

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Luciano Vitali

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
CAPILARES MODIFICADOS COM QUITOSANA E SAL DE
QUITOSANA QUATERNIZADA EM
ELETROFORESE CAPILAR**

Florianópolis

2012

Luciano Vitali

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
CAPILARES MODIFICADOS COM QUITOSANA E SAL DE
QUITOSANA QUATERNIZADA EM
ELETROFORESE CAPILAR**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química na área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Mücke

Co-orientador: Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

V836p Vitali, Luciano

Preparação, caracterização e aplicação de capilares modificados com quitosana e sal de quitosana quaternizada em eletroforese capilar [tese] / Luciano Vitali ; orientador, Gustavo Amadeu Micke. - Florianópolis, SC, 2012.
286 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Eletroforese capilar. 3. Quitosana. I. Micke, Gustavo Amadeu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Luciano Vitali

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
CAPILARES MODIFICADOS COM QUITOSANA E SAL DE
QUITOSANA QUATERNIZADA EM
ELETROFORESE CAPILAR**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Química” com ênfase em Química Analítica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 10 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Almir Spinelli,
Coordenador do Curso de Pós-graduação em Química
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ-UFSC)

Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère,
Co-Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ-UFSC)

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira,
Universidade Federal de Juiz de Fora (DQ-UFJF)

Prof^ª. Dr^ª. Marina Franco Maggi Tavares,
Universidade de São Paulo (IQ-USP)

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago,
Universidade de São Paulo (IQ-USP)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina de Oliveira Costa,
Universidade Federal de Santa Catarina (CAL-UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Luisa Jost,
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ-UFSC)

“O único lugar onde o sucesso vem
antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado e iluminado ao longo desta jornada.

Agradeço aos meus pais, José e Glória e meu irmão Maurício, pelo apoio e confiança. E agradeço a minha namorada Jacqueline pelas observações pertinentes, por todo carinho e compreensão.

Agradeço ao professor Dr. Valfredo T. Fávere e especialmente ao professor Dr. Gustavo Amadeu Micke, pela amizade e orientação, tornando possível a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Dr.^a. Marina Franco Maggi Tavares, Dr. Claudimir Lucio do Lago, Dr.^a. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dr.^a. Cristiane Luisa Jost, por terem aceitado fazer parte da banca examinadora, disponibilizando uma parte do seu precioso tempo e também por todas as valiosas sugestões.

Agradeço ao professor Dr. Bruno Szpoganicz pela ajuda com as titulações potenciométricas.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade e apoio financeiro.

Agradeço ao Jadir Carminatti e a Graça Höeller pelos auxílios prestados principalmente com a burocracia da pós-graduação.

Agradeço a todos os colegas do laboratório Quitech e LabEC pela amizade e ajuda nesse período.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi modificar internamente capilares de sílica fundida com quitosana (QTS) e sal de quitosana quaternizada (SAQQ), além do uso do polímero aniônico κ -carragena e do agente reticulante glutaraldeído (GLU), para obter diferentes perfis de fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “*Electroosmotic flow*”) em função do pH e explorar algumas de suas aplicações em eletroforese capilar (CE, do inglês “*Capillary Electrophoresis*”). Os capilares foram revestidos por simples lavagens com solução dos modificadores de interesse, nos quais se observaram diferentes comportamentos de mobilidade do EOF em função do pH. Para os capilares revestidos com QTS reticulada e SAQQ reticulado, ambos reticulados utilizando GLU, o comportamento do EOF *versus* pH foi anódico em pH menor que 6,0 e catódico em pH maior que 7,0, enquanto o perfil de mobilidade do EOF para o capilar revestido somente por lavagem com solução de SAQQ foi anódico na faixa de pH 2 a 9,5. Já para o revestimento com SAQQ reticulado com GLU e κ -carragena as mobilidades do EOF foram praticamente constantes e independentes do pH, apresentando um EOF catódico, com o grande diferencial de uma elevada intensidade, cerca de $30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em pH menores que 4,5. A reprodutibilidade de preparação dos revestimentos avaliada através de medidas de mobilidade do EOF em diversos pH (regiões fora de inflexão) apresentou um coeficiente de variação (CV, %) médio menor que 10%. De maneira geral, os revestimentos apresentaram uma boa estabilidade química frente a soluções ácidas, básicas e solventes orgânicos. Um teste de desempenho dos revestimentos, realizando 150 corridas em pH 2,4 e 8,9, mostrou bons resultados de estabilidade do EOF. Também, foi verificado um procedimento para reconstrução dos revestimentos que indicou a possibilidade de reutilização dos capilares.

O revestimento usando QTS reticulada com GLU foi aplicado no desenvolvimento de um método simples e rápido por CE para determinar simultaneamente o volume de saliva coletado e a concentração de nitrato e tiocianato nessa amostra. O método consistiu em uma sequência de etapas de injeção com um padrão interno usado como referência para correção do volume de amostra coletada com um *swab*. O eletrólito de corrida escolhido foi constituído de 12 mmol L^{-1} de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico, em pH 2,5. O padrão interno (PI) usado no método foi bromato. Um capilar de sílica fundida com 48,5 cm de comprimento total (L_{tot}), 8,5 cm de comprimento efetivo (L_{det}) e $75 \mu\text{m}$ (DI),

foi empregado nos experimentos. A aquisição dos dados foi feita em 200 nm e a temperatura foi mantida em 25 °C. A tensão de separação aplicada foi de 25 kV com polaridade negativa na injeção. O revestimento do capilar contribuiu para uma rápida separação dos ânions (0,36 min) no modo coeletromótico. O tempo instrumental de análise (TIA) foi de 2,81 min possibilitando realizar cerca de 21 análises h⁻¹. A avaliação do método para determinação do volume de saliva coletado com *swab* revelou uma boa correlação entre o volume obtido e previsto (diferença menor que 3,5%; R > 0,999). As curvas analíticas também apresentaram uma boa linearidade (R² > 0,999) com limites de detecção (LD) do nitrato e tiocianato, 0,13 e 0,23 mg L⁻¹, respectivamente. A precisão intermediária para os dois analitos (área de pico e tempo de migração) apresentou CV menor que 5% e as recuperações variaram entre 97 e 102%.

