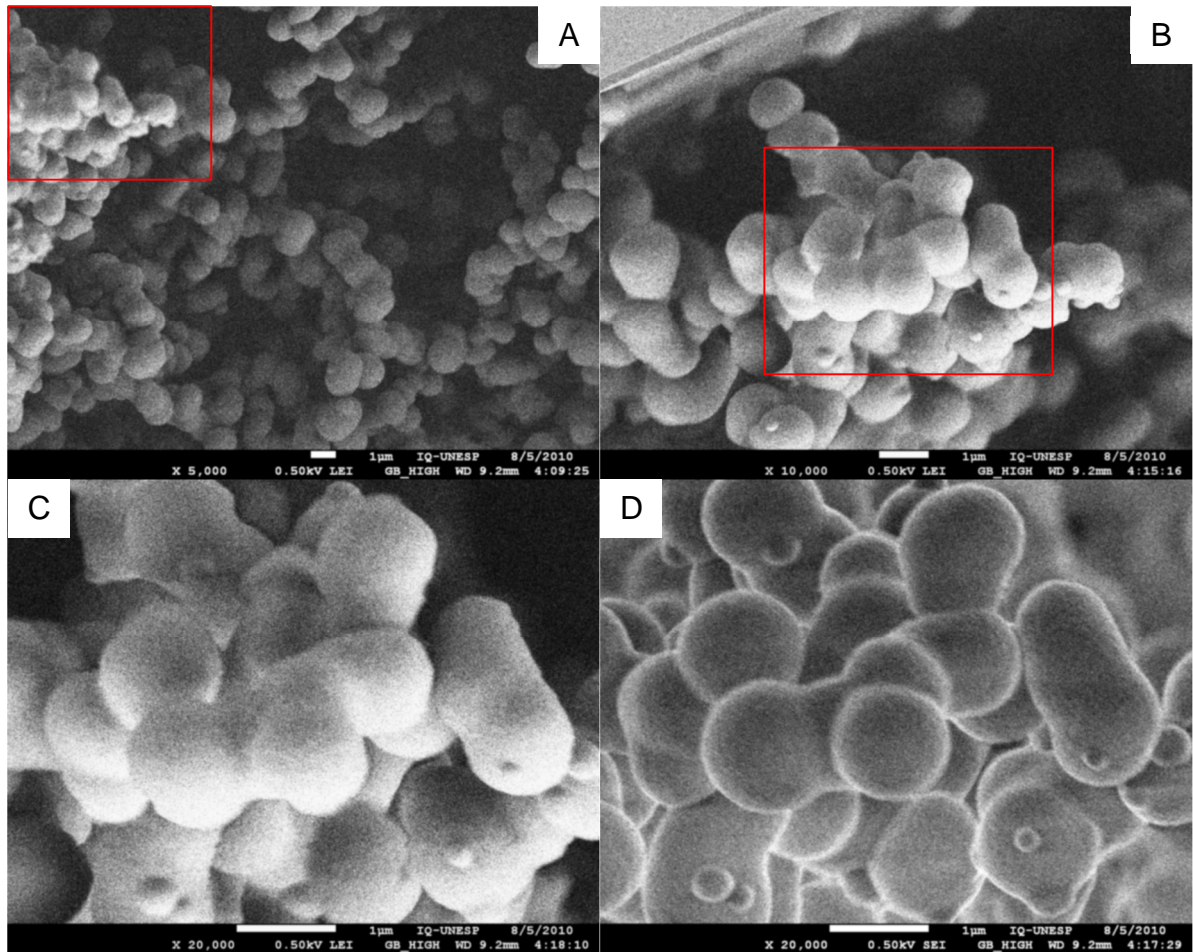


Figura 55. Imagens mais detalhadas de MEV da FEM 3. O quadrado vermelho indica a região de ampliação da imagem seguinte. As imagens C e D foram obtidas na mesma região do monólito com os modos de detecção LEI e SEI, respectivamente.

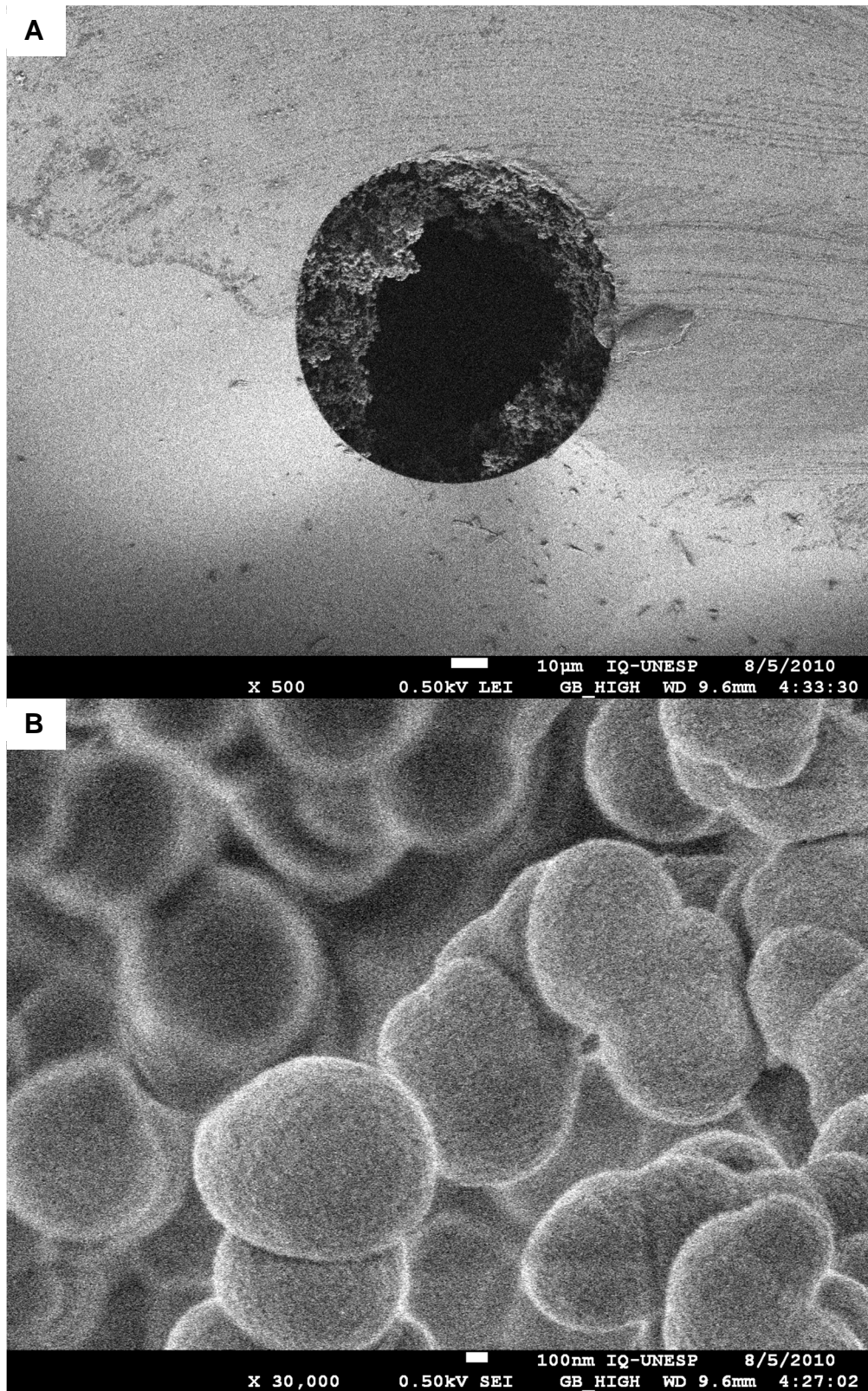


Figura 56. Imagens de MEV da FEM 4.

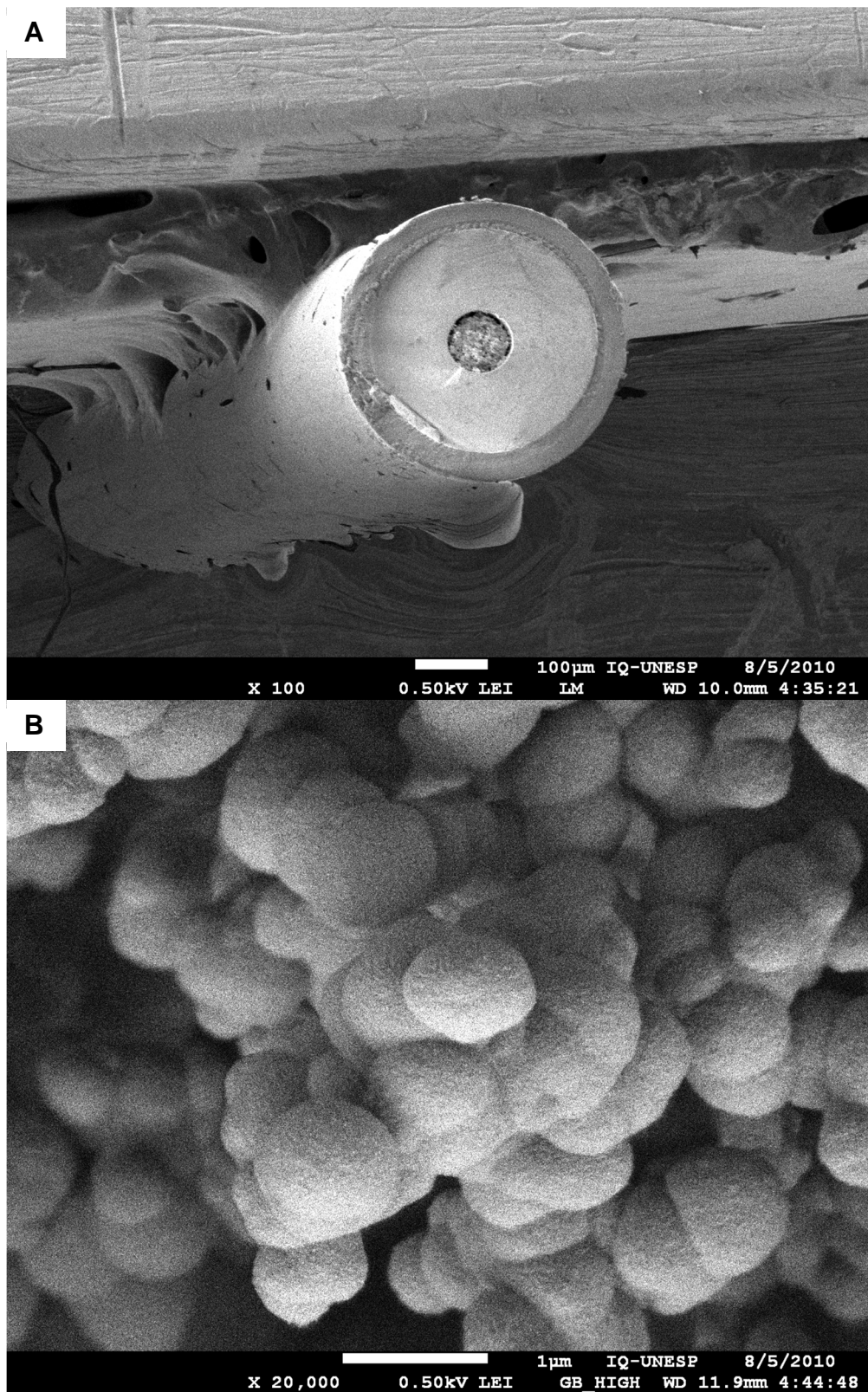


Figura 57. Imagens de MEV da FEM 5.

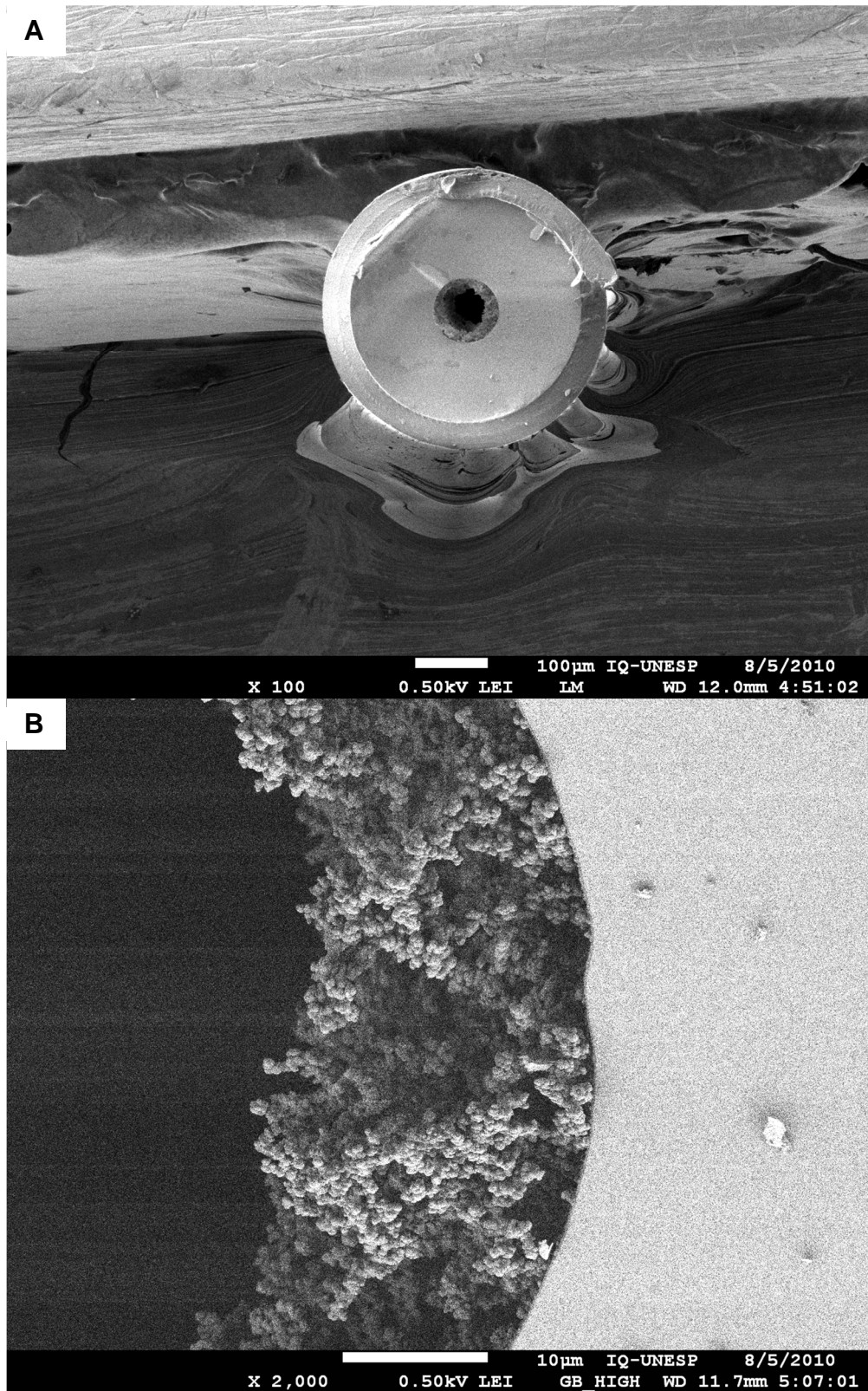


Figura 58. Imagens de MEV da FEM 6. A imperfeição observada na interface sílica – monólito (no centro da imagem inferior) é uma distorção da imagem apenas.