O capilar revestido com SAQQ foi aplicado no desenvolvimento de um método rápido de separação por CE usando injeções múltiplas para determinar iodeto em formulações farmacêuticas. O eletrólito de corrida foi composto por 20 mmol L⁻¹ de Tris e 11 mmol L⁻¹ de ácido clorídrico, em pH 8. O PI usado foi tiocianato. As separações foram realizadas em um capilar de sílica fundida (32 cm L_{tot}, 8,5 cm L_{det}, 50 µm DI) usando detecção UV em 220 nm e temperatura mantida a 25 °C. O EOF foi modificado por lavagem do capilar com solução polimérica, resultando em um revestimento semi-permanente com EOF controlado e anódico em pH 8. Diferentes estratégias, usando injeções simples e múltiplas pelo caminho mais curto do capilar até o detector foram estudadas, obtendo os seguintes números de amostras analisadas por hora: injeta um plugue e lava entre corridas (Slava) 35 amostras h⁻¹; um plugue sem lavar entre corridas (SSLava) 76 amostras h⁻¹; quatro plugues lavando entre corridas (Mlava) 61 amostras h⁻¹; e quatro plugues sem lavar entre corridas (MSlava) 80 amostras h⁻¹. O tempo de tensão necessário para promover a separação de oito picos (iodeto e tiocianato) no modo MSlava foi de 12 s. A avaliação do método MSlava mostrou bons resultados de linearidade (R² > 0,999); LD de 0,4 mg L⁻¹; precisões menores que 7% (área de pico e tempo de migração) e recuperações variando de 99 a 102%.

A modificação usando SAQQ reticulado com GLU e κ-carragena foi empregada no desenvolvimento de um método rápido de separação para determinar betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE utilizando detecção direta no UV. A característica de EOF elevado em pH baixo para a modificação contribuiu significativamente para o desenvolvimento do método rápido de separação. O eletrólito de corrida empregado foi Tris 10 mmol L⁻¹, etanol 10% (v/v) e pH ajustado para 2,1

com ácido fosfórico. O PI usado foi a histidina. As separações foram feitas em um capilar de sílica fundida (32 cm L_{tot} , 8,5 cm L_{det} , 50 μ m DI) usando detecção UV em 195 nm e temperatura mantida a 25 °C. A tensão de separação aplicada foi 28 kV, com polaridade positiva na injeção. No método desenvolvido foi possível usar o modo de injeção sequencial (sem lavagem do capilar entre corridas) para análise desses aminoácidos nas amostras de fármacos. O TIA gasto pelo método otimizado foi de 1,53 min, permitindo fazer cerca de 39 corridas h^{-1} . Foram obtidos bons resultados de linearidade ($R^2 > 0,999$); LD menor que 4 mg L^{-1} para os dois analitos, valores de precisão menores que 3,5% (área de pico e tempo de migração) e recuperações variando de 97 a 108%. As concentrações dos aminoácidos determinadas nas amostras por CE-UV foram estatisticamente iguais aos valores determinados pelo método comparativo por LC-MS/MS.

Outra aplicação do capilar revestido usando SAQQ reticulado com GLU e κ -carragena empregando CE foi no desenvolvimento de um método rápido de separação para determinar creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina. O eletrólito de corrida usado foi Tris 10 mmol L^{-1} e ácido 2-hidroxiisobutírico 30 mmol L^{-1} , em pH 3,65. As separações foram feitas em um capilar de sílica fundida (32 cm L_{tot} , 8,5 cm L_{det} , 50 μ m DI) usando detecção UV em 200 nm com temperatura controlada em 25 °C. O PI usado foi o ácido 3,5-dihidroxibenzóico. A tensão de separação aplicada foi de 30 kV com polaridade positiva na injeção. O TIA do método otimizado foi de 2,95 min sendo possível realizar cerca de 20 corridas h^{-1} . A avaliação do método revelou uma boa linearidade ($R^2 > 0,99$) para as curvas analíticas e LD dos quatro analitos variando de 0,21 a 1,3 mg L^{-1} . Os resultados de CV para as precisões (área de pico e tempo de migração) foram menores que 2,8%, exceto para a histidina (CV menor que 5%). Bons resultados de recuperação foram obtidos (98 - 106%).

Palavras-chave: Eletroforese Capilar. Capilares Revestidos. Quitosana. Sal de Quitosana Quaternizada. Saliva. Nitrato. Tiocianato. Fármacos. Iodeto. Betaina. Metionina. Urina. Creatinina. Histidina. Ácido Hipúrico. Ácido Mandélico.

ABSTRACT

The aim of this study was to modify internally fused silica capillaries with chitosan (CTS) and quaternized chitosan salt (HACC), in addition to using the anionic polymer κ -carrageenan and the crosslinking agent glutaraldehyde (GLU), to obtain different profiles of electroosmotic flow (EOF) as a function of pH and to explore some applications in capillary electrophoresis (CE). The capillaries were coated by simple flushing with a solution of the modifiers of interest, in which different behaviors of EOF mobility as a function of pH were observed. For the capillaries coated with CTS and HACC, both crosslinked using GLU, the behavior of the EOF versus pH was anodic at pH lower than 6.0 and cathodic at pH greater than 7.0, while the profile of the EOF mobility for the coated capillary with flushing only with HACC solution was anodic in the pH range of 2.0 to 9.5. For coating with HACC crosslinked with GLU and κ -carrageenan the EOF mobility was practically constant and independent of the pH, showing a cathodic EOF, with the great advantage of a high intensity, around $30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at pH lower than 4.5. The reproducibility of the different coatings prepared was performed in two different capillaries by measuring the EOF mobility at several pH values outside the inflection region and the average coefficient of variation (CV) was less than 10%. In general, the coatings showed good chemical stability in acidic solutions, basic solutions and organic solvents. A performance test of the coatings, performing 150 runs at pH 2.4 and 8.9, showed good results for the EOF stability. A procedure for the reconstruction of the coatings was also verified, which indicated the possibility of reusing the capillaries to again form each coating.

The coating of the capillary using CTS crosslinked with GLU was applied in the development of a simple and rapid method, in free solution, employing CE to determine simultaneously the volume of saliva collected and the concentration of nitrate and thiocyanate in this sample. The method consists of a sequence of injection steps with an internal standard used as the reference for correction of the sample volume collected with a swab. The running electrolyte chosen consisted of 12 mmol L^{-1} tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) and 8.5 mmol L^{-1} sulfuric acid, at pH 2.5. The internal standard (IS) used in the method was bromate. A fused silica capillary with 48.5 cm of total capillary length (L_{tot}), 8.5 cm effective capillary length to the detector (L_{det}) and $75 \text{ }\mu\text{m}$ of internal diameter (ID) was used in the experiments. Data acquisition was carried out at 200 nm and

the temperature was maintained at 25 °C. The separation voltage applied was 25 kV with negative polarity in the injection. The capillary coating contributed to a rapid separation of anions (0.36 min) in co-electroosmotic mode, and the instrumental analysis time (IAT) was 2.81 min, allowing around 21 runs h⁻¹ to be performed. The evaluation of the method for correction of the volume of saliva collected with a swab showed a good correlation between the obtained and predicted volume (difference lower than 3.5%; R > 0.999). The analytical curves also showed a good linearity (R² > 0.999) with limits of detection (LD) for nitrate and thiocyanate of 0.13 and 0.23 mg L⁻¹, respectively. Intermediate precision determined for the two analytes (peak area and migration time) showed CV values lower than 5% and the recovery ranged from 97 to 102%.