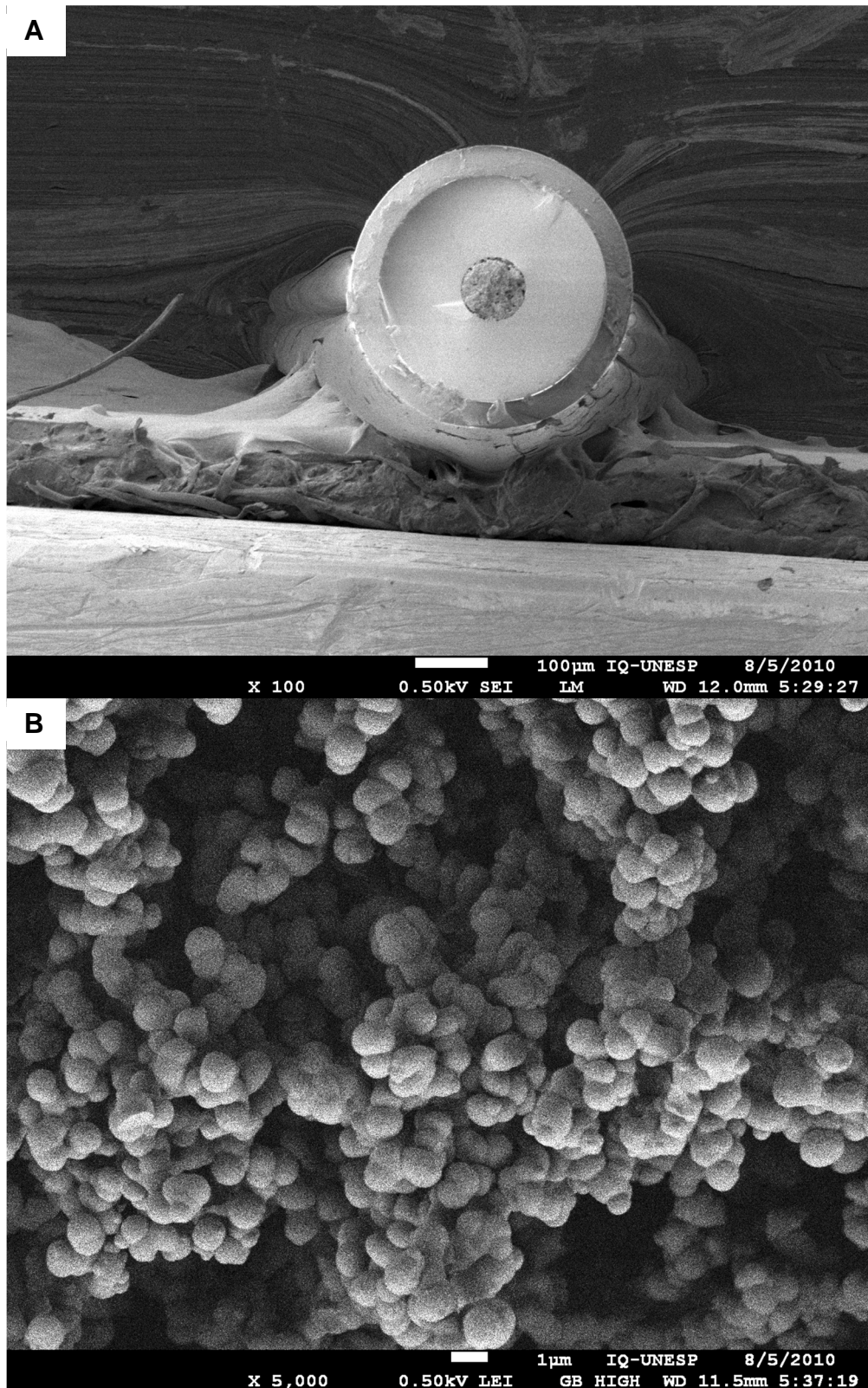


Figura 59. Imagens de MEV da FEM 7.

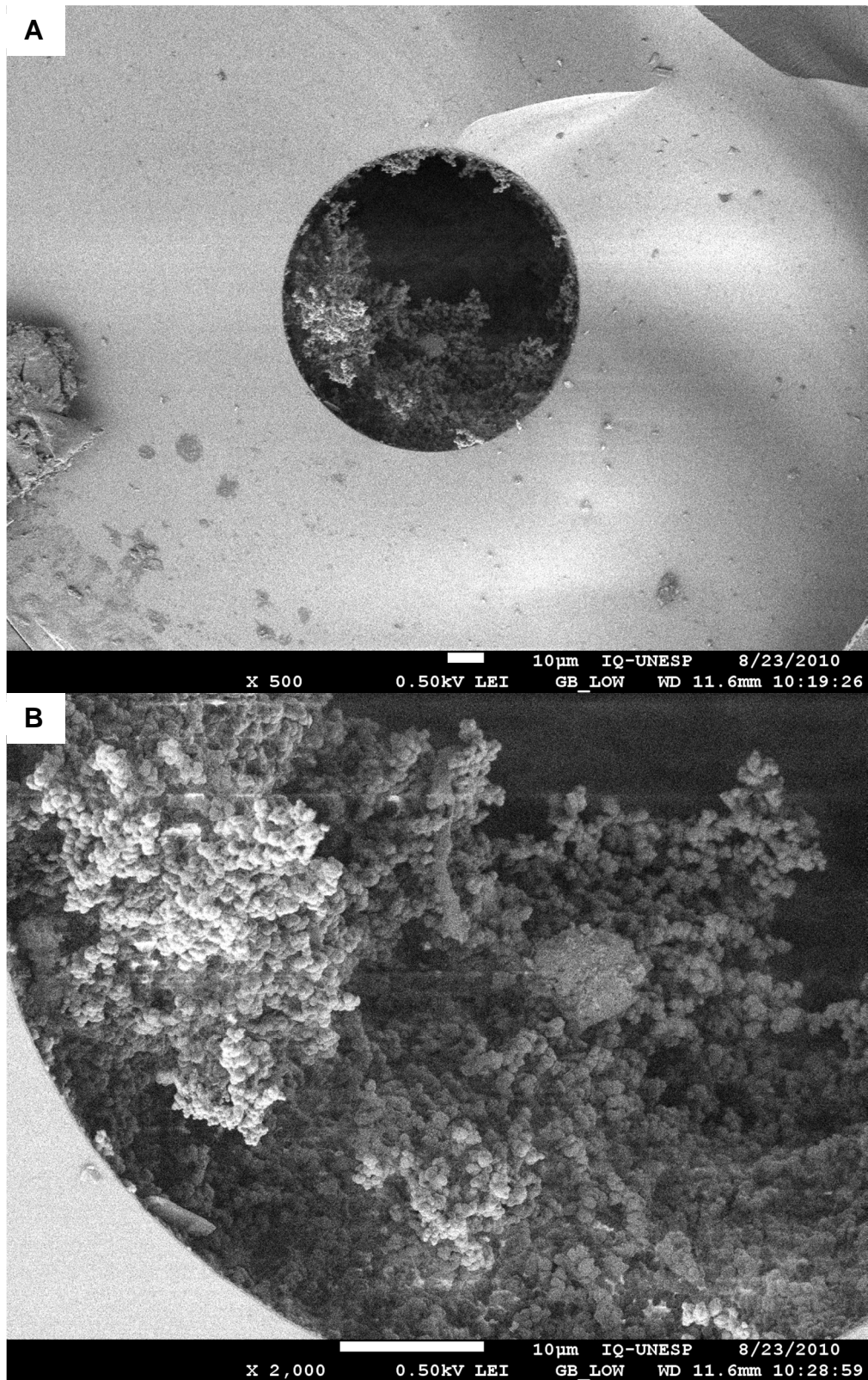


Figura 60. Imagens de MEV da FEM 8.

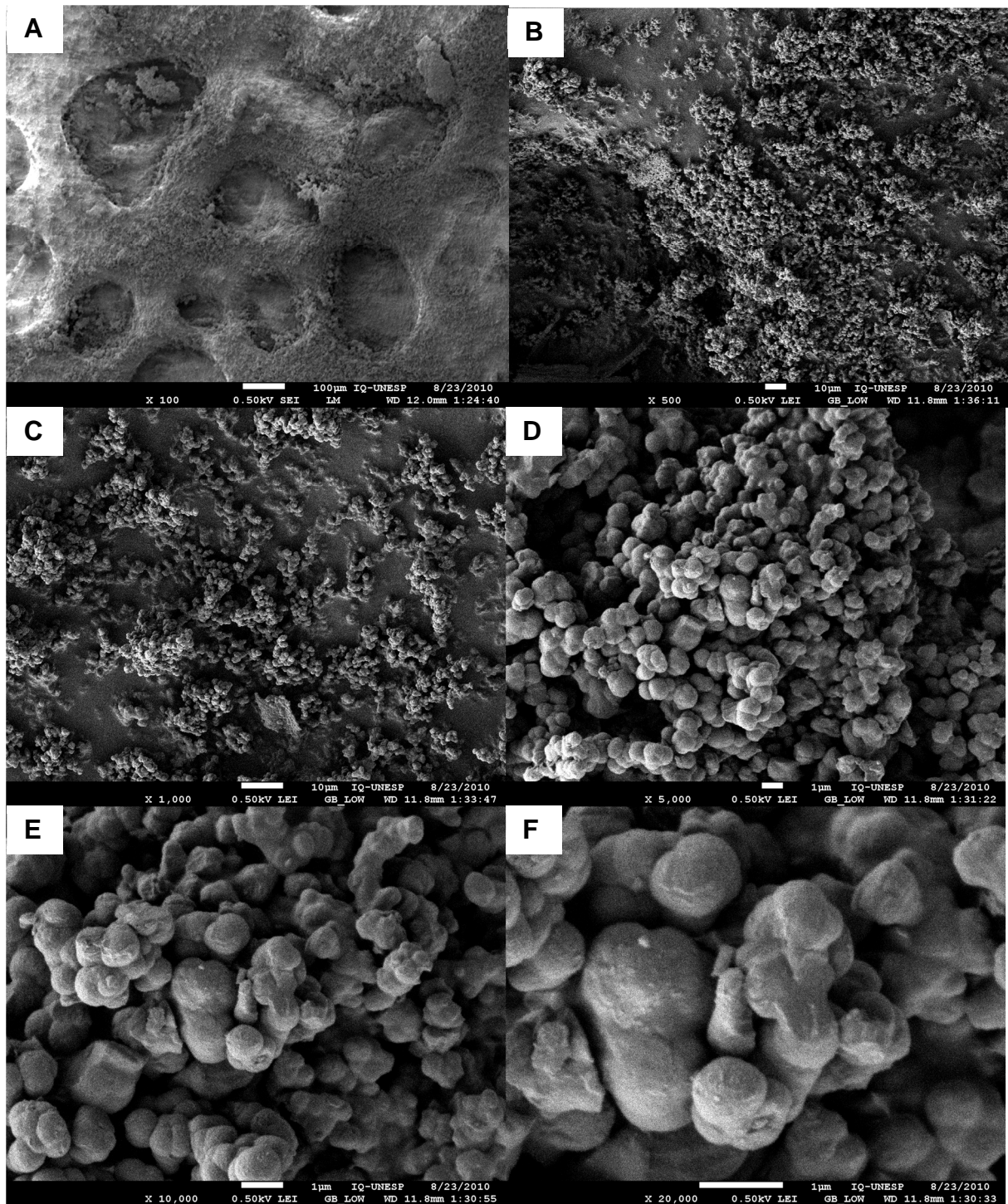


Figura 61. Imagens de MEV do monólito da condição 3 sintetizado em ambiente aberto. Ampliações: A) 100 x; B) 500 x C) 1000 x; D) 5000 x; E) 10000 x e F) 20000 x.

4.7 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO MONÓLITO

A condição 3 do planejamento descrito acima foi utilizada no preparo do monólito fora dos capilares, ou seja, em um frasco aberto. Este monólito foi submetido à análise espectroscópica no infravermelho. A Figura 62 mostra os espectros de absorção no infravermelho na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Como é possível observar, algumas bandas do espectro do MPTMS, assinaladas por setas, se tornaram ausentes com a polimerização (2842, 1321, 1295, 940 e 818 cm^{-1}). Duas bandas de intensidade moderada surgiram após a reação (1270 e 917 cm^{-1}). As principais mudanças, do ponto de vista de ligações químicas, são: uma diminuição no número de C=C (1637 e 940 cm^{-1} (PANTOJA *et al.*, 2009)), já que a propagação da cadeia polimérica é feita pela quebra destas duplas ligações; eliminação das ligações Si-O-CH₃ (a banda em 2842 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-H dos grupos metoxi (COSTA e VASCONCELOS, 2002), que são eliminados na hidrólise na forma de MeOH e a banda em 818 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento simétrico Si-O-C (CAO *et al.*, 2008)) e surgimento das ligações Si-O-Si e Si-O-H (surgimento da banda em 917 cm^{-1} (PANTOJA *et al.*, 2009)). As bandas em 1321 e 1295 cm^{-1} são referentes aos estiramentos assimétrico e simétrico, respectivamente, das ligações C-O do grupo C(=O)-O-C(H₂) (PANTOJA *et al.*, 2009). Como não se espera rompimento destas ligações na polimerização, sugere-se que as estas duas bandas tenham se condensado, formando a banda em 1270 cm^{-1} . A contribuição do fotoiniciador Irgacure 819 no espectro do monólito é mínima, uma vez que a quantidade deste reagente utilizada é pequena (3,5%) e suas moléculas se encontram fotolizadas.

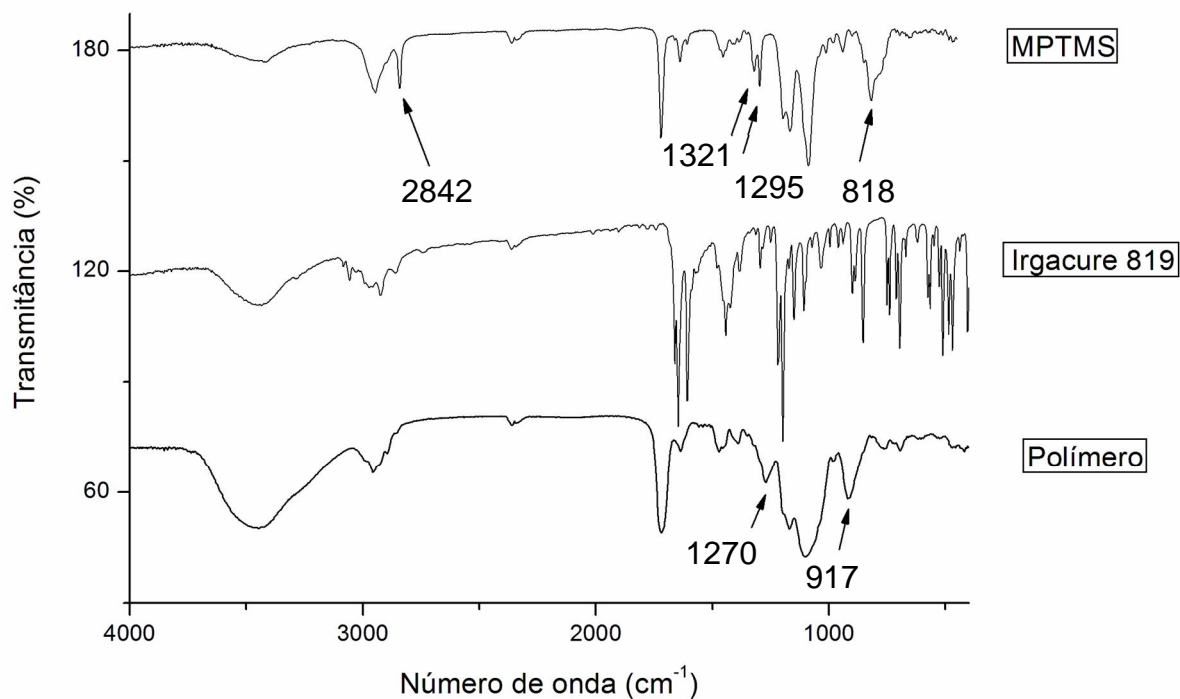


Figura 62. Espectros de absorção no infravermelho para os reagentes MPTMS e Irgacure 819 e o polímero obtido. As setas no espectro do MPTMS indicam bandas ausentes no espectro do polímero e vice-versa. Para melhor visualização, os espectros do Irgacure 819 e do MPTMS foram deslocados 40 e 100 unidades acima no eixo-y, respectivamente.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DA POROSIDADE DO MONÓLITO

Uma pequena massa (0,0578 g) do mesmo monólito preparado para as análises de MEV (condição 3) foi submetida ao analisador das isotermas de adsorção de gases, empregando-se nitrogênio como gás adsorvato. A Figura 63 mostra as isotermas de adsorção/desorção para o monólito.