The capillary coated with HACC was applied in the development of a rapid method of separation by CE using multiple injections to determine the iodide content of pharmaceutical formulations. The running electrolyte consisted of 20 mmol L⁻¹ Tris and 11 mmol L⁻¹ hydrochloric acid, at pH 8. The IS used was thiocyanate. The separations were performed on a fused silica capillary (32 cm *L*_{tot}, 8.5 cm *L*_{det}, 50 µm ID) using UV detection at 220 nm with the temperature maintained at 25 °C. The EOF was modified by flushing the capillary with polymer solution, resulting in a semi-permanent coating with controlled and anodic EOF at pH 8. Different strategies, using single and multiple injections in the short-end of the capillary (nearest to the detector) were studied, obtaining the following numbers of samples analyzed per hour: inject a plug and flush between runs (Sflush) 35 samples h⁻¹, plug without flush between runs (SWflush) 76 samples h⁻¹, plug and flush four times between runs (Mflush) 61 samples h⁻¹, and plug without flush four times between runs (MWflush) 80 samples h⁻¹. The voltage time required to promote the separation of eight peaks (iodide and thiocyanate) in MWflush mode was 12 s. The evaluation of the MWflush method showed good linearity (R² > 0.999), LD of 0.4 mg L⁻¹, precision lower than 7% (peak area and migration time) and recovery ranging from 99 to 102 %.

The modification with HACC crosslinked with GLU and κ-carrageenan was used to develop a rapid method of separation to analyze betaine and methionine in pharmaceutical formulations by CE using UV direct detection. The characteristic of high EOF at low pH for the coating contributed significantly to the development of a rapid method of separation. The running electrolyte used was composed of 10 mmol L⁻¹ Tris, 10% ethanol (v/v) and pH adjusted to 2.1 with phosphoric acid. The IS used was histidine. The separations were carried out on a fused silica

capillary (32 cm L_{tot} , 8.5 cm L_{det} , 50 μm ID) using UV detection at 195 nm and temperature maintained at 25 °C. The separation voltage applied was 28 kV with positive polarity during the injection. In the method developed the sequential injection mode (without flushing the capillary between runs) can be used for the analysis of amino acids in pharmaceutical samples. The IAT associated with the optimized method was 1.53 min, allowing around 39 runs h^{-1} . Good results were obtained for linearity ($R^2 > 0.999$), LD (lower than 4 mg L^{-1} for two analytes), precision values (lower than 3.5%; peak area and migration time) and recovery (97 to 108%). The amino acid concentrations determined by CE-UV were statistically equal to those determined applying the comparative LC-MS/MS method.

Another application of the coating with HACC crosslinked with GLU and κ -carrageenan using CE was in the development of a rapid method of separation to determine creatinine, histidine, hippuric acid and mandelic acid in urine samples. The running electrolyte used was composed of 10 mmol L^{-1} Tris and 30 mmol L^{-1} of 2-hydroxyisobutyric acid, at pH 3.65. The separations were carried out in a fused silica capillary (32 cm L_{tot} , 8.5 cm L_{det} , 50 μm ID) using UV detection at 200 nm with the temperature maintained at 25 °C. The IS used was 3,5-dihydroxybenzoic acid. The separation voltage applied was 30 kV with positive polarity during the injection. The IAT of the optimized method was 2.95 min allowing around 20 runs h^{-1} . The evaluation of the method showed good linearity ($R^2 > 0.99$) for the analytical curves and LD for the four analytes ranging from 0.21 to 1.3 mg L^{-1} . The CV results for precision (peak area and migration time) were lower than 2.8%, with the exception of histidine (CV lower than 5%) and good results were obtained for recovery (98 - 106%).

Keywords: Capillary Electrophoresis. Coated Capillaries. Chitosan. Quaternary Ammonium Chitosan Salt. Saliva. Nitrate. Thiocyanate. Drugs. Iodide. Betaine. Methionine. Urine. Creatinine. Histidine. Hippuric acid. Mandelic acid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Obtenção da quitosana por meio da reação de hidrólise básica da quitina e representação da quitosana como polieletrólito catiônico..... 58
- Figura 1.2** (a) Esquema representando a reticulação da QTS com GLU pela formação da ligação química imina; (b) representação do revestimento de capilar de sílica com QTS reticulada. 61
- Figura 1.3** Representação da equação química para a obtenção do sal de quitosana quaternizada a partir da QTS e do cloreto de trimetil glicidil amônio..... 64
- Figura 1.4** Representação da equação química para a obtenção do SAQQ reticulado (a); estrutura química da κ -carragena (b); representação da camada de SAQQ reticulado com GLU sobre a superfície de sílica (c); interação dessa camada de SAQQ reticulado com κ -carragena (d)..... 66
- Figura 1.5** Esquema representando o sistema usado para realizar as modificações de capilares fora do equipamento de CE..... 73
- Figura 1.6** Etapas do método para determinação da mobilidade do EOF por aplicação de tensão e pressão (adaptado de: WILLIAMS; VIGH, 1996). 79
- Figura 1.7** Curva de titulação potenciométrica do SAQQ. 81
- Figura 1.8** Otimização da concentração de SAQQ para modificação do capilar somente lavando o capilar com solução polimérica. Condições experimentais: capilar 32 cm condicionado inicialmente com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} por 30 min e água deionizada por 15 min e depois com SAQQ em diferentes concentrações, e eletrólito de corrida fosfato pH 2,4. Procedimento para revestimento do capilar e medida do EOF: lava o capilar com solução de diferentes concentrações de SAQQ (% m/v) durante 5 min, deixa 5 min em contato estático, lava 3 min com eletrólito de corrida (sem SAQQ) e mede o EOF usando $10 \text{ kV}/0,5 \text{ min}$ de separação e acetona como marcador neutro. ... 85
- Figura 1.9** Otimização da concentração de κ -carragena usada na última etapa da modificação do capilar sobre a camada de SAQQ reticulado. Eletrólito fosfato em pH 2,8, força iônica 20 mmol L^{-1} , entre os experimentos lava com eletrólito 5 min, lavagem com solução de κ -carragena por 10 min e mantém em

contato estático por 10 min, medida do EOF por pressão usando ± 10 kV/0,5 min e acetona como marcador neutro. 87

Figura 1.10 Microscopia eletrônica de varredura de um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato (aproximação de 200 vezes).... 89

Figura 1.11 Curvas de mobilidade do EOF em função do pH, para os capilares de sílica fundida usando diferentes modificadores e um capilar não revestido. Resultados de EOF para os capilares revestidos referentes a 4 medidas em dois capilares, para cada modificação. Eletrólitos com força iônica cerca de 20 mmol L^{-1}91

Figura 1.12 Estabilidade dos diferentes revestimentos construídos ao longo de 150 corridas realizadas em pH 2,4 e 8,9 (eletrólitos com força iônica cerca de 20 mmol L^{-1}). Corrida: lavagem do capilar com eletrólito entre corridas 1 min (equivalente a 5 volumes de capilar) e aplicação de 25 kV por 2 min..... 99

Figura 1.13 Variação da mobilidade do EOF em função do volume de lavagem do capilar com solução removedora, hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} ou ácido clorídrico 1 mol L^{-1} , para remover o revestimento com QTS reticulada. Eletrólito usado tampão fosfato pH 2,85; força iônica $22,4 \text{ mmol L}^{-1}$; acetona como marcador neutro e medida do EOF por pressão. Antes de cada medida de mobilidade do EOF o capilar foi lavado com água 25 volumes de capilar e com eletrólito 25 volumes. 102

Figura 2.1 Esquema representando as etapas envolvidas na coleta e preparação da amostra de saliva. 119

Figura 2.2 Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH dos analitos nitrato e tiocianato, e dos co-íons candidatos a compor o eletrólito de corrida cloreto, perclorato e sulfato, feitas utilizando o simulador Simul (MICKE, 2004). 122

Figura 2.3 Dados da simulação da separação de nitrato e tiocianato para seleção do co-íon componente do eletrólito. Condições da simulação usando o *software PeakMaster*: comprimento total do capilar 48,5 cm; comprimento efetivo do capilar 8,5 cm; tensão de 25 kV; pH = 2,50; valores de t_{migr} considerando o EOF característico de cada co-íon. Valores de EOF usados na simulação: HCl ($-3,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$); HClO₄ ($-2,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$); H₂SO₄ ($-1,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo..... 124

Figura 2.4 Dados da simulação da condições de separação de nitrato e tiocianato usando concentração fixa 10 mmol L⁻¹ de Tris e variando a concentração de sulfato como co-íon. Condições da simulação usando o *software PeakMaster*: ver Figura 2.3. Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo. 126

Figura 2.5 Eletroferogramas: simulado (a) e de uma amostra de saliva diluída 10 vezes (b), usando o capilar modificado com QTS reticulada. Condições de separação: injeção -40 mbar/4s; tensão 30 kV; eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, pH 2,5; capilar 48,5 cm (*L_{tot}*), 8,5 cm (*L_{det}*), 75 µm (DI), revestido com QTS reticulada. Na simulação foram usadas as mesmas condições experimentais e EOF -11 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹. Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; D – desconhecido; B - bromato.....128

Figura 2.6 Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito Tris e ácido sulfúrico pH 2,50 em diferentes forças iônicas, demais condições ver Figura 2.5. Entre parêntesis estão os valores de coeficientes de determinação (R²) e teste F. 129

Figura 2.7 Parâmetros dos picos do nitrato e tiocianato para o eletrólito com força iônica 23 mmol L⁻¹ em diferentes valores de tensão (concentração de nitrato e tiocianato cerca de 6 mg L⁻¹, demais condições ver Figura 2.5). 131

Figura 2.8 Esquema representando as etapas envolvidas no método de correção do volume de amostra de saliva coletada usando padrão interno e determinação de nitrato e tiocianato por eletroforese capilar. (I) procedimento de coleta da saliva e (II) etapas do método para determinar o volume de saliva coletada por CE. Legenda: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S₁; P₂ – bromato da solução S₂..... 132

Figura 2.9 Eletroferograma de uma solução padrão considerando a injeção dos pluguess S₂ e eletrólito (a); eletroferograma de uma solução padrão (b) e eletroferograma de uma amostra de saliva coletada com *swab* (c), injetando todos os pluguess pelo método proposto usando o capilar modificado com QTS reticulada. Eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, pH 2,5, força iônica 23 mmol L⁻¹. Condições de injeção: -40 mbar/4 s (*S₁*), -40 mbar/3 s (eletrólito), -40 mbar/4 s (*S₂*), -40 mbar/3 s (eletrólito); tensão + 25 kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min. Eletroferogramas da solução padrão usando concentração de tiocianato 58 mg L⁻¹ e nitrato 62 mg L⁻¹. Solução aceptora S₁ contendo bromato 25,6 mg L⁻¹. Capilar de sílica fundida de 48,5 cm (*L_{tot}*), 8,5 cm (*L_{det}*), e 75 µm (DI). Legenda dos picos: N – nitrato; T –

tiocianato; P₁ – bromato da solução S₁; P₂ – bromato da solução S₂. Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm..... 137

Figura 2.10 Eletroferogramas referentes a diferentes tempos de eletrólito espaçador injetados (entre S₁ e S₂), usando o capilar modificado com QTS reticulada. Condições de injeção: -40 mbar/4 s (S₁), -40 mbar/x s (eletrólito), -40 mbar/4 s (S₂); tensão + 25kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min; concentração de nitrato 6,20 mg L⁻¹, tiocianato 5,81 mg L⁻¹ e padrão interno bromato 12,8 mg L⁻¹. Capilar usado 48,5 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 75 µm (DI), eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹. Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S₁; P₂ – bromato da solução S₂. Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm. 138

Figura 2.11 (a) Representa as regiões do eletrólito e da amostra no capilar as quais durante a aplicação de tensão tem diferentes campos elétricos; (b) migração dos íons na região da amostra imediatamente após a aplicação de tensão, e (c) migração dos íons na região do eletrólito..... 140

Figura 2.12 Representação do tamanho dos plugues injetados e da distância para o detector no estudo de pré-concentração do método proposto para a determinação de nitrato e tiocianato injetando pelo caminho mais curto do capilar até o detector.....142