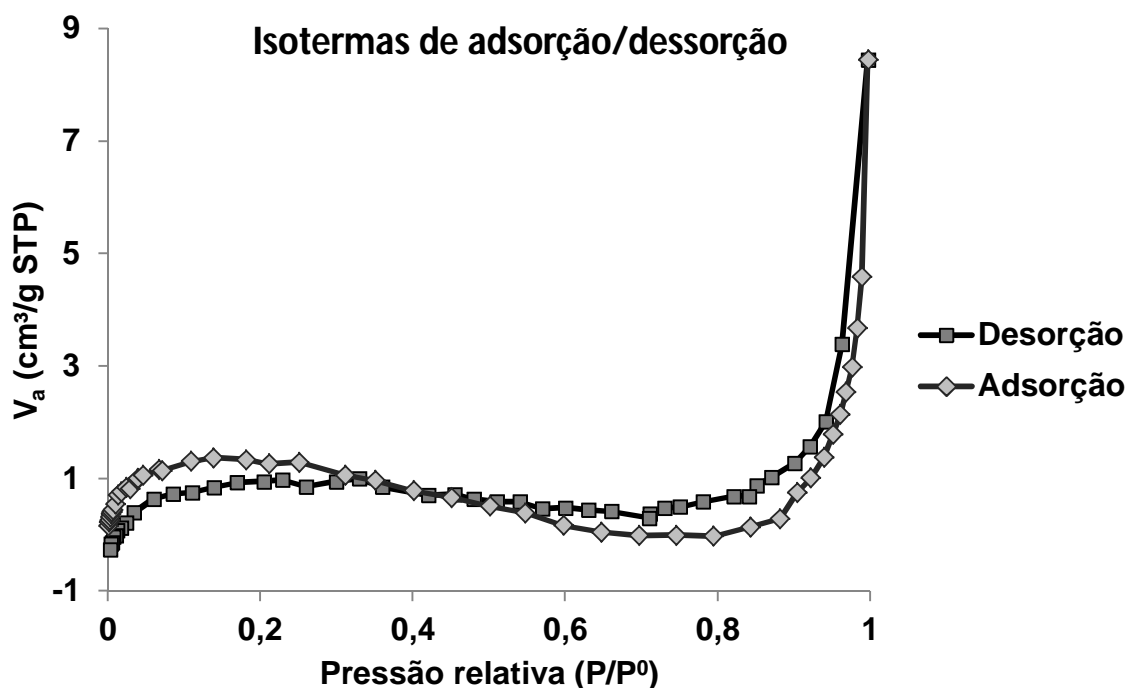


Figura 63. Isotermas de adsorção/dessorção para o monólito (condição 3).

Um gráfico de BET (Figura 64) foi construído dos dados da isoterma de adsorção. A região entre 0,06 e 0,14 de pressão relativa se mostrou linear pela Equação 4 (Página 55) e, portanto, foi utilizada pela Equação 5 para determinação da área superficial específica.

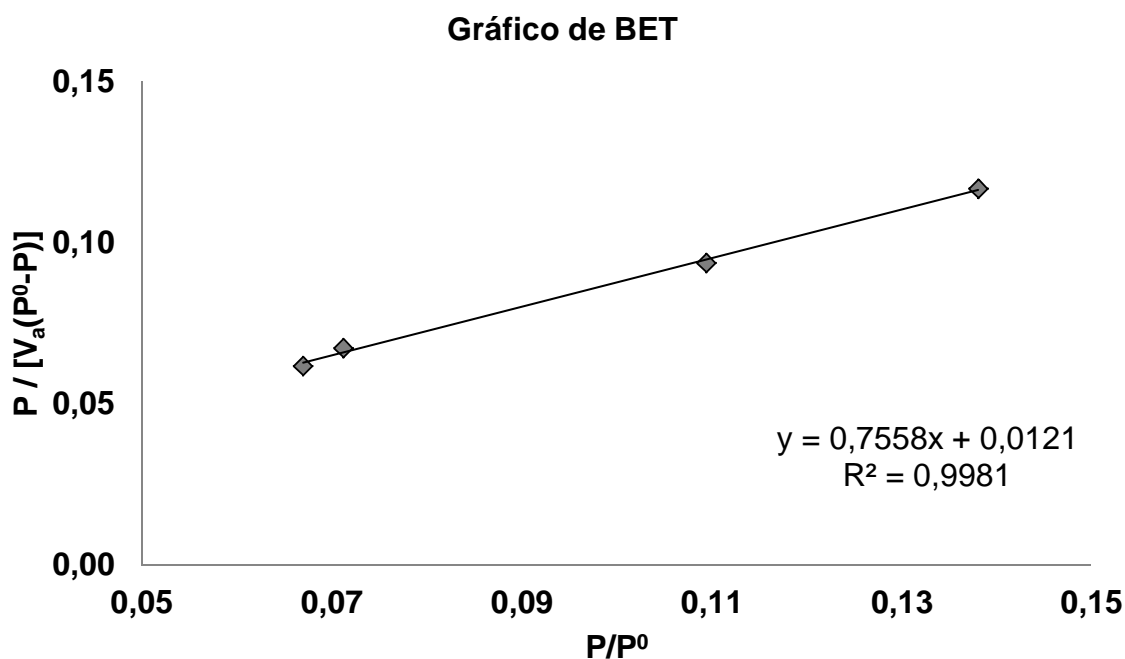


Figura 64. Gráfico de BET para determinação da área superficial específica do monólito.

A Tabela 11 resume os resultados obtidos e a área superficial específica.

Tabela 11. Resultados relativos à medida de área superficial do monólito.

Parâmetros	Valores
Inclinação	0,7558
Intercepto	0,0121
C	63,463
Volume da monocamada (m^3g^{-1})	1,302
Pressão (mmHg)	214
Temperatura (K)	76,85
R ($\text{mmHg m}^3\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)	0,0623638
n (mols)	$5,81477 \times 10^{-5}$
Área da seção cruzada de N_2 (nm^2)	0,1620
Massa do monólito (g)	0,0578
Área superficial específica (m^2g^{-1})	5,671

Observação: os detalhes de cada parâmetro estão descritos na seção 3.6.

O valor da área superficial específica $5,671 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ é relativamente baixo, embora esteja dentro da faixa típica de áreas encontradas na literatura para FEM poliméricas orgânicas, ou seja, de 5 a $50 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (FARIA *et al.*, 2006).

5. PERSPECTIVAS

A utilização de planejamentos de mistura para a otimização do preparo de FEM é crucial, uma vez que podem ser atribuídas seletividade e outras características eletrocromatográficas, com o emprego de uma gama de reagentes que podem ser utilizados. Com o desenvolvimento de modelos matemáticos que relacionem o modo de preparação das FEM com suas características morfológicas e estruturais e propriedades eletrocromatográficas, é possível que esforços sejam poupados na procura de FEM destinadas a análises de uma classe de compostos específica.

Além dos HPA e dos alquilbenzenos estudados neste trabalho, outros analitos de relevada importância, incluindo compostos carbonílicos, fenólicos, ácidos, básicos e quirais, pesticidas, herbicidas, produtos naturais, lipídios, vitaminas, drogas ilícitas, fármacos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos entre outros, como padrões e em amostras reais merecem atenção. Entende-se que após a otimização da FM, as FEM poderão ser usadas para análises de amostras contendo estes compostos. A ideia principal das análises por ECC de amostras é mostrar a aplicabilidade e potencial das colunas monolíticas. A utilização dos outros modos e outras colunas de ECC bem como outras técnicas analíticas de separação também é de suma importância para que a contribuição de cada uma possa ser compreendida.

Deve-se, ainda, ser construído um dispositivo para visualização ampliada das colunas, que facilitará o preenchimento e observação do monólito formado. Tal dispositivo consistirá em um suporte para acomodar o capilar de maneira retilínea e um bastão de vidro de 1,0 cm de diâmetro, que atua como uma lupa longitudinal (Figura 65). A ampliação atua na direção transversal do capilar, de forma que o comprimento deste não é alterado, apenas o diâmetro. Por isso e, pelo fato do capilar ser bastante flexível, é necessário deixá-lo numa posição fixa, retilínea e sem comprometer o funcionamento da injeção como um todo.

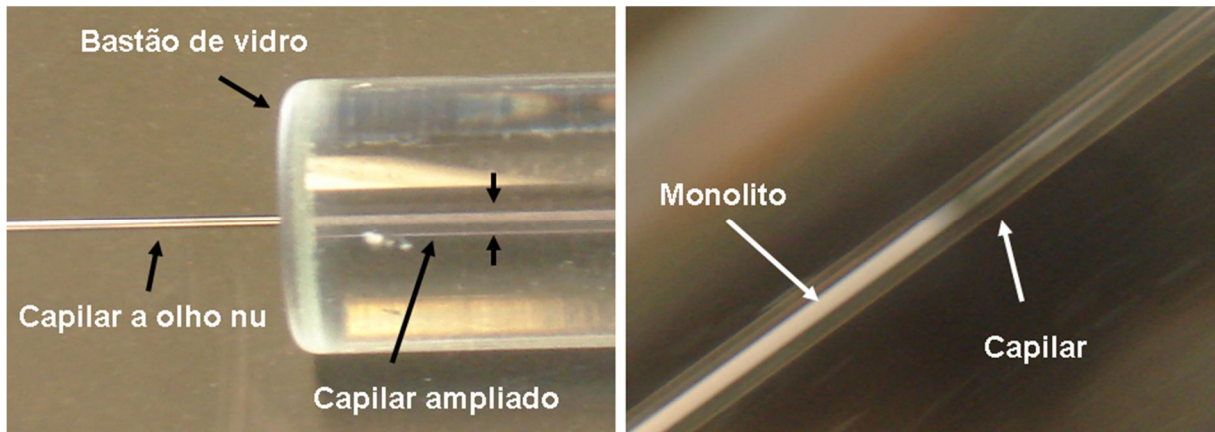


Figura 65. Fotografias digitais de um capilar contendo uma FEM. À esquerda, é possível observar a ampliação da imagem do capilar (aproximadamente três vezes) e à direita, o capilar numa região onde termina o monólito.

Além da MEV, outra técnica de grande importância para caracterização morfológica é a MET, a qual permite avaliar a qualidade e morfologia da estrutura monolítica porosa em nível de nanômetros, ordem de grandeza dos mesoporos.

Outra técnica que poderá ser utilizada na caracterização das FEM é a de espalhamento de raios X a baixo ângulo. Esta técnica é usada para determinar forma e tamanho de grandes moléculas ou para estudos morfológicos de agregados complexos ou sistemas poliméricos. Este tipo de experimento pode ser realizado atualmente no Brasil, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, localizado em Campinas, São Paulo. Este laboratório, por ser nacional, oferece oportunidade e estrutura para pesquisadores brasileiros utilizarem sua infraestrutura.

Outra alternativa de caracterização que pode ser utilizada é a Espectroscopia Raman. Esta técnica, complementar à espectroscopia no infravermelho, vem sendo empregada na identificação de grupos funcionais (LIANG; DAI e GUIOCHON, 2003), o que permite o monitoramento da adição de novos componentes à estrutura monolítica.

6. CONCLUSÕES

Nesta tese foi demonstrada a preparação otimizada de FEM polimerizadas por fotoiniciação, através do método sol-gel, em capilares de sílica fundida revestidos com poliacrilato, para aplicação em ECC, sendo possível compreender profundamente e aprimorar o processo de fabricação para um nível de maior confiança. Alguns aspectos considerados relevantes e cruciais para o desenvolvimento deste trabalho de Doutorado serão discutidos a seguir.

O revestimento de poliacrilato se mostrou altamente transparente na faixa de trabalho, acima de 370 nm e à luz visível, o que possibilitou visualizar e controlar a injeção do sol, de outras soluções, bem como observar a FEM formada no interior do capilar (polimerização *in situ*). Esta característica do poliacrilato, aliada à sua grande resistência mecânica, permitiu a obtenção de FEM de grande qualidade, sem a necessidade de remoção deste revestimento polimérico que protege a coluna. Até então, havia duas possibilidades para realizar uma polimerização fotoiniciada: remover o revestimento externo do capilar de poliimida, lembrando que este ato torna o capilar extremamente frágil e, de certa forma, inutilizável; ou utilizar capilares revestidos com teflon que são frágeis e de difícil manuseio, fato relatado em literatura e confirmado em laboratório. Com isso, pode-se dizer que o preparo de FEM em capilares revestidos com poliacrilato é um processo inédito, eficiente, estratégico, audaz e genuinamente brasileiro, uma vez que a *Microtube* (empresa brasileira voltada para fabricação de capilares e fibras ópticas) fabrica e disponibiliza colunas capilares para pesquisadores em centros de pesquisa no Brasil e no exterior.

Foi utilizada uma câmara fotorreatora *homemade*, que consiste num sistema fechado de emissão de luz UV prático e de baixo custo, capaz de promover a polimerização fotoiniciada de FEM em capilares revestidos com poliacrilato (ou teflon) estendidos, empregando lâmpadas fluorescentes e espelhos planos. As modificações feitas na câmara foram indispensáveis para um trabalho mais eficiente, uma vez que lâmpadas brancas, que não contribuíram para fotoiniciação, foram substituídas por lâmpadas negras, que se mostraram muito mais adequadas; mais seguro para o operador, já que foi feita a instalação de micro switch que interrompe instantaneamente o funcionamento da câmara com a porta aberta; e mais seguro

para o próprio sistema elétrico e lâmpadas, após instalação de fusível apropriado. Pelo fato desta câmara ter sido projetada com a finalidade específica de promover polimerização fotoiniciada em capilares estendidos sem a necessidade de gira-los ou encurva-los, além de não oferecer aquecimento indesejado, ela evidentemente foi grande responsável pelo sucesso alcançado neste trabalho. Vale lembrar que esta câmara já possui mais de cinco anos desde sua construção e até o presente momento não apresentou sinais de desgaste ou falhas de funcionamento, o que evidencia sua robustez.