Figura 2.13 Eletroferogramas obtidos com diferentes tempos de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato e tiocianato usando o capilar modificado com QTS reticulada. Eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹/ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, pH 2,5, força iônica 23 mmol L⁻¹. Condições de injeção: -40 mbar/x s (S₁), -40 mbar/3 s (eletrólito), -40 mbar/x s (S₂), -40 mbar/3 s (eletrólito); tensão + 25kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min; concentração de nitrato 0,620 mg L⁻¹, tiocianato 0,581 mg L⁻¹ e padrão interno bromato 5,12 mg L⁻¹. Capilar de sílica fundida de 48,5 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 75 µm (DI). Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S₁; P₂ – bromato da solução S₂. Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm..... 143

Figura 2.14 Correntes geradas durante aplicação de tensão para cada tempo de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato e tiocianato. Condições experimentais: ver Figura 2.13.....144

Figura 2.15 Altura do pico e resolução nitrato:tiocianato em função do tempo de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para

determinação de nitrato e tiocianato. Condições experimentais: ver Figura 2.13..... 144

Figura 2.16 Vinte eletroferogramas sobrepostos de uma amostra de saliva coletada com *swab* obtidos empregando o método proposto: (a) capilar revestido com QTS reticulada e (b) capilar não revestido. Solução acceptora de bromato $25,6 \text{ mg L}^{-1}$. Eletrólito Tris 12 mmol L^{-1} e ácido sulfúrico $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 2,5, força iônica 23 mmol L^{-1} . Condições de injeção: -40 mbar/4 s (S_1), -40 mbar/3 s (eletrólito), -40 mbar/4 s (S_2), -40 mbar/3 s (eletrólito); tensão $+ 25 \text{ kV}$; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min. Capilar de sílica fundida de $48,5 \text{ cm}$ (L_{tot}), $8,5 \text{ cm}$ (L_{det}), e $75 \mu\text{m}$ (DI). Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; P_1 – bromato da solução S_1 ; P_2 – bromato da solução S_2 . Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm 147

Figura 2.17 Gráfico representando as porcentagens de tempo gasto em cada etapa do método proposto em relação ao tempo instrumental de análise (TIA)..... 149

Figura 2.18 Avaliação do método proposto para correção do volume de amostra de saliva usando uma solução acceptora contendo padrão interno. Condições experimentais: ver seção de materiais e métodos..... 150

Figura 3.1 Dados da simulação das condições de separação de iodeto usando concentração fixa 10 mmol L^{-1} de Tris e variando a concentração de ácido clorídrico como co-íon. Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo..... 174

Figura 3.2 Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito composto de Tris e ácido clorídrico pH 8 em diferentes forças iônicas. Entre parêntesis os valores de coeficientes de determinação e teste F..... 176

Figura 3.3 Influência do tempo de aplicação de tensão (-30kV) na estabilidade do EOF, usando como modificadores SAQQ e CTAB. Condições experimentais: eletrólito Tris 20 mmol L^{-1} e ácido clorídrico 11 mmol L^{-1} , pH 8,1, força iônica 11 mmol L^{-1} ; capilar 32 cm (L_{tot}), $50 \mu\text{m}$ (DI) e $23,5 \text{ cm}$ (L_{det}); medidas de mobilidade do EOF usando acetona como marcador pelo método por pressão empregando tempo de migração 0,5 min e tensão -15kV . Valores de mobilidade expressos como a média e desvio padrão: SAQQ, $n = 3$ (um ciclo em um capilar e dois ciclos em outro capilar) e CTAB, $n = 2$ (dois ciclos em um capilar)..... 177

Figura 3.4 (a) Esquema representando o procedimento de injeção múltipla MSLava usado experimentalmente, e (b) tamanho dos plugues injetados e

distância para o detector no método de injeção múltipla. Legenda: P1 – primeiro plugue injetado, P2 – segundo plugue injetado, P3 – terceiro plugue injetado, P4 – quarto plugue injetado. 182

Figura 3.5 Eletroferogramas resultantes do método de injeção múltipla MSlava: simulado (usando *software PeakMaster*); injeção de padrões (iodeto 63 mg L⁻¹ e tiocianato 58 mg L⁻¹); injeção de amostra (iodeto cerca de 15 mg L⁻¹ e tiocianato 58 mg L⁻¹). Condições experimentais: eletrólito Tris 20 mmol L⁻¹ e ácido clorídrico 11 mmol L⁻¹; pH 8,1; tensão 30 kV; L_{det} 8,5 cm, L_{tot} 32 cm x 50 µm DI; e na simulação condições idênticas usando μ_{eo} -16 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹. Legenda dos picos: 1- iodeto, 2- tiocianato; P1 – primeiro plugue injetado, P2 – segundo plugue injetado, P3 – terceiro plugue injetado, P4 – quarto plugue injetado. 183

Figura 3.6 Eletroferogramas sobrepostos de uma amostra de xarope injetada 20 vezes usando o método MSlava otimizado. Condições experimentais: ver seção experimental. 186

Figura 4.1 Curvas de mobilidade efetiva da betaina e metionina, e curva da diferença de mobilidade efetiva entre as duas moléculas, feitas utilizando o simulador Simul (MICKE, 2004). Dados: betaina pKa = 1,83 e μ = 34,1 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹ (mobilidade determinada por pressão usando 10 kV/0,75 min, eletrólito ácido fosfórico 22 mmol L⁻¹, força iônica 10 mmol L⁻¹, pH 2,0); metionina pKa₁ = 2,17 e μ = 27,7 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹; pKa₂ = 9,34 e μ = -29,3 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹ (dados obtidos do *software PeakMaster*). 209

Figura 4.2 Otimização da concentração de etanol (em porcentagem) na amostra e no eletrólito de corrida (resultados de resolução e 1/tempo de migração da betaina). Condições de separação: capilar 32 cm x 50 µm (DI) revestido com SAQQ reticulado e κ-carragena; eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹, diferentes porcentagens de etanol e pH ajustado para 2,1 com ácido fosfórico; tensão 28 kV; injeção 50 mbar/3s na extremidade mas curta do capilar até o detector; tempo de lavagem com eletrólito entre corridas 3 min. Os dados foram adquiridos em 195 nm. Amostra injetada diluída 50 vezes com concentração informada de metionina 10 mg/ml e betaina 50 mg/ml. Legenda: AM – amostra; EL – eletrólito de corrida. 212

Figura 4.3 Alguns eletroferogramas da otimização da concentração de etanol adicionado na amostra e no eletrólito de corrida. Condições de separação: ver Figura 4.2. Legenda: AM – amostra; EL – eletrólito; H-histidina (padrão interno); M-metionina; B-betaina; EOF-fluxo eletrosmótico; C-citrato. 213