A construção dos DAP permitiu um melhor controle de injeção de fases líquidas no interior de tubos com dimensões capilares fornecendo, além da pressão, grande precisão e homogeneidade. Os DAP, além de simples e práticos, tiveram ótima relação custo-benefício, se comparados a modelos comerciais. Uma bomba de infusão digital, que poderia ser utilizada para esta finalidade, tem o custo que varia de 300,00 a R\$ 8.000,00, dependendo de modelo, precisão, tipo de seringa entre outros. Além disso, o sistema de injeção como um todo se mostrou resistente, do ponto de vista mecânico, prático e linear, não havendo falta de ajuste de modelos lineares desde a rotação do parafuso até a saída de líquido das seringas. Com todas estas características, um importante passo foi dado em direção à produção de FEM mais reprodutíveis.

A otimização do preparo das FEM mediante auxílio de planejamento fatorial 2^{4-1} se mostrou uma ferramenta poderosa, uma vez que ela possibilitou investigar, em caráter qualitativo, a influência de quatro fatores de relevante importância através de apenas oito experimentos. Isto significa que foram poupados tempo e consumo de capilares e reagentes para realizar esta etapa, que possui certa complexidade experimental, já que envolve desde o preparo de soluções e misturas, passando por pré-tratamento, preenchimento de capilares, polimerização até a análise eletrocromatográfica. O fator de maior influência foi a porcentagem de porogênio sobre solução monomérica, sendo que uma diminuição de 90 para 80 % resultou em média no aumento de um pico separado no eletrocromatograma. A diminuição da vazão de FM, resultante do menor volume de porogênio, não afetou a qualidade de separação. O fator porcentagem de Irgacure 819 apresentou maior expressão na vazão, mas não muito significativo. Já o fator razão entre H_2O e MPTMS mostrou-se um pouco mais influente no tempo de análise, de forma que uma quantidade maior de H_2O em relação ao MPTMS no preparo da FEM causa uma diminuição no tempo

de análise. No entanto, esta diminuição no tempo não compensa a perda de separação e da vazão. O quarto fator, tempo de incidência de irradiação UV, pôde ser considerado não significativo em relação ao número de picos obtidos e a matriz de planejamento pode ser simplificada para uma matriz de planejamento fatorial completo 2^3 . A grande vantagem disso é que não foi preciso realizar os dezesseis experimentos (2^4) ou a fração complementar para se chegar a esta conclusão.

Os resultados obtidos em ECC relativos ao planejamento de experimento corroboraram com as caracterizações morfológicas efetuadas com as imagens de MEV. Evidentemente, as colunas com grandes lacunas de monólito na região central do capilar apresentaram grande vazão de FM, porém, com separações mais pobres, dada a ausência de material cromatográfico, responsável pela retenção diferenciada dos analitos. As imagens de MEV destas FEM preparadas com 90 % de porogênio sinalizam a formação de fases estacionárias tubulares abertas, muito embora estes resultados tenham sido insatisfatórios, o que sugere que este tipo de polímero não é adequado para esta finalidade.

A caracterização por espectroscopia no IV evidenciou quimicamente a formação de monólito. A contribuição do fotoiniciador Irgacure 819 no espectro do monólito é mínima, uma vez que a quantidade deste reagente utilizada é pequena (3,5%) e suas moléculas se encontram fotolizadas.

Como demonstração, as FEM otimizadas foram aplicadas em ECC na separação completa de compostos eletricamente neutros como HPA e alquilbenzenos. Estas separações evidenciam as características de retenção da FEM e confirmam, mais do que qualquer técnica de caracterização, a presença do produto almejado no interior do capilar, uma vez que seriam impossíveis de ocorrer apenas com a FM empregada, num modo convencional de EC.

Cabe ressaltar que, embora hoje seja possível preparar uma coluna a partir da mistura de reagentes e pré-tratamento do capilar até a obtenção do monólito, bem como sua utilização em ECC em apenas um ou dois dias de trabalho, o desenvolvimento necessário para se apresentar um método de preparo de colunas robusto, eficiente, confiável e principalmente reprodutivo requer muito mais tempo. Isto engloba o aperfeiçoamento e adaptação dos instrumentos utilizados em todo o processo, a aquisição de dispositivos específicos, reuniões com os grupos de pesquisa relacionados com este trabalho, entre outros. Assim é seguro dizer que cada coluna produzida é permeada não somente com poros, mas também com todo

um histórico de desenvolvimento. Além disso, este trabalho tem potencial para mais contribuição no meio científico. Levando-se em conta o que pode ser realizado com a infraestrutura desenvolvida para fabricação de FEM, pode-se dizer que um primeiro e grande passo foi dado.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, E. S. D.; SALIBA, W. A.; MILAGRES, B. G.; Montagem de câmara com lâmpada de ultravioleta de baixo custo. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 927, 2005.

AMATANI, T.; NAKANISHI, K.; HIRAO, K.; KODAIRA, T.; Monolithic Periodic Mesoporous Silica with Well-Defined Macropores. **Chemical Materials**, v. 17, p. 2114, 2005.

ATURKI, Z.; D'ORAZIO, G.; FANALI, S.; Rapid assay of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 26, p. 798, 2005.

AUGUSTIN, V.; JARDY, A.; GAREIL, P.; HENNION, M.-C.; In situ synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separations: Study of polymerization conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 80, 2006.

BAKER, D. R.; **Capillary Electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

BALESTEROS, M. R.; FARIA, A. F.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; Determination of Losartan Associated with Chlorthalidone or Hydrochlorothiazide in Capsules by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 554, 2007.

BALESTEROS, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RIBEIRO, S. J. L.; POLACHINI, F. C.; MESSADDEQ, Y.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3731, 2007.

BERNABÉ-ZAFÓN, V.; BENEITO-CAMBRA, M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; RAMIS-RAMOS, G.; MANUEL, J.; HERRERO-MARTÍNEZ; Photo-polymerized lauryl methacrylate monolithic columns for CEC using lauroyl peroxide as initiator. **Electrophoresis**, v. 30, p. 3748, 2009.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W.; **Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**. San Diego: Academic Press, 1990. 912

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E.; Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society** v. 60, n. 2, p. 309, 1938.

CAO, Z. H.; SHAN, G. R.; FEVOTTE, G.; SHEIBAT-OTHMAN, N.; BOURGEAT-LAMI, E.; Miniemulsion Copolymerization of Styrene and γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilane: Kinetics and Mechanism. **Macromolecules**, v. 41, p. 5166, 2008.

CARVALHO, M. L.; SANTHIAGO, M.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C.; Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper(II) complex. **Talanta**, v. 77, p. 394, 2008.

CHEN, J.-L.; Multi-wall carbon nanotubes bonding on silica-hydride surfaces for open-tubular capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 715, 2010.

CHRISTENSEN, A.; ÖSTMAN, C.; WESTERHOLM, R.; Ultrasound-assisted extraction and on-line LC–GC–MS for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban dust and diesel particulate matter. **Analitical and Bioanalitical Chemistry**, v. 381, p. 1206, 2005.

CIBA; Photoinitiators for UV Curing - Key Products Selection Guide. 2003. Disponível em: < http://www.mufong.com.tw/Ciba/ciba_guid/photo_uv_2.pdf >. Acesso em: 05/05/2011.

CIOLA, R.; **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho**. 1ª ed. São Paulo: Ed. Edgard Blücher LTDA, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.

COSTA, A. C. O.; COSTA, J. L.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; MICKE, G. A.; Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 140, 2007.

COSTA, A. C. O.; PERFEITO, L. S.; TAVARES, M. F. M.; MICKE, G. A.; Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis-Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, p. 123, 2008.

COSTA, R. O. R.; VASCONCELOS, W. L.; Structural modification of poly(2-hydroxyethyl methacrylate)–silica hybrids utilizing 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 304, p. 84, 2002.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D.; Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2026, 2009.

DITTMANN, M. M.; ROZING, G. E.; Capillary electrochromatography- a high-efficiency micro-separation technique. **Journal of Chromatography A**, v. 744, p. 63, 1996.

DUARTE, E. T. F. M.; XAVIER, T. P.; SOUZA, D. R. D.; MIRANDA, J. A. D.; MACHADO, A. E. D. H.; JUNG, C.; OLIVEIRA, L. D.; SATTLER, C.; Construção e estudos de performance de um reator fotoquímico tipo cpc ("compound parabolic concentrator"). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 921, 2005.

DULAY, M. T.; QUIRINO, J. P.; BENNETT, B. D.; KATO, M.; ZARE, R. N.; Photopolymerized Sol-Gel Monoliths for Capillary Electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 3921, 2001.

EELTINK, S.; ROZING, G. P.; SCHOENMAKERS, P. J.; KOK, W. T.; Practical aspects of using methacrylate-ester-based monolithic columns in capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, p. 74, 2006.

EPA; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Gulf Coastline. **United States Environmental Protection Agency**, 2011. Disponível em: <<http://www.epa.gov/bpspill/pahs.html>>. Acesso em: 23/05/2011.

EUERBY, M. R.; JOHNSON, C. M.; CIKALO, M.; BARTLE, K. D.; "Short-End Injection" Rapid Analysis Capillary Electrochromatography. **Chromatographia**, v. 47, n. 3, p. 135, 1998.

FARIA, A. F.; **Desenvolvimento, otimização e validação de metodologias por eletroforese capilar para análise de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose**. 2010. 195 (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300, 2006.

FILHO, L. C. G.; MICKE, G. A.; **Revista Analytica**, v. 30, p. 82, 2007a.

FILHO, L. C. G.; MICKE, G. A.; **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 477, 2007b.

GARGUILO, M. G.; THOMAS, D. H.; ANEX, D. S.; RAKESTRAW, D. J.; Laser-induced dispersed fluorescence detection of polycyclic aromatic compounds in soil extracts separated by capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 883, p. 231, 2000.

GUSEV, I.; HUANG, X.; HORVÁTH, C.; Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 273, 1999.

HILDER, E. F.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J.; Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 3, 2004.

IKEGAMI, T.; TANAKA, N.; Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 527, 2004.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J. D.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. D. O.; Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 310, 2010.

JIANG, T.; JISKRA, J.; CLAESSENS, H. A.; CRAMERS, C. A.; Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 923, p. 215, 2001.

JINNAI, H.; NAKANISHI, K.; NISHIKAWA, Y.; YAMANAKA, J.; HASHIMOTO, T.; Three-Dimensional Structure of a Sintered Macroporous Silica Gel. **Langmuir**, v. 17, p. 619, 2001.

JOCKUSCH, S.; TURRO, N. J.; Phosphinoyl Radicals: Structure and Reactivity. A Laser Flash Photolysis and Time-Resolved ESR Investigation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 11773, 1998.

JR., I. M. R.; PASQUINI, C.; Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83, 1997.

KANAMORI, K.; NAKANISHI, K.; HIRAO, K.; JINNAI, H.; Three-Dimensional Observation of Phase-Separated Silica-Based Gels Confined between Parallel Plates. **Langmuir**, v. 19, p. 5581, 2003.

KATO, M.; SAKAI-KATO, K.; TOYO'OKA, T.; DULAY, M. T.; QUIRINO, J. P.; BENNETT, B. D.; ZARE, R. N.; Effect of preparatory conditions on the performance of photopolymerized sol-gel monoliths for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 961, p. 45, 2002.

KENNEDY, R. T.; Bioanalytical applications of fast capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, p. 163, 1999.

KLEIN, L. C.; **Sol-Gel Technology For Thinfilms, Fibers, Preforms, Electronics, And Specialty Shapes**. Noyes Publications, 1987.

LI, W.; FRIES, D. P.; MALIK, A.; Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1044, p. 23, 2004.

LIANG, C.; DAI, S.; GUIOCHON, G.; A Graphitized-Carbon Monolithic Column. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 18, p. 4904, 2003.

LIANG XU, Y. S.; Protein separation by open tubular capillary electrochromatography employing a capillary coated with phenylalanine functionalized tentacle-type polymer under both cathodic and anodic electroosmotic flows. **Journal of Chromatography A**, v. 1183, p. 129, 2008.

LINTELMANN, J.; FISCHER, K.; KARG, E.; SCHRÖPPEL, A.; Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 508, 2005.

MAGALHÃES, D.; BRUNS, R. E.; VASCONCELLOS, P. D. C.; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-deaçúcar: Uma abordagem estatística. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 577, 2007.

- MARTIN, A. J. P.; SYNGE, R. L. M.; The Nobel Prize in Chemistry 1952. Disponível em: < http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/ >. Acesso em: 28/04/2011.
- MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M.; Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188, 2007.
- MESPLET, N.; MORIN, P.; FRANÇOIS, C.; AGROFOGLIO, L. A.; Simultaneous quantitation of nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary electrochromatography on a b-cyclodextrin-bonded silica stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 927, p. 161, 2001.
- MESPLET, N.; TRAN, T. T.; MORIN, P.; FRANCOIS, C.; An Original Way to Use a p-Cyclodextrin-Bonded Silica Stationary Phase in Electrochromatography. Application to the Achiral Separation of Nucleobases and Nucleosides. **Chromatographia**, v. 56, n. 1, p. 51, 2002.
- MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol—Total analysis time reduction strategies. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7957, 2009.
- NASSAR, E. J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; Influência da Catálise Ácida e Básica na Preparação da Sílica Funcionalizada pelo Método Sol-Gel. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 27, 2002.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos**. third. Campinas: Unicamp, 2007.
- NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J.; Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765, 2000.
- NORTON, D.; ZHENG, J.; SHAMSI, S. A.; Capillary electrochromatography of methylated benzo[a]pyrene isomers I. Effect of mobile phase tuning. **Journal of Chromatography A**, v. 1008, p. 205, 2003.
- OHYAMA, K.; WADA, M.; OHBA, Y.; FUJISHITA, O.; NAKASHIMA, K.; KURODA, N.; Rapid separation of barbiturates and benzodiazepines by capillary

electrochromatography with 3-(1,8-naphthalimido)propyl-modified silyl silica gel. **BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY**, v. 18, p. 396, 2004.

PANTOJA, M.; DIÁZ-BENITO, B.; VELASCO, F.; ABENOJAR, J.; REAL, J. C. D.; Analysis of hydrolysis process of g-methacryloxypropyltrimethoxysilane and its influence on the formation of silane coatings on 6063 aluminum alloy. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 6386, 2009.

POSTER, D. L.; SCHANTZ, M. M.; SANDER, L. C.; WISE, S. A.; Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 859, 2006.

RAMMOUZ, G.; USTA, J.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y.; COUDERC, F.; POINSOT, V.; **Journal of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology**, v. 10, n. (1-2), p. 25, 2007.

ROUQUEROL, J.; AVNIR, D.; FAIRBRIDGE, C. W.; EVERETT, D. H.; HAYNES, J. H.; PERNICONE, N.; RAMSAY, J. D. F.; SING, K. S. W.; UNGER, K. K.; Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1739, 1994.

SANTHIAGO, M.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C.; **Analitica Chimica Acta**, v. 613, p. 91, 2008.

SAWYER, L. C.; GRUBB, D. T.; **Polymer Microscopy**. 2^a. Londres: Chapman & Hall, 1996.

SCHMEER, K.; BEHNKE, B.; BAYER, E.; Capillary Electrochromatography-Electrospray Mass Spectrometry: A Microanalysis Technique. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 20, 1995.

SHAMSI, S. A.; AKBAY, C.; WARNER, I. M.; Polymeric Anionic Surfactant for Electrokinetic Chromatography: Separation of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollutants. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 3078, 1998.

SIOUFFI, A.-M.; Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 801, 2003.

SISINNO, C. L. S.; NETTO, A. D. P.; REGO, E. C. P. D.; LIMA, G. D. S. V.; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma

avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 671, 2003.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMITH, J. H.; **Chromatographic Properties of Silica-Based Monolithic HPLC Columns**. 2002. Blacksburg, VA.

SVEC, F.; MAJORS, R. E.; What Ever Happened to Capillary Electrochromatography? **LCGC North America**, v. 27, n. 12, p. 1032, 2009.

SVEC, F.; PETERS, E. C.; SÝKORA, D.; FRÉCHET, J. M. J.; Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v. 887, p. 3, 2000.

TANG, Q.; LEE, M. L.; Column technology for capillary electrochromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 648, 2000.

TAVARES, M. F. M.; Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173, 1996.

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

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ICHIKAWA, K.; TSUCHIYA, A.; ANDO, T.; **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 111, 1984.

TISELIUS, A. W. K.; The Nobel Prize in Chemistry 1948. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/>. Acesso em: 28/04/2011.

VAZ, F. A. S.; **Preparação de Fases Estacionárias Monolíticas em Capilares Revestidos com Poliacrilato para Aplicação em Eletrocromatografia Capilar**. 2007. 120 (Dissertação de Mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora

VAZ, F. A. S.; CASTRO, P. M.; MOLINA, C.; RIBEIRO, S. J. L.; POLACHINI, F. C.; MESSADDEQ, Y.; NUNES, A. P.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; External polyacrylate-

coating as alternative material for preparation of photopolymerized sol–gel monolithic column. **Talanta**, v. 76, p. 226, 2008a.

VAZ, F. A. S.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; QUEIROZ, M. P. G. D.; RIBEIRO, S. J. L.; Construção de câmara de luz ultravioleta para fotopolimerização de fases estacionárias monolíticas. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2156, 2008b.

VÉGVÁRI, Á.; Homogeneous gels for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, p. 50, 2005.

WALCHER, W.; OBERACHER, H.; TROIANI, S.; HÖLZL, G.; OEFNER, P.; ZOLLA, L.; HUBER, C. G.; Monolithic capillary columns for liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry in proteomic and genomic research. **Journal of Chromatography B**, v. 782, p. 111, 2002.

WANG, M.; QU, F.; SHAN, X.-Q.; LIN, J.-M.; Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 989, p. 285, 2003.

WÄTZIG, H.; KAUPP, S.; GRAF, M.; Inner surface properties of capillaries for electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 588, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W.; Polynuclear aromatic hydrocarbons in Drinking-water. In: (Ed.). **Guidelines for drinking-water quality, Health criteria and other supporting information**. Geneva, v.2, 1998. p.27.

WU, R. A.; HU, L.; WANG, F.; YE, M.; ZOU, H.; Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 369, 2008.

XIE, M.-J.; FENG, Y.-Q.; DA, S.-L.; MENG, D.-Y.; REN, L.-W.; Capillary electrophoresis and open tubular capillary electrochromatography using a magnesia–zirconia coated capillary. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, p. 255, 2001.

YAN, J.; WANG, L.; FU, P. P.; YU, H.; Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. **Mutation Research**, v. 557, p. 99, 2004.

ZHANG, Y. P.; ZUO, G. Q.; GONG, W. J.; DENG, Y. E.; LI, Q. M.; Novel preparation of monolithic imprinted columns for electrochromatographic separation by photopolymerization. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 734, 2007.

ZOU, H.; HUANG, X.; YE, M.; LUO, Q.; Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 5, 2002.

APÊNDICE

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

Resumo

Este trabalho descreve a otimização de um método de eletroforese capilar de zona (ECZ) capaz de separar em linha-base dez compostos orgânicos, sendo os ácidos: acético, aspártico, cítrico, fórmico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico e tartárico. O método emprega como eletrólito uma mistura de ácido ftálico e Tris, sem adição de bases ou ácidos fortes para correção de pH, o que contribui com um perfil dos eletroferogramas mais adequado para análise. Para a otimização, foram feitos um planejamento 3^2 (nove experimentos) cujos parâmetros foram a concentração do ácido ftálico e pH do eletrólito e um planejamento 2^3 com triplicatas autênticas no ponto central (onze experimentos) cujos parâmetros foram concentração de CTAB, voltagem e temperatura. Os níveis ótimos obtidos foram utilizados para uma nova otimização uni-variada (convencional) e de caráter exploratório, onde se buscou uma faixa alternativa de pH. A título de teste da condição ótima, foram feitas trinta replicatas com o mesmo eletrólito de trabalho onde se observou um desvio padrão relativo de cada pico variando de 0,081 a 0,36 % (para tempo de migração) e de 2,4 a 4,6 % (para área). Embora o método apresente potencial para análises destes ácidos orgânicos em diferentes tipos de matrizes, no presente caso, este foi aplicado na separação e quantificação de citrato, malato e aspartato em extratos vegetais (*Brachiaria Brizantha*) para o estudo de mecanismos de tolerância ao alumínio. Este trabalho, desenvolvido em parceria com a EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora durante o período de Doutorado, envolveu aspectos como treinamento em técnica convencional de CZE, auxílio de alunos de Iniciação Científica e de Projeto de Conclusão de Curso, apresentação de seminários, apresentação de trabalho resumido em congresso nacional e redação de artigo para publicação em revista de elevado impacto.

A.1 INTRODUÇÃO

Os ácidos orgânicos (AO) são constituintes importantes de vários tipos de produtos e processos, estando presentes em alimentos, bebidas, fluido biológicos complexos (animais e vegetais), em amostras industriais, ambientais entre outras. Alguns AO têm importância médica em relação às suas concentrações no sangue, urina e outros fluidos biológicos, uma vez que são compostos formados nas diferentes fases do metabolismo de aminoácidos ou ácidos graxos, e podem funcionar como indicadores de uma variedade de doenças (CHEN *et al.*, 1996; MORENO; JURADO e BARROSO, 2003).

Além disso, os níveis de AO em alimentos e bebidas são importantes parâmetros que fornecem informações relevantes sobre a qualidade em geral, classificação, origem e possibilidade de falsificação desses tipos de matrizes. A presença da AO pode afetar as propriedades organolépticas (sabor, aroma e cor), estabilidade nutricional, aceitabilidade e qualidade em geral. Portanto, o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos capazes de realizar uma análise simultânea de OA em diferentes matrizes é importante (MORENO; JURADO e BARROSO, 2003; SANTALAD *et al.*, 2007).

Atualmente, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) são usados em laboratórios clínicos para a detecção de AO de cadeia curta em fluidos biológicos e em amostras de alimentícias. Apesar de sua alta sensibilidade e especificidade analítica, estes métodos geralmente requerem pré-tratamento da amostra, derivatização e tempos de separação extensos (CHEN *et al.*, 1996). A eletroforese capilar de zona (ECZ) tem desempenhado importante papel na ciência de separação moderna e atualmente adquiriu uma importância considerável como técnica de separação de espécies iônicas de baixo peso molecular em diferentes matrizes, pois apresenta vantagens, em comparação com outras técnicas separação, como versatilidade, seletividade, alta eficiência, sensibilidade, curto tempo de análise preparo simples de amostra (em geral não é necessária a etapa de derivatização), baixo custo e ausência de solventes orgânicos no eletrólito, o que está em conformidade com o princípio da química verde.

Métodos baseados em EC também têm sido utilizados para análise de AO de baixo peso molecular em bebidas e alimentos, com detecção direta ou indireta e fluxo eletrosmótico (FEO) invertido através de amônio quaternário adição de sal na BGE como CTAB, CTOH, TTAB.

Por detecção direta, fosfato de sódio (MATO *et al.*, 2006b; MATO *et al.*, 2006c; MATO; SUÁREZ-LUQUE e HUIDOBRO, 2007; RAMAUTAR; SOMSEN e JONG, 2007) e tetraborato de sódio (MORENO; JURADO e BARROSO, 2003; SANTALAD *et al.*, 2007) são os principais reagentes utilizados, pois apresentam mobilidade compatíveis com AO e absorção molar muito baixa a 200 nm.

Com detecção indireta, ácido ftálico tem sido usado como cromóforo no eletrólito, fornecendo separação simultânea parcial dos ácidos oxálico, tartárico, fórmico, málico, cítrico, succínico, glutárico, acético e láctico em 7 minutos (WANG *et al.*, 2003).

Tendo em conta a importância da análise da AO, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia alternativa para a separação simultânea dos ácidos acético, aspártico, cítrico, fórmico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico e tartárico por CZE com detecção indireta no UV. O eletrólito consiste numa mistura de ácido ftálico e tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) como tampão cromóforo, sem adição de bases ou ácidos fortes para corrigir o pH, aumentando a estabilidade de separação da linha de base. Parte do desenvolvimento deste método foi utilizada para analisar fluidos de extratos vegetais provenientes de folhas, raízes e soluções nutritivas, como colaboração com o Pq. Dr. Leônidas P. Passos da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG. Outra etapa foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Gustavo A. Micke do Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

A.2 EXPERIMENTAL

A.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes foram de grau analítico. Hidróxido de sódio, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácidos acético, aspártico, cítrico, fórmico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico e tartárico foram obtidos da Vetec. Brometo de cetitrimetilamônio (CTAB) foi obtido da Sigma.

Soluções estoque dos padrões (50 mmolL⁻¹) foram preparadas em água purificada (Milli-Q Systems) e mantidas em refrigerador até o momento de uso, quando foram, então, diluídas para 1,0 mmolL⁻¹.

Solução estoque de ácido ftálico 50 mmolL⁻¹/ TRIS 75 mmolL⁻¹ foi utilizada para o preparo do eletrólito. Solução estoque de CTAB 10 mmolL⁻¹ foi adicionada ao eletrólito para a inversão do fluxo. O pH do eletrólito foi ajustado com pequenas quantidades de tris.

A.2.2 Instrumental

Os experimentos de separação foram feitos num equipamento de eletroforese capilar (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com DAD (240 nm), com controle de temperatura e software para controle, aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

Foram utilizados capilares de sílica fundida revestidos com poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo) por 75 µm de d.i. por 375 µm de d.e.

A.2.3 Procedimentos analíticos

Na primeira vez de uso, o capilar foi pré-tratado por 30 minutos com passagem de solução de hidróxido e sódio a 1.0 molL^{-1} . Para cada nova condição experimental, o capilar foi tratado por 5 minutos com passagem de solução de hidróxido e sódio a 1.0 molL^{-1} , 5 minutos de água e 15 minutos com o eletrólito em questão. Entre cada corrida, o capilar foi tratado por 2 minutos com o eletrólito. As injeções foram feitas com 5m mbar por 2 segundos e a detecção foi estabelecida em 240 nm. Parâmetros como temperatura, voltagem, pH do eletrólito e concentração dos constituintes foram manipulados nos estudos dos planejamentos. Os padrões foram injetados no modo hidrodinâmico.

A.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A.3.1 Considerações preliminares

Estudos teóricos de caráter exploratório foram feitos por simulação através do software *Peakmaster 5.2* com os ácidos oxálico, fórmico, tartárico, málico, cítrico, pirúvico, succínico, acético, láctico e aspártico para se estabelecer a princípio quais faixas de pH poderiam ser investigadas, em função da presença de picos de sistema, do perfil de separação e das constantes de dissociação de cada espécie. Uma vez que, os dez AO apresentam baixa absorvidade molar, o uso de um aditivo cromóforo no eletrólito, o ácido ftálico, foi necessário para propiciar a detecção indireta no UV. O Tris foi o reagente selecionado como base para ajustar o pH do eletrólito de corrida.

Os eletroferogramas simulados foram utilizados para designar as possíveis faixas de pH de trabalho, juntamente com os dados de mobilidade efetiva dos dez analitos e do ácido ftálico, que foram reunidos num gráfico de curvas de mobilidade, na faixa de pH de 3,0 a 7,0 (Figura A1). As curvas e os eletroferogramas foram feitos com correção de força iônica, recurso que possibilita a obtenção de dados mais exatos, em função da ambiência gerada pelos eletrólitos. A permanência da mobilidade do ácido ftálico sempre na região intermediária das mobilidades dos analitos é um bom indicativo de um eletrólito conveniente para uma formação de picos mais simétricos.

Foi evidenciada nos eletroferogramas a presença de pico de sistema na janela de separação (região do eletroferograma onde se situam os picos das espécies de interesse) na faixa de pH entre 4,2 e 5,5 (Figura A2). Logo, esta faixa foi desconsiderada, permanecendo como possíveis alvos as faixas de pH 3,0 a 4,2 e de pH 5,5 a 7,0, mais propícias para a investigação experimental, com boa possibilidade de separação.

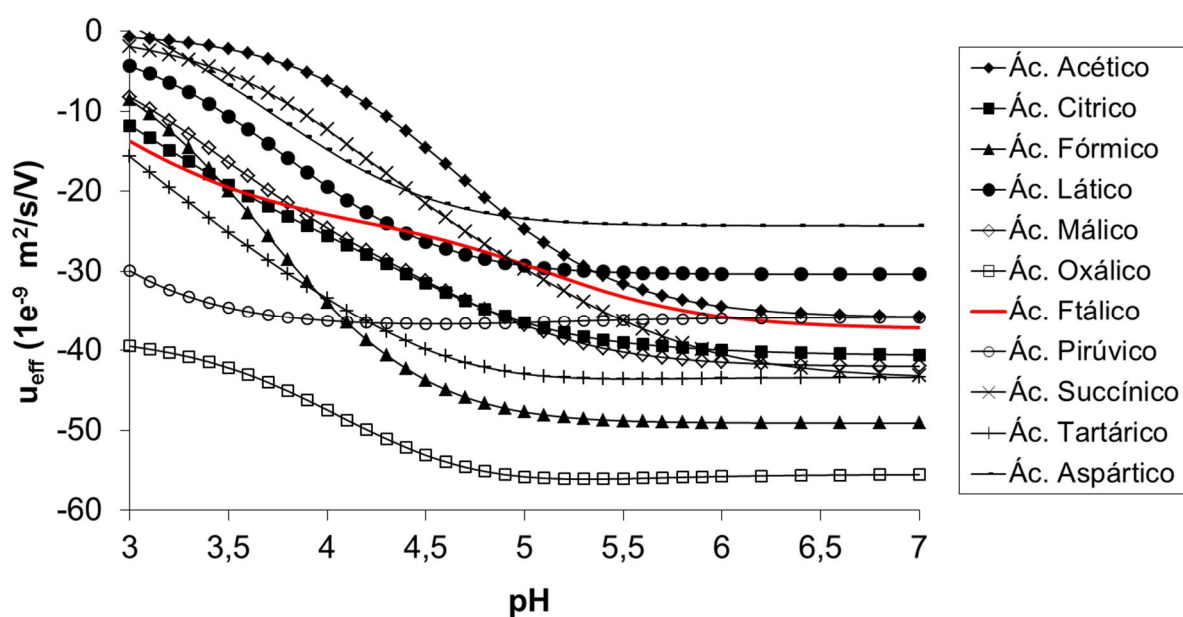


Figura A1: Curvas de mobilidade efetiva versus pH com correção de força iônica.