Figura 4.4 Variação da corrente em função da tensão aplicada no eletrólito otimizado. Entre parêntesis os valores de coeficiente de determinação e teste F...	216
Figura 4.5 Eletroferogramas de uma mesma amostra diluída 50 vezes e injetada em um capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena e em um capilar não revestido. (a) Amostra diluída conforme procedimento otimizado e injetada no capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena usando 30% de etanol na amostra e 10% no eletrólito; (b) mesmas condições de (a) injetando amostra em um capilar não modificado; (c) mesmas condições de (a), porém não usando etanol nem na diluição da amostra e nem no eletrólito, e injetando amostra em um capilar não modificado. Condições experimentais: ver seção de materiais e métodos.....	218
Figura 4.6 Eletroferogramas sobrepostos de 31 corridas de uma amostra de hepatoprotetor usando o método otimizado injetando seqüencial. Legendas do picos: H-histidina (padrão interno), M-metionina, B-betaina, EOF-fluxo eletrosmótico, C-citrato. Condições experimentais: capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena, 32 cm x 50 μ m D.I, injeção 50 mbar/3 s pelo caminho mais curto do capilar até o detector ($L_{det} = 8,5$ cm) usando 30% de etanol na amostra e 10% no eletrólito, tensão de 28 kV, aquisição dos dados em 195 nm.....	220
Figura 4.7 Representação do comprimento dos plugues de 31 injeções seqüenciais usando o método otimizado.....	221
Figura 4.8 Gráficos representando as porcentagens de tempo gasto em cada etapa do método proposto em relação ao tempo instrumental de análise usando o método otimizado com injeção seqüencial (a) e com a etapa de lavagem entre corridas (b).....	222
Figura 4.9 Cromatogramas de uma mistura de padrões e de uma amostra de hepatoprotetor obtidos pelo método comparativo usando LC-MS/MS. Localização dos picos: betaína - tempo de retenção 5,07 min; metionina - tempo de retenção 5,51 min. Pico não integrado representa a colina presente na amostra de hepatoprotetor, porém não analisada.	229
Figura 5.1 Estrutura química dos analitos de interesse a serem determinados no método por CE.....	249
Figura 5.2 Curvas de mobilidade efetiva <i>versus</i> pH dos analitos creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico, e dos componentes do eletrólito de corrida selecionados, feitas utilizando o simulador Simul (MICKÉ, 2004)....	250

Figura 5.3 Dados da simulação das condições de separação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico usando concentração fixa 10 mmol L⁻¹ de Tris e variando a concentração de HIBA. Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo..... 252

Figura 5.4 Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹, pH 3,63, força iônica 10 mmol L⁻¹, realizada em um capilar de 32 cm (L_{tot}) x 50 μm (DI). 254

Figura 5.5 Eletroferograma simulado usando o *software PeakMaster*; eletroferogramas de uma amostra de urina diluída 40 vezes com e sem padrão interno; e eletroferograma de uma solução padrão. Condições experimentais: eletrólito composto por Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹; pH 3,64; capilar de sílica fundida de 32 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 50 μm (DI) revestido com SAQQ reticulado e κ-carragena; lavagem entre corridas com eletrólito 0,5 min; injeção 50 mbar/3 s pelo caminho mais curto do capilar até do detector; separação 30 kV; temperatura 25 °C; detecção em 200 nm. Outras condições da simulação: EOF 32 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹, tensão efetiva calculada para cada analito. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico; mobilidade -24,1 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹, calculada pelo método de WILLIAMS e VIGH; 1996, e correção da força iônica); EOF-fluxo eletrosmótico..... 256

Figura 5.6 Altura do pico para creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico; e resolução creatinina:histidina e ácido hipúrico:ácido mandélico em função do tempo de injeção; usando o capilar modificado com SAQQ reticulado e κ-carragena. Eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹, pH 3,63, força iônica 10 mmol L⁻¹. Condições de injeção: -50 mbar/x s (solução padrão); tensão 30 kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min; concentração dos padrões creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico todos 5,0 mg L⁻¹. Capilar de sílica fundida de 32 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 50 μm (DI) e detecção em 200 nm..... 258

Figura 5.7 Eletroferogramas sobrepostos de 40 corridas de uma amostra de urina diluída 40 vezes. Condições experimentais: eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹, pH 3,63, capilar de sílica fundida de 32 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 50 μm (DI) revestido com SAQQ reticulado e κ-carragena, lavagem entre corridas com eletrólito 0,5 min, injeção 50 mbar/3 s pelo caminho mais curto do capilar até do detector, separação 30 kV, temperatura 25 °C, detecção em 200 nm. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico)..... 260

Figura 5.8 Eletroferogramas sobrepostos de 40 corridas de outra amostra de urina diluída 50 vezes. Condições experimentais: ver Figura 5.7. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico).....	261
Figura 5.9 Eletroferogramas comparando algumas das 98 corridas realizadas com duas amostras de urina diluídas e padrões dos analitos usando o método otimizado. Condições experimentais: ver Figura 5.7. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico).....	262
Figura 5.10 Gráfico representando as porcentagens de tempo gasto em cada etapa do método proposto em relação ao tempo instrumental de análise usando o método otimizado.	263
Figura 5.11 Resultados da determinação de creatinina usando o método otimizado por CE-UV em amostras de urina coletadas durante a ingestão de diferentes bebidas. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos. Dados obtidos em 200 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$	272
Figura 5.12 Resultados da determinação de histidina usando o método otimizado por CE-UV em amostras de urina coletadas durante a ingestão de diferentes bebidas. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos. Dados obtidos em 200 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$	273
Figura 5.13 Resultados da determinação de ácido hipúrico usando o método otimizado por CE-UV em amostras de urina coletadas durante a ingestão de diferentes bebidas. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos. Dados obtidos em 200 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$	274
Figura 5.14 Variação da concentração de ácido hipúrico em relação a creatinina durante a ingestão de diferentes bebidas. Informações sobre as bebidas ingeridas: ver seção experimental.....	275
Figura 5.15 Rota metabólica do ácido clorogênico ingerido. (adaptado de OGAWA <i>et al.</i> , 2011).....	277