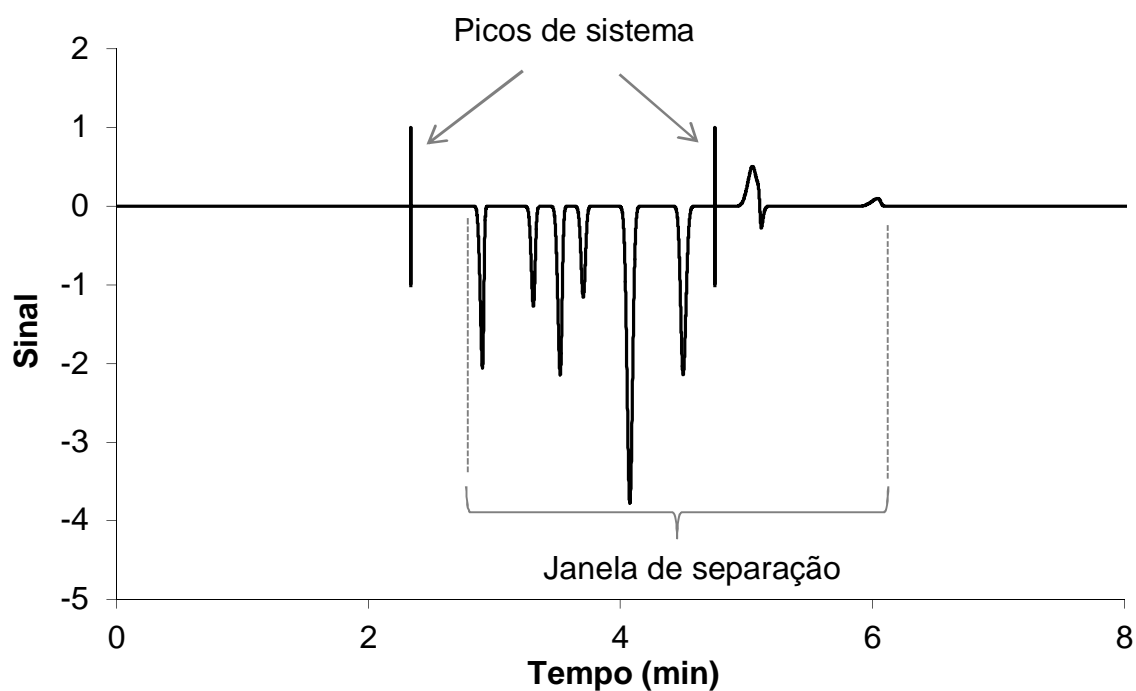


Figura A2: Exemplo de eletroferograma simulado no Peakmaster 5.2 (pH 4,5), apontando pico de sistema na janela de separação, interferindo a integridade dos picos mais próximos.

A.3.2. Otimização experimental

Após a avaliação teórica, uma primeira investigação experimental foi realizada com o intuito de se verificar o perfil de separação dos ácidos orgânicos em função da concentração do ácido ftálico no eletrólito e do pH selecionado. Um primeiro planejamento (Tabela A1) foi feito com o intuito de se verificar o comportamento do eletrólito através do perfil dos eletroferogramas (Figura A3) e do número de picos separados, frentes diferentes pH e concentrações de ácido ftálico. O CTAB foi utilizado como inversor de FEO, tendo a concentração fixada em $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$. Demais condições experimentais como comprimento do capilar, voltagem, injeção, comprimento de onda e temperatura no interior do cartucho foram 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo), -20 kV, 12,5 mbar por 5 s, 240 nm, e $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

Tabela A1. Planejamento fatorial 3^2 para concentração de ácido ftálico e pH.

Experimentos	A	B	C	D	E	F	G	H	I
pH	-	-	-	0	0	0	+	+	+
Ácido ftálico	-	0	+	-	0	+	-	0	+

pH: (-) 5,4; (0) 5,6; (+) 5,8; Ácido ftálico (mmolL^{-1}): (-) 10,0; (0) 15,0; (+) 20,0;

Os eletroferogramas da Figura A3, de maneira geral, apresentaram resultados insatisfatórios em relação ao perfil do pico (picos assimétricos e alargados) ou problemas de coeluição para os ácidos oxálico, cítrico e aspártico. É possível observar que não há diferenças significativas quando se aumenta a concentração de ácido ftálico no eletrólito (da esquerda para direita), há apenas uma pequena melhora na estabilidade da linha base e na separação dos picos. Entretanto, em concentrações superiores a 20 mmolL^{-1} , o ruído da linha base torna-se significativo, o que sugere que 20 mmolL^{-1} seja a uma boa concentração de trabalho.

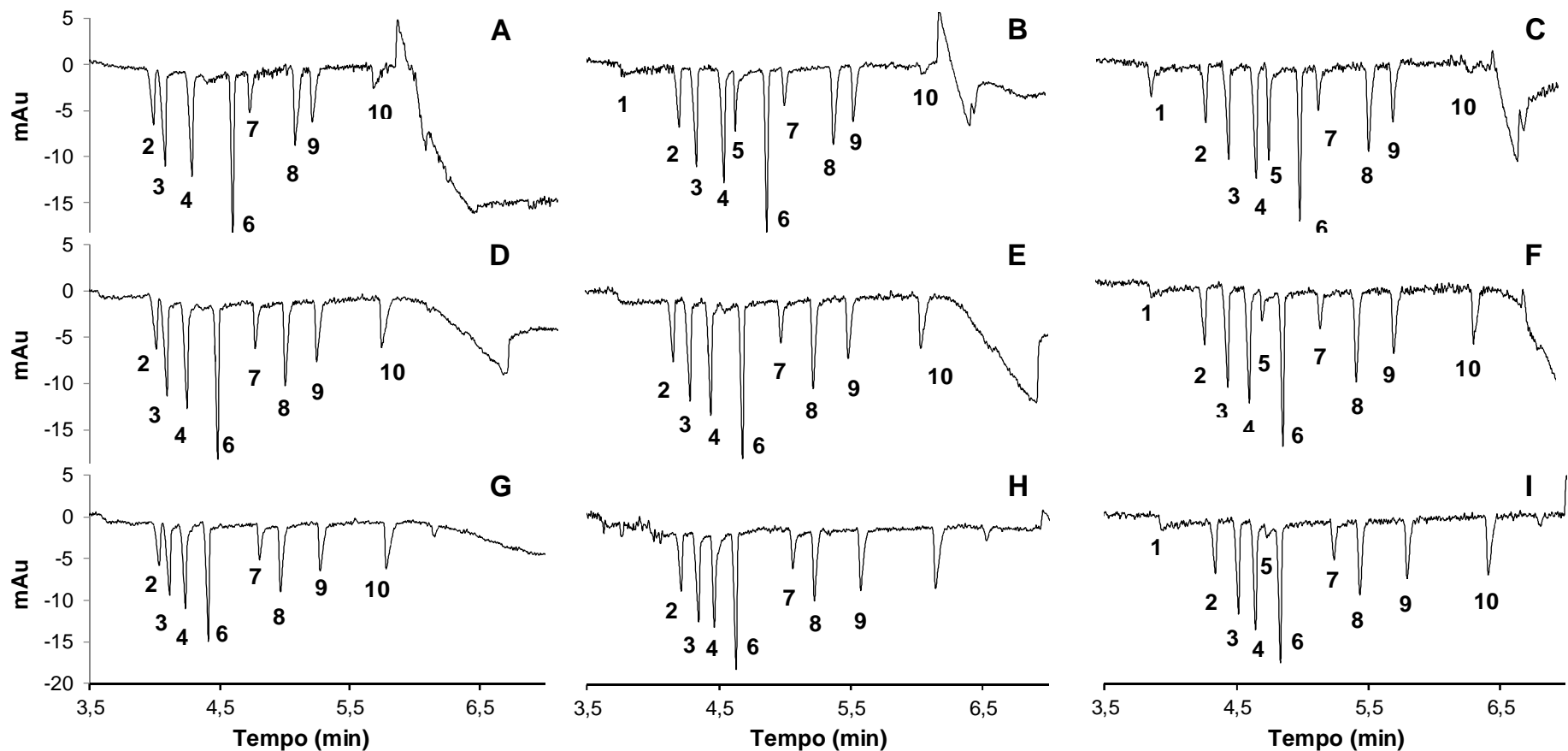


Figura A3: Eletroferogramas do 1º planejamento. Condições: pH e concentração de ácido ftálico, vide Tabela A1; CTAB: 0,2 mmolL⁻¹; voltagem: -15 kV; temperatura 25 °C; injeção: 12,5 mbar x 5 s; padrões dos ácidos (1 mmolL⁻¹): oxálico (1), fórmico (2), tartárico (3), málico (4), cítrico (5), pirúvico (6), succínico (7), acético (8), láctico (9) e aspártico (10).

Os principais efeitos com a troca de pH (direção vertical) são os deslocamentos de um pico de sistema localizado próximo ao pico do último analito e a presença ou não do pico do ácido cítrico (5). Em pH a partir de 5,6 (eletroferogramas D, E, F, G, H e I), o pico de sistema se mantém afastado do último pico, mas somente nos pH 5,4 (eletroferogramas A, B e C), é possível analisar o ácido cítrico. Cabe salientar que o pico do ácido oxálico (pico 1) sai amplamente prejudicado nestas condições, de forma que não foi encontrada uma resposta que abrangesse uma boa separação dos dez analitos.

Num segundo momento, foi realizado um planejamento 2^3 com triplicata no ponto central (Tabela A2) que envolveu como fatores a voltagem e temperatura de corrida e a concentração de CTAB no eletrólito. A concentração de ácido ftálico foi mantida a 20 mmolL^{-1} , pH 5,4 ajustado com Tris.

Tabela A2. Planejamento fatorial 2^3 para concentração de CTAB, voltagem e temperatura.

Experimentos	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
CTAB	-	+	-	+	-	+	-	+	0	0	0
Voltagem	-	-	+	+	-	-	+	+	0	0	0
Temperatura	-	-	-	-	+	+	+	+	0	0	0

CTAB (mmolL^{-1}): (-) 0.2; (0) 0.5; (+) 0.8; Negative Voltage (kV): (-) 15; (0) 20; (+) 25; Temperature ($^{\circ}\text{C}$): (-)20.0; (0) 22.5; (+) 25.0;

Neste estudo, o resultado esperado foi uma melhora na separação, levando-se em conta a relação sinal-ruído, separação dos picos dos analitos, tempo de análise e repetibilidade entre as corridas eletroforéticas. As melhores respostas convergiram para o experimento O (CTAB: $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; voltagem: -15 kV; temperatura: $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A principal diferença foi relacionada à repetibilidade, sendo que os desvios padrão relativos para o tempo de migração dos analitos ficaram em torno de 0,05 % (para três análises) e para as áreas dos picos ficaram por volta de 2,8 %. A Figura A4 mostra os eletroferogramas para as triplicatas do experimento O.

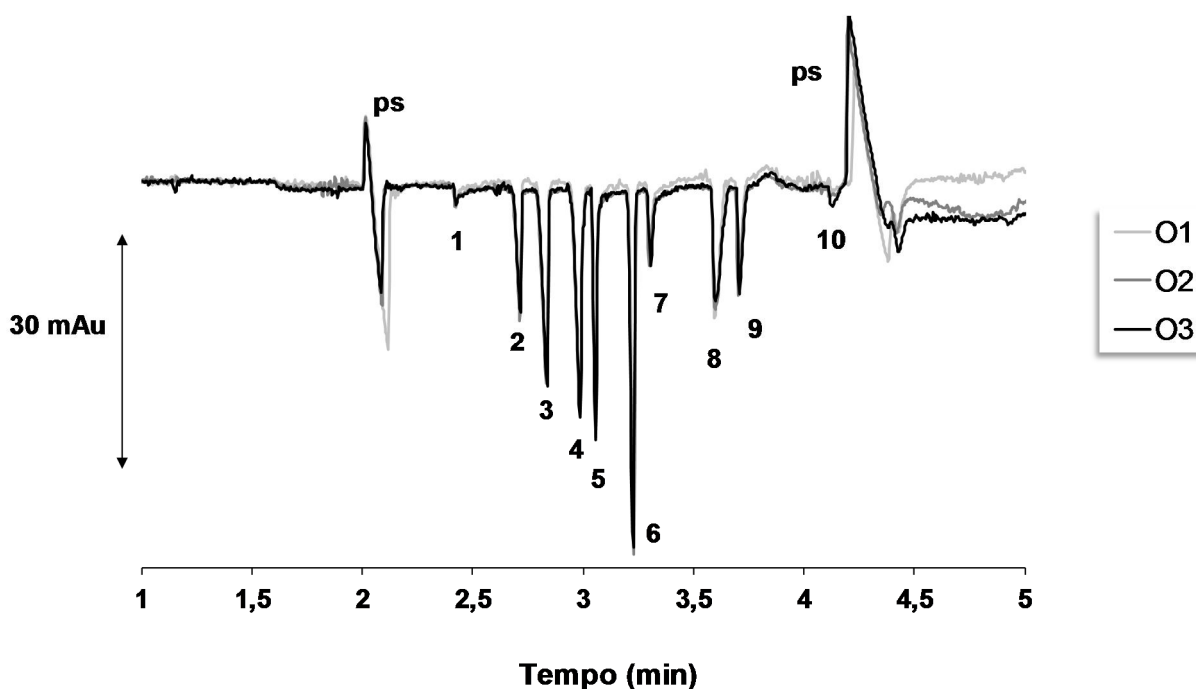


Figura A4: Eletroferogramas da triplicata do experimento O (O1, O2 e O3). Condições: pH 5,4; ácido ftálico: 20 mmolL^{-1} ; CTAB: $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; voltagem: -15 kV ; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; padrões dos ácidos (1 mmolL^{-1}): oxálico (1), fórmico (2), tartárico (3), málico (4), cítrico (5), pirúvico (6), succínico (7), acético (8), láctico (9) e aspártico (10). Picos de sistema (ps).

Com o intuito de se localizar uma região alternativa de pH onde fosse possível a análise dos dez compostos simultaneamente, foi feito um novo estudo variando-se apenas o pH, na faixa de 3,2 a 4,0. Os eletroferogramas são mostrados na Figura A5:

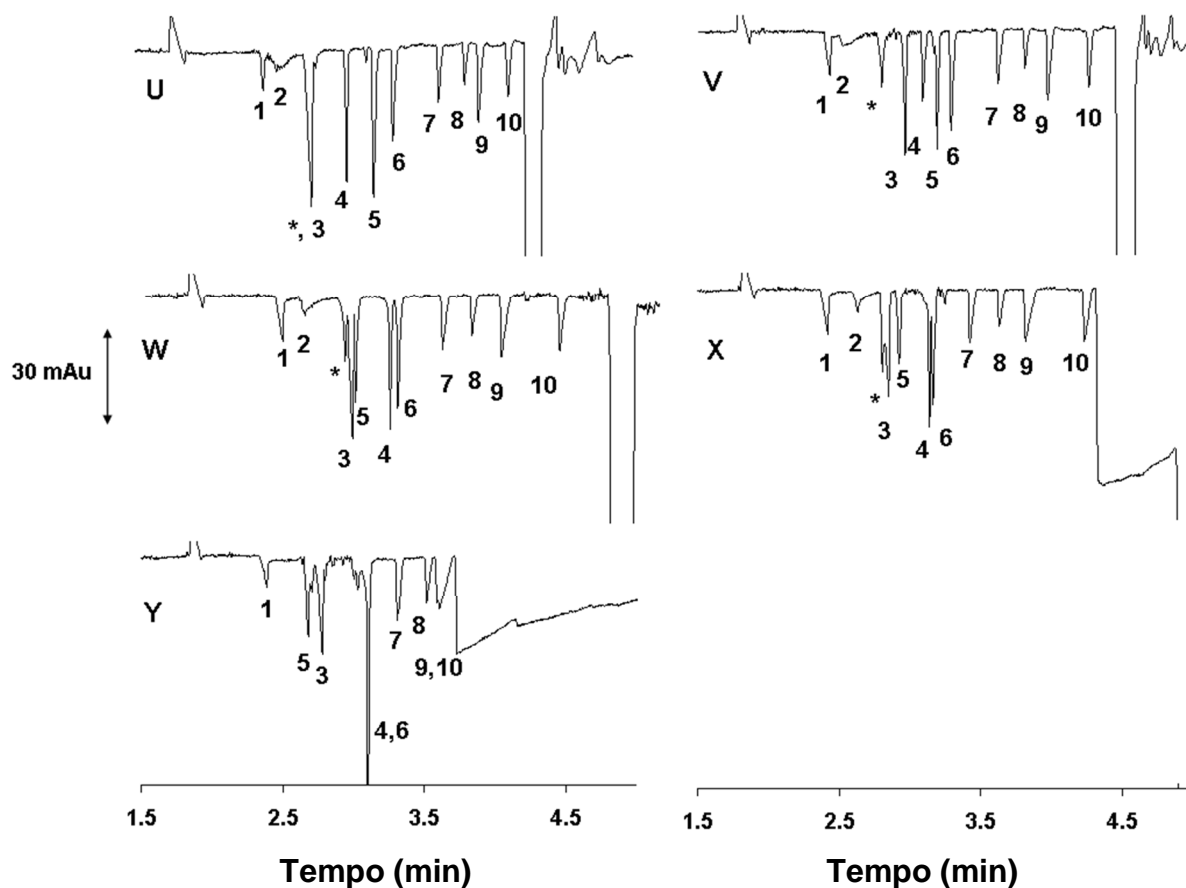


Figura A5: Eletroferogramas obtidos em diferentes pH: 3,2 (U); 3,4 (V); 3,6 (W); 3,8 (X) e 4,0 (Y). Condições: concentração de ácido ftálico: 20 mmolL^{-1} ; CTAB: $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; voltagem: -15 kV ; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: $25 \text{ mbar} \times 2 \text{ s}$; detecção UV: 240 nm ; padrões dos ácidos (1 mmolL^{-1}): oxálico (1), pirúvico (2), tartárico (3), cítrico (4), fórmico (5), málico (6), láctico (7), succínico (8), aspártico (9) e acético (10). Pico desconhecido (*).

O eletroferograma V (pH 3,4), diferente dos outros, mostra a separação completa dos dez ácidos orgânicos. Entretanto, é importante salientar que o pico do ácido pirúvico (2) foi severamente afetado em toda esta faixa de pH estudada.

Para se avaliar a repetibilidade do método, foram feitas trinta injeções com uma mistura contendo os dez padrões na condição do eletroferograma V (Figura A6). O desvio padrão relativo (DPR) de cada pico foi calculado, variando de 0,081 a 0,36 % para tempo de migração e de 2,4 a 4,6 % para área (com exceção do pico do ácido pirúvico que, por ter sido afetado, apresentou um DPR igual a 12,3 %) (Tabela A3).

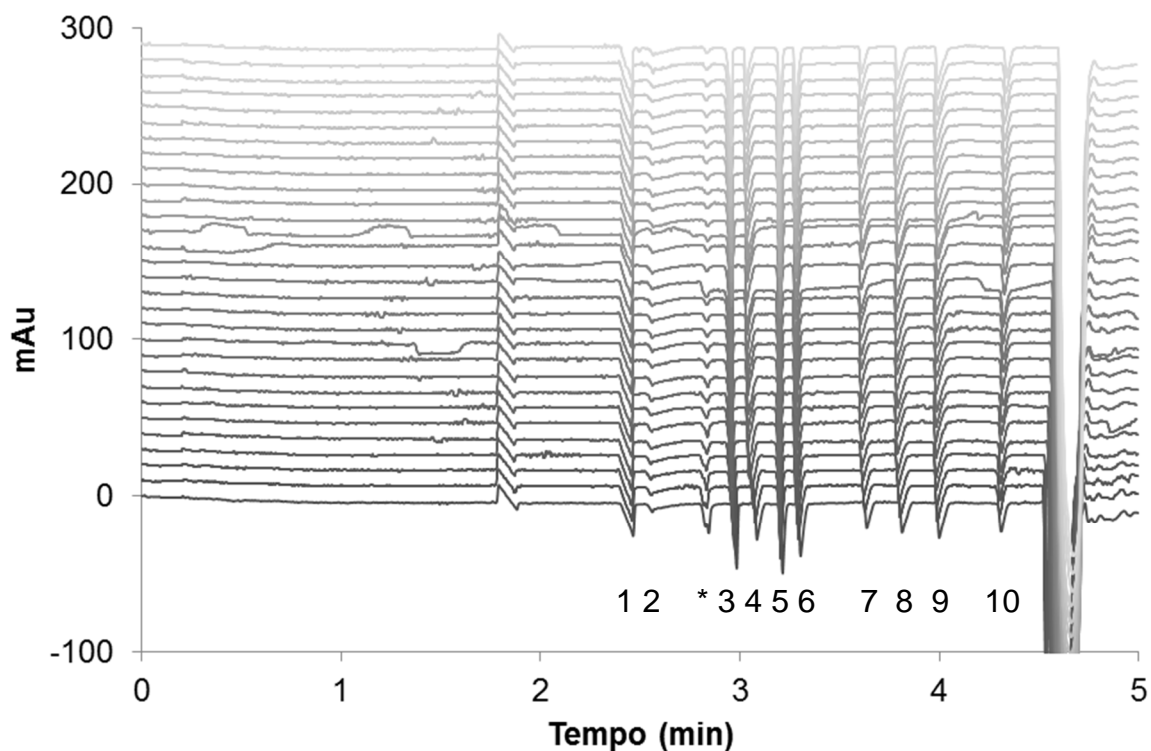


Figura A6: Eletroferogramas obtidos em 30 replicatas. Condições: concentração de ácido ftálico: 20 mmolL^{-1} ; CTAB: $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; pH 3,4; voltagem: -15 kV ; temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$; injeção: $25 \text{ mbar} \times 2 \text{ s}$; detecção UV: 240 nm ; padrões dos ácidos (1 mmolL^{-1}): oxálico (1), pirúvico (2), tartárico (3), cítrico (4), fórmico (5), málico (6), láctico (7), succínico (8), aspártico (9) e acético (10). Pico desconhecido (*). Cada eletroferograma foi deslocado pelo eixo vertical 10 mAu em relação ao anterior, para facilitar a visualização.

Tabela A3. Médias e desvios padrão relativos dos tempos de migração e das áreas dos picos dos padrões de ácidos orgânicos, para 30 injeções consecutivas.

Ácidos	Médias		DPR (n = 30)	
	T _{mig} (min)	Área	T _{mig}	Área
Oxálico	2,45	46,1	0,10	4,4
Pirúvico	2,56	18,1	0,15	12,3
Tartárico	2,96	47,0	0,22	2,9
Cítrico	3,04	33,3	0,45	2,4
Fórmico	3,20	48,4	0,13	2,8
Málico	3,28	46,2	0,20	2,6
Lático	3,61	26,3	0,20	3,1
Succínico	3,79	37,6	0,17	3,6
Aspártico	3,99	42,7	0,10	3,8
Acético	4,32	29,4	0,23	3,3

A.3.3 Amostras

O método desenvolvido foi utilizado para quantificar os ácidos cítrico, málico e aspártico em fluidos de extratos vegetais provenientes de folhas, raízes e soluções nutritivas, como colaboração com o Pq. Dr. Leônidas P. Passos da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG. O intuito deste estudo foi compreender o comportamento fisiológico e o balanço nutricional da *Brachiaria brizantha* (espécie de gramínea) em resposta à toxidez por alumínio como contaminante no solo. A toxidez causada por alumínio é uma das principais limitações da produção agrícola no Brasil. Grande parte dos solos é ácida, o que influencia significativamente no processo de intoxicação.

A solubilidade do alumínio no solo e, conseqüentemente, sua toxidez são influenciadas por vários fatores, incluindo pH, tipo de argila predominante, concentração de sais e teor de matéria orgânica do solo (Foy, 1974; Silva, 1997). A utilização de corretivos da acidez do solo não é a estratégia mais viável (por razões técnicas e econômicas), portanto a investigação dos mecanismos de tolerância ao alumínio tem merecido atenção especial.

Existem três classes principais de mecanismos de tolerância ao alumínio: bloqueio da entrada de alumínio pela raiz; acúmulo de alumínio em locais específicos na planta; e liberação de elicitores (produtos do metabolismo cuja função é desencadear mecanismos de defesa da planta ao ataque externo) para a inativação do alumínio. A presença de ácidos orgânicos em raízes desenvolvidas em solução contendo alumínio constitui indício de que o mecanismo de tolerância da *Brachiaria brizantha* está associado a estes elicitores. Assim, a planta foi submetida a diferentes tratamentos, considerando-se o pH e a presença do alumínio. A extração das amostras foi feita e, após filtração foi analisada em EC. A Figura A7 mostra o perfil de quatro eletroferogramas de raiz e folha com ou sem a influência do alumínio.

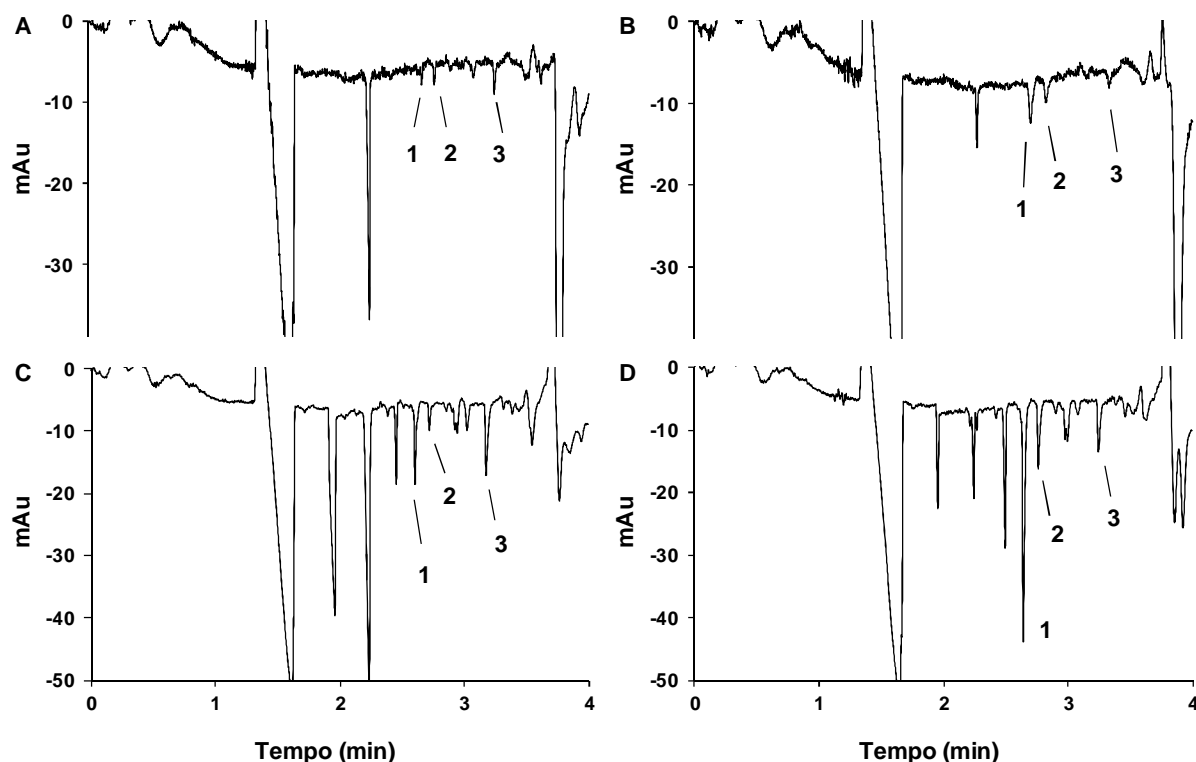


Figura A7. Eletroferogramas de amostras de extratos vegetais. Condições: concentração de ácido ftálico: 20 mmolL^{-1} ; CTAB: $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; voltagem: -15 kV ; temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; injeção: $25 \text{ mbar} \times 2 \text{ s}$; ácidos cítrico (1), málico (2) e aspártico (3). As concentrações estão na Tabela A4. Os demais picos não foram identificados e quantificados.

Os três picos foram identificados por adição de padrão. A quantificação foi feita através de curva de calibração externa, uma vez que a quantidade de amostra disponível foi pequena. As equações das regressões lineares foram:

$$A_{\text{cit}} (\pm 0.560) = 30.406 (\pm 0.512) \times C_{\text{cit}} - 0.454 (\pm 0.223) \quad (\text{Equação 1})$$

$$A_{\text{mal}} (\pm 1.059) = 27.999 (\pm 0.970) \times C_{\text{mal}} - 0.315 (\pm 0.421) \quad (\text{Equação 2})$$

$$A_{\text{asp}} (\pm 0.943) = 29.004 (\pm 0.863) \times C_{\text{asp}} + 0.017 (\pm 0.375) \quad (\text{Equação 3})$$

Para os ácidos cítrico, málico e aspártico, respectivamente, onde A é a área do pico e C sua concentração. Uma vez que os valores dos testes de falta de ajuste foram abaixo dos valores tabelados ($F_{\text{cit}} = 1,85$; $F_{\text{mal}} = 1,32$; $F_{\text{asp}} = 3,41$ menores que $F_{3;10} = 3,71$), pode-se dizer que não houve falta de ajuste nas faixas de concentração investigadas, dentro de 95 % de confiança. Os limites de detecção (LOD) foram 0,0244, 0,0222 e 0,0222 mmol L⁻¹ (4,69; 2,98 e 2,96 mg L⁻¹) e os limites de quantificação (LOQ) foram 0,0732; 0,0667 e 0,0667 mmol L⁻¹ (14,07; 8,94 e 8,87 mg L⁻¹) para os ácidos cítrico, málico e aspártico, respectivamente.

Tabela A4. Concentrações dos ácidos cítrico, málico e aspártico e suas recuperações em extratos vegetais.

Eletroferograma		Concentrações dos ácidos (mmol L ⁻¹)		
(Figura A7)	Amostra	Cítrico	Málico	Aspártico
	Solução	0	0	0
	Solução (Al)	0	0	0
A	Raiz	0,076	0,092	0,119
B	Raiz (Al)	0,323	0,215	0,165
C	Folha	0,361	0,149	0,518
D	Folha (Al)	1,424	0,483	0,403

(Al): Amostra sob influência do alumínio.