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Valores de porcentagem em massa dos elementos silício (Si), oxigênio (O), carbono (C), nitrogênio (N), e enxofre (S), obtidos por análise elemental de Energia Dispersiva de raio-x, para as amostras de capilares com as diferentes modificações.	89
Tabela 1.2 Resultados da estabilidade química dos vestimentos construídos nos capilares de sílica fundida.	98
Tabela 2.1 Verificação da seletividade do método para a determinação de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva usando adição de padrão. Dados adquiridos em 200 nm.	152
Tabela 2.2 Resultados de parâmetros de conformidade do método otimizado para determinação de nitrato e tiocianato em saliva por CE usando o capilar revestido com QTS reticulada. Condições experimentais: ver seção experimental.	154
Tabela 2.3 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado para determinação de nitrato e tiocianato em saliva por CE usando o capilar revestido com QTS reticulada. Condições experimentais: ver seção experimental.	155
Tabela 2.4 Resultados de precisão do método otimizado para determinação de nitrato e tiocianato em saliva por CE usando o capilar revestido com QTS reticulada. Condições experimentais: ver seção experimental.	156
Tabela 2.5 Resultados para a determinação de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva coletadas de voluntários usando o método otimizado para coleta e determinação. Dados adquiridos em 200 nm.	157
Tabela 2.6 Comparação de algumas características do método proposto no presente trabalho para determinação de nitrato e tiocianato em amostras de saliva com outros métodos descritos na literatura.	159
Tabela 3.1 Tempo instrumental de análise (TIA) pelos diferentes modos de injeção.	184

Tabela 3.2 Verificação da seletividade do método para a determinação de iodeto em amostras de xarope usando adição de padrão. Dados adquiridos em 220 nm.....	187
Tabela 3.3 Resultados de parâmetros de conformidade do método otimizado MSlava para a determinação de iodeto em amostras xarope por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.....	189
Tabela 3.4 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado MSlava para determinação de iodeto em amostras de xarope por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.....	190
Tabela 3.5 Resultados de precisão do método otimizado MSlava para determinação de iodeto em amostras de xarope por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.....	191
Tabela 3.6 Resultados da determinação de iodeto nas amostras de xarope usando o método otimizado por CE-UV.....	192
Tabela 4.1 Parâmetros do espectrômetro de massas.....	207
Tabela 4.2 Verificação da seletividade do método para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas usando adição de padrão.....	223
Tabela 4.3 Resultados de parâmetros de conformidade do método para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE usando o capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. Condições experimentais: ver seção experimental.....	225
Tabela 4.4 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE usando o capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. Condições experimentais: ver seção experimental.....	226
Tabela 4.5 Resultados de precisão do método otimizado para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE usando o capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. Condições experimentais: ver seção experimental.....	227

Tabela 4.6 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação obtidos pelo método comparativo LC-MS/MS para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas. Condições experimentais: ver seção experimental.	228
Tabela 4.7 Resultados da determinação de betaina e metionina nas amostras de hepatoprotetor usando o método otimizado por CE-UV e o método comparativo LC-MS/MS. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos.....	231
Tabela 5.1 Verificação da seletividade do método para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina usando adição de padrão. Dados adquiridos em 200 nm.	265
Tabela 5.2 Resultados de parâmetros de conformidade do método otimizado para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.....	267
Tabela 5.3 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.	268
Tabela 5.4 Resultados de precisão do método otimizado para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.	269
Tabela 5.5 Concentrações de precursores do ácido hipúrico nas diferentes bebidas ingeridas. Resultados expressos como a média e intervalo de confiança de 95% (amostras preparadas em duplicata e injetadas em duplicata).....	271

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAD	- Dissociação Induzida por Colisão (do inglês “ <i>Collisionally Activated Dissociation</i> ”)
CE	- Eletroforese Capilar (do inglês “ <i>Capillary Electrophoresis</i> ”)
CE*	- Energia de Colisão (do inglês “ <i>Collision Energy</i> ”)
CEP	- Potencial de Entrada da Cella de Colisão (do inglês “ <i>Collision Cell Entrance Potential</i> ”)
CE-UV	- Eletroforese Capilar com Detecção Espectrofotométrica na Região do Ultravioleta-Visível (do inglês “ <i>Capillary Electrophoresis with Ultraviolet-Visible Absorbance Detection</i> ”)
CTAB	- Brometo de Cetiltrimetilamônio (do inglês “ <i>Cetiltrimetilamonium bromide</i> ”)
CTGA	- Cloreto de Trimetil Glicidil Amônio
CV	- Coeficiente de Variação
CXP	- Potencial de Saída da Cella de Colisão (do inglês “ <i>Collision Cell Exit Potential</i> ”)
DE	- Diâmetro Externo do Capilar
DI	- Diâmetro Interno do Capilar
DP	- Potencial de Orifício (do inglês “ <i>Declustering Potential</i> ”)
EDX	- Dispersão de Raio-x (do inglês “ <i>Energy-Dispersive X-ray</i> ”)
EMD	- Dispersão por Eletromigração (do inglês “ <i>Electromigration Dispersion</i> ”)
EOF	- Fluxo Eletrosmótico (do inglês “ <i>Electroosmotic flow</i> ”)
EP	- Potencial de Entrada (do inglês “ <i>Entrance Potential</i> ”)
GLU	- Glutaraldeído
HIBA	- Ácido 2-hidroxi-isobutírico (do inglês “ <i>2-Hydroxy-Isobutyric Acid</i> ”)

ICH	- <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
LC-MS/MS	- Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetria de Massas em “ <i>Tandem</i> ” (do inglês “ <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i> ”)
LD	- Limite de Detecção
LQ	- Limite de Quantificação
MES	- Ácido Morfolino Etanossulfônico (do inglês “ <i>2-N-morpholino ethanesulfonic acid</i> ”)
Mlava	- Injeção múltipla (quatro plugues) com etapa de lavagem do capilar entre corridas
MRM	- Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês “ <i>Multiple Reaction Monitoring</i> ”)
MSlava	- Injeção múltipla (quatro plugues) sem etapa de lavagem do capilar entre corridas
PI	- Padrão Interno
QTS	- Quitosana
QTS reticulada	- Quitosana reticulada com glutaraldeído
SAQQ	- Sal de Quitosana Quaternizada
SAQQ reticulado	- Sal de Quitosana Quaternizada reticulado com glutaraldeído
Slava	- Injeção simples (um plugue) com etapa de lavagem do capilar entre corridas
SMIL	- Sucessivas múltiplas camadas iônicas poliméricas (do inglês “ <i>Successive Multiple Ionic-polymer Layer</i> ”)
SSlava	- Injeção simples (um plugue) sem etapa de lavagem do capilar entre corridas
TIA	- Tempo Instrumental de Análise
Tris	- Tris(hidroximetil)amino metano