A.3.4 Otimização Plackett-Burman

Após a investigação detalhada dos planejamentos anteriores, foi realizado um novo planejamento de experimento, em parceria com o Prof. Dr Gustavo Micke, do tipo Plackett–Burman cujas variáveis foram: voltagem, temperatura, concentração de TRIS, concentração de CTAB e tempo de injeção, com o intuito de tornar o método adequado para separação dos AO em amostras de sucos de frutas. Foram empregados doze fatores e dois níveis e o eletroferograma de melhor separação foi obtido com as seguintes condições: concentração de TRIS (35,0 mmolL⁻¹); concentração de CTAB (0,8 mmolL⁻¹); voltagem (-20,0 kV); temperatura (25,0 °C); e injeção (3,0 s · 50 mbar).

A.4 CONCLUSÕES

Uma separação completa por linha-base de dez ácidos orgânicos foi demonstrada utilizando como tampão o cromóforo ácido ftálico / TRIS, sob FEO invertido e detecção indireta (240 nm), em 4 min de análise. Os planejamentos realizados se mostraram uma ferramenta alternativa interessante para auxiliar a otimização das condições de separação eletroforética. O método otimizado foi aplicado com sucesso na investigação do perfil de ácidos orgânicos em extratos vegetais. Os limites de detecção variaram de 2,96 (ácido aspártico) a 4,69 mg L⁻¹ (ácido cítrico) e os limites de quantificação variaram de 8,87 (ácido aspártico) a 14,07 mg L⁻¹ (ácido cítrico).

Para fins de comparação, a Tabela A5 mostra alguns métodos de análise de AO por EC encontrados na literatura, com figuras de mérito mais relevantes:

Tabela A5. Estudos de análises de AO em diferentes matrizes por ECZ

Analitos	Amostra	Eletrólito, pH	Tempo de corrida	Figuras de mérito	Detecção	Referência
Ácidos: oxálico, malônico, fórmico, maleico, tartárico, succínico, málico, acético, propiônico, láctico e butírico	Água	10 mmolL ⁻¹ MOPS 7,5 mmolL ⁻¹ Arginina 10 % v/v MeOH 0,02 % m/v HP-β-CD pH 7,5	12 min	Recuperação: não disponível; LOD: 0,056-0,270 mg/L	Condutividade sem contato	(XU; WANG e LI, 2007)
Cloreto, sulfato, nitrato, oxalato, malonato, citrato, maleato, fumarato, tartarato, formato, DL-malato, succinato, glutarato, ftalato, adipato, pimelato, suberato, acetato, azelato, sebacato, molibdato e citramálico	Aerossol atmosférico	6,75 mmolL ⁻¹ ácido piromelítico, 0,5 mmolL ⁻¹ hidróxido hexametônio, 0,05 mmolL ⁻¹ CaCl ₂ , pH 7,6	16 min	Recuperação: 86,2-119,4 % LOD: 0,241-5,550 mg/L	UV indireta (245 nm)	(BLANCO-HERAS <i>et al.</i> , 2008)
Ácidos: oxálico, fórmico, maleico, tartárico, succínico, málico, acético, propiônico, láctico, butírico, glutárico, pirúvico cítrico, benzoico, sórbico, ascórbico e glucônico	Bebidas	7,5 mmolL ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 2,5 mmolL ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ 2,5 mmolL ⁻¹ TTAOH 0,24 mmolL ⁻¹ CaCl ₂ pH 6,4	3,5 min	Recuperação: 99,0-102,5 % LOD: 0,01-0,94 mg/L	UV direta (185 nm)	(MATO <i>et al.</i> , 2006a)

Analitos	Amostra	Eletrólito, pH	Tempo de corrida	Figuras de mérito	Deteção	Referência
Ácidos: oxálico, fórmico, succínico, málico, acético, láctico, pirúvico, cítrico e glucônico	Mel	7,5 mmolL ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 2,5 mmolL ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ 2,5 mmolL ⁻¹ TTAOH 0,24 mmolL ⁻¹ CaCl ₂ pH 6,4	4 min	Recuperação: 83,0-100 % LOD: 0,3-200 mg/L	UV direta (185 nm)	(MATO <i>et al.</i> , 2006c)
Ácidos: cítrico, málico, succínico, oxálico, fórmico, fumárico, acético e fosfato	Plantas	0,3 mmolL ⁻¹ TTAOH e 100 mmolL ⁻¹ trimelitato, pH 9,0	1,8 min	Recuperação: 94,8-104,3 % LOD: -	UV indireta (240 nm)	(RIVASSEA U <i>et al.</i> , 2006)
Ácidos: Oxálico, tartárico, fórmico, málico, cítrico, succínico, glutárico, acético e láctico	Plantas	15 mmolL ⁻¹ ftalato, 0,6 mmolL ⁻¹ CTAB, pH 5,6	7 min	Recuperação: 88,0-116,0 % LOD: 0,008-0,08 mg/L	UV indireta (254 nm)	(WANG <i>et al.</i> , 2003)
NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Li ⁺ , ascorbato, sorbato, benzoato, lactato, acetato, succinato, malato, tartarato, maleato, malonato, perclorato e oxalato	Suco de frutas	4,0 mmolL ⁻¹ 1,2-dimetilimidazol 0,9 mmolL ⁻¹ ácido trimelítico 2,5 mmolL ⁻¹ 18-crown-6 pH 7,6	6 min	Recuperação: 81,0-102,0 % LOD: 0,08-5,0 mg/L	UV indireta (210 nm)	(XIONG e LI, 1998)

Analitos	Amostra	Eletrólito, pH	Tempo de corrida	Figuras de mérito	Detecção	Referência
Ácidos: Tartárico, málico, succínico, acética, láctico e cítrico	Suco de uva e vinho	7,5 mmolL ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ 2,5 mmolL ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ 2,5 mmolL ⁻¹ TTAOH 0,24 mmolL ⁻¹ Ca ²⁺ pH 6,4	3 min	Recuperação: 92,7-105,8 % LOD: 0,05-0,38 mg/L	UV direta (185 nm)	(MATO; SUA´REZ-LUQUE e HUIDOBRO, 2007)
Ácidos: DL-tartárico, cítrico, málico, láctico e succínico	Vinho	10 mmolL ⁻¹ ácido 3,5-dinitrobenzóico, 0,2 mmolL ⁻¹ CTAB, pH 3,6	5 min	Recuperação: 95,0-102,0 % LOD: 0,64-1,55 mg/L	UV indireta (254 nm)	(PERES <i>et al.</i> , 2009)
Ácidos: fórmico, fumárico, succínico, oxálico, tartárico, acético, láctico e cítrico	Vinho	10 mmolL ⁻¹ tetraborato, 0,5 mmolL ⁻¹ TTAOH pH 9,3	20 min	LOD: 0,241-5,550 mg/L	UV direta (185 nm)	(MORENO; JURADO e BARROSO, 2003)
Ácidos: acético, láctico, succínico, oxálico diidratado, cítrico, anidro e trans-aconítico, subérico, glutárico, malônico, málico e tartárico	Vinho, cerveja e sucos de fruta	30 mmolL ⁻¹ tampão borato 100 mL ⁻¹ ACN pH 10,0	12 min	Recuperação: 81,7-112,4 % LOD: 2,0-10,0 mg/L	UV direta (230 nm)	(SANTALA D <i>et al.</i> , 2007)

Analitos	Amostra	Eletrólito, pH	Tempo de corrida	Figuras de mérito	Deteção	Referência
Ácidos: Oxálico, tartárico, fórmico, málico, cítrico, succínico, acético, láctico, pirúvico e aspártico	Extratos vegetais	15,0 mmolL ⁻¹ TRIS 20,0 mmolL ⁻¹ Ác. ftálico 0,8 mmolL ⁻¹ CTAB pH 3,4	3 min	LOD: 2,0-10,0 mg/L	UV indireta (240 nm)	Este trabalho

Observações: HP-β-CD: hidroxipropil-β-CD; TTAOH: tetradecyltrimethylammonium hydroxide; CTAB: cetyltrimethylammonium bromide; LOD: limit of detection (limite de detecção).

REFERÊNCIAS

BLANCO-HERAS, G. A.; TURNES-CAROU, M. I.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; Determination of organic anions in atmospheric aerosol samples by capillary electrophoresis after reversed pre-electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 29, p. 1347, 2008.

CHEN, H.; XU, Y.; LENTE, F. V.; IP, M. E.; Indirect ultraviolet detection of biologically relevant organic acids by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 679, p. 40, 1996.

MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T.; Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 565, p. 190, 2006a.

MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. S.; SANCHO, M. T.; Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 1541, 2006b.

MATO, I.; SUA´REZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F.; Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection *Food Chemistry*, v. 102, p. 104, 2007.

MORENO, M. V. G.; JURADO, C. J.; BARROSO, C. G.; Determination of Organic Acids by Capillary Electrophoresis with Simultaneous Addition of Ca and Mg as Complexing Agents. *Chromatographia*, v. 57, p. 185, 2003.

PERES, R. G.; MORAES, E. P.; MICKE, G. A.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Control*, v. 20, p. 548, 2009.

RAMAUTAR, R.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. D.; Direct sample injection for capillary electrophoretic determination of organic acids in cerebrospinal fluid. *Anal Bioanal Chem*, v. 387, p. 293, 2007.

RIVASSEAU, C.; BOISSON, A.-M.; MONG´ELARD, G. E.; COURAM, G.; BASTIEN, O.; BLIGNY, R.; Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Directed metabolic analyses during metal stress. *Journal of Chromatography A*, v. 1129, p. 283, 2006.

SANTALAD, A.; TEERAPORNCHASIT, P.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S.;
Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. *LWT*, v. 40, p. 1741,
2007.

WANG, M.; QU, F.; SHAN, X.-Q.; LIN, J.-M.; Development and optimization of a
method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary
electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*, v. 989, p.
285, 2003.

XIONG, X.; LI, S. F. Y.; Selection and optimization of background electrolytes for
simultaneous detection of small cations and organic acids by capillary
electrophoresis with indirect photometry. *Journal of Chromatography A*, v. 822, p.
125, 1998.

XU, Y.; WANG, W.; LI, S. F. Y.; Simultaneous determination of lowmolecular-weight
organic acids and chlorinated acid herbicides in environmental water by a portable
CE system with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, v. 28, p. 1530,
2007.

ANEXO

CURRICULUM VITAE

1. Formação acadêmica / titulação

- 2007 - 2011 Doutorado em Química.
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Minas Gerais, Brasil.
Título: “Preparação e Aplicação de Novas Fases Estacionárias Monolíticas para Uso em Eletrocromatografia Capilar”.
Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira.
- 2005 - 2007 Mestrado em Química.
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Minas Gerais, Brasil.
Título: “Preparação de Fases Estacionárias Monolíticas em Capilares Revestidos com Poliacrilato para Aplicação em Eletrocromatografia Capilar”.
Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira.
- 2001 - 2004 Graduação em Química (Bacharelado).
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Minas Gerais.
Título da monografia: “Aplicação da Eletroforese Capilar na Determinação de Ácidos Graxos de Cadeias Curta e Média em Amostras de Manteiga”.
Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira.
- 2001 - 2006 Graduação em Química (Licenciatura).
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Minas Gerais.
- 1997 - 1999 Ensino Profissionalizante de Nível Médio em Técnico em Química.
Colégio Pio XII, Juiz de Fora, Minas Gerais.

2. Participação em congressos / Resumos em painéis (últimos quatro anos)

2.1 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2008.

- Vaz, Fernando Antonio Simas; Mesquita, M. C.; Almeida, M. D.; Bruns, R. E.; Oliveira, M. A. L. Planejamento fatorial auxiliado por simulação para otimização da separação de ácidos orgânicos por eletroforese capilar.
- Vaz, Fernando Antonio Simas; Oliveira, M. A. L.; Queiroz, M. P. G.; Ribeiro, S. J. L. Construção de câmara de luz ultravioleta para fotopolimerização de fases estacionárias monolíticas.
- Vaz, Fernando Antonio Simas; Faria, A. F.; Pires, C. K.; Santos, H. F.; Souza, M. V. N.; Oliveira, M. A. L. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de etambutol em formulação farmacêutica.

2.2 15th International Sol-Gel Conference, Porto de Galinhas, PE, Brazil, 2009.

- Vaz, Fernando Antonio Simas; Queiroz, M. P. G.; Ribeiro, S. J. L.; Polachini, F. C.; Messaddeq, Y.; Oliveira, M. A. L. Sol-gel approach for preparation of monolithic columns for electrochromatography applications.

2.3 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador, BA, 2009.

- Vaz, Fernando Antonio Simas; Caon, T.; Micke, G. A.; Costa, A. C. O.; Oliveira, M. A. L. Uso do planejamento Plackett-Burman (PPB) para otimização da separação de ácidos orgânicos por eletroforese capilar.

2.4 23º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Juiz de Fora, MG, 2009.

3. Seminário em sessão coordenada:

“Preparação de Colunas Monolíticas Fotopolimerizadas em Capilar Revestido com Poliacrilato para Aplicação em Eletrocromatografia”, apresentado na sessão coordenada de Eletroquímica e Eletroanalítica/Química Ambiental/Química Analítica, realizada na 30ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Águas de Lindóia, SP, 2007.

4. Capítulo de livro:

VAZ, Fernando Antonio Simas; OLIVEIRA, M. A. L.; BALESTEROS, M. R.; FARIA, A. F.; Determination of Olive Oil Acidity, em: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Victor R. Preedy e Ronald Ross Watson. Elsevier Inc. San Diego (2010), ISBN: 978-0-12-374420-3.

5. Artigos publicados, aceitos e submetidos em revistas científicas:

- 5.1 Vaz, F. A. S.; Castro, P. M.; Molina, C.; Oliveira, M. A. L.; Ribeiro, S. J. L.; Polachini, F. C.; Messaddeq, Y.; Nunes, A. P.; “External polyacrylate-coating as alternative material for preparation of photopolymerized sol–gel monolithic column”, *Talanta*, 76 (2008) 226–229.
- 5.2 Vaz, F. A. S.; Oliveira, M. A. L.; Ribeiro, S. J. L.; Queiroz, M. P. G.; “Construção de Câmara de Luz Ultravioleta Para Fotopolimerização de Fases Estacionárias Monolíticas”, *Química Nova*, 31 (8) (2008) 2156-2158.
- 5.3 Vaz, F. A. S.; Moutinho, A. D.; Paulo, J.; Araújo, R. T.; Ribeiro, S. J. L.; Polachini, F. C.; Messaddeq, Y.; Oliveira, M. A. L.; “Optimization of photopolymerized sol–gel monolithic stationary phases prepared in polyacrylate-coated fused-silica capillaries for capillary electrochromatography”, *Microchemical Journal* (2011) (Artigo aceito).
- 5.4 Vaz, F. A. S.; Caon, T.; Micke, G. A.; Costa, A. C. O.; Passos, L. P.; Oliveira, M. A. L.; “Development and optimization of capillary electrophoresis methodology for organic acid analysis in plant extract of brachiaria brizantha”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011) (Artigo submetido).

6. Produtos tecnológicos sem patente:

- 6.1 Câmara de Luz Ultravioleta-Visível para Aplicações como Reator Fotoquímico, 2006.
- 6.2 Dispositivo de alta pressurização para injeção controlada de líquidos em capilares.