LISTA DE SÍMBOLOS

E	- Campo elétrico
ε	- Constante dielétrica
ε_o	- Permissividade do vácuo
i	- corrente elétrica
L_{det}	- Comprimento do capilar até o detector
L_{EO}	- Distância entre marcadores neutros
L_{inj}	- Comprimento do plugue injetado
L_{tot}	- Comprimento total do capilar
μ	- Mobilidade eletroforética
μ_{eff}	- Mobilidade efetiva
μ_{eo}	- Mobilidade do fluxo eletrosmótico
η	- Viscosidade da solução
η_S	- Número de plugues possíveis de serem injetados
ΔP	- Variação de pressão
r	- Raio interno do capilar
R^*	- Resistência elétrica
R^2	- Coeficiente de determinação
t_D	- Tempo entre o início da aplicação de pressão para transferência dos plugues do marcador até o detector e o início processo de aquisição de dados
t_{inj}	- Tempo de injeção do plugue
t_{migr}	- Tempo de aplicação de potencial
$t_{ramp-down}$	- Tempo para diminuição do máximo de potencial programado para zero de potencial
$t_{ramp-up}$	- Tempo para atingir o máximo de potencial programado
t_{int}	- Tempo de introdução da amostra ou do plugue
t_{obs}	- Tempo de migração observado
t_{ramp}	- Tempo da rampa de tensão
Δt_{mig}	- Diferença no tempo de migração
V_{apl}	- Diferença de potencial elétrico aplicado ou tensão
V_{eff}	- Tensão efetiva
V_m	- Velocidade de mobilização final por aplicação de pressão

$(volume)_{cap}$	- Volume interno do capilar
$(volume)_{int}$	- Volume de solução introduzido
$(volume)_{lav}$	- Volume de lavagem
$w_{50\%}$	- Largura do pico a meia altura
σ	- Alargamento do pico
ζ	- Potencial zeta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	47
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 1 – MODIFICAÇÃO DE CAPILARES DE SÍLICA FUNDIDA UTILIZANDO QUITOSANA, SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA E κ-CARRAGENA.....	53
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	53
1.1.1 Estratégias de prevenção contra adsorção de proteínas em capilares de sílica.....	53
1.1.2 Revestimentos poliméricos semipermanentes ou estáticos	55
1.1.3 O biopolímero quitosana como modificador de capilares em CE	57
1.2 OBJETIVOS	68
1.2.1 Objetivo Geral.....	68
1.2.2 Objetivos Específicos	68
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	70
1.3.1 Instrumentação.....	70
1.3.2 Reagentes e soluções.....	70
1.3.3 Síntese e caracterização da quitosana quaternizada.....	71
1.3.4 Metodologia para revestimento dos capilares.....	73
1.3.4.1 Capilar revestido com QTS reticulada	74
1.3.4.2 Capilar revestido somente com SAQQ sem reticulação.....	75

1.3.4.3 Capilar revestido com SAQQ reticulado e capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena	75
1.3.5 Caracterização dos capilares revestidos.....	76
1.3.5.1 Preparação dos capilares para análises de EDX.....	76
1.3.5.2 Caracterização dos capilares revestidos utilizando eletroforese capilar.....	76
<i>1.3.5.2.1 Medidas de mobilidade do fluxo eletrosmótico.....</i>	<i>78</i>
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
1.4.1 Caracterização do SAQQ sintetizado.....	81
1.4.2 Concentrações dos reagentes e tempos de cada etapa no procedimento de modificação dos capilares de sílica para construir os diferentes revestimentos com QTS, SAQQ, GLU e κ-carragena	83
1.4.2.1 Revestimento de QTS reticulada.....	83
1.4.2.2 Revestimento com SAQQ somente lavando o capilar com solução do polímero	83
1.4.2.3 Revestimento de SAQQ reticulado e revestimento de SAQQ reticulado e κ -carragena.....	86
1.4.3 Caracterização dos capilares revestidos.....	88
1.4.3.1 Análise semi-quantitativa de Energia Dispersiva de raio-x (EDX)	88
1.4.3.2 Fluxo eletrosmótico nos diferentes revestimentos	90
1.4.3.3. Estabilidade química dos revestimentos	95
1.4.3.4 Estabilidade dos revestimentos ao longo de várias corridas	99
1.4.3.5 Procedimento para reconstrução dos diferentes revestimentos	101

1.5	CONCLUSÕES.....	105
	REFERÊNCIAS.....	107
	CAPÍTULO 2 – CAPILAR MODIFICADO COM QUITOSANA RETICULADA PARA DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR ELETROFORESE CAPILAR USANDO INJEÇÕES MÚLTIPLAS: APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE NITRATO E TIOCIANATO EM SALIVA HUMANA	113
2.1	REVISÃO DA LITERATURA	113
2.2	OBJETIVOS.....	116
2.2.1	Objetivo Geral.....	116
2.2.2	Objetivos Específicos	116
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	118
2.3.1	Reagentes e soluções.....	118
2.3.2	Preparo das amostras de saliva.....	118
2.3.3	Instrumentação e método analítico.....	119
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	121
2.4.1	Seleção das condições experimentais de separação	121
2.4.1.1	Influência de diferentes contra-íons da parede no EOF do capilar revestido com QTS reticulada.....	121
2.4.1.2	Seleção das condições de separação usando o <i>software PeakMaster</i>	123
2.4.1.3	Escolha do padrão interno e força iônica do eletrólito de corrida	127
2.4.1.4	Método para determinação do volume de saliva coletado e determinação de nitrato e tiocianato usando injeções múltiplas.....	131

2.4.1.5 Seleção das condições de injeção no desenvolvimento do método	135
2.4.1.6 Efeito do tempo de injeção no método proposto.....	139
2.4.1.7 Comparação de várias injeções no capilar modificado com QTS reticulada e em um capilar não revestido, e tempo instrumental de análise do método otimizado.....	146
2.4.1.8 Avaliação do método proposto para correção do volume de saliva coletado.....	149
2.4.2 Desempenho analítico do método	151
2.4.3 Análises de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva	157
2.4.4 Comparação do método proposto com outros métodos.....	159
2.5 CONCLUSÕES.....	161
REFERÊNCIAS.....	162
CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO DE IODETO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ELETROFORESE CAPILAR EMPREGANDO CAPILAR MODIFICADO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA	167
3.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	167
3.2 OBJETIVOS.....	170
3.2.1 Objetivo Geral	170
3.2.2 Objetivos Específicos.....	170
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	171
3.3.1 Reagentes e soluções.....	171
3.3.2 Preparo das amostras e sistema de eletroforese capilar	171

3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	173
3.4.1	Otimização de parâmetros para desenvolver um método rápido para determinação de iodeto.....	173
3.4.1.1	Seleção dos componentes do eletrólito de corrida e padrão interno	173
3.4.1.2	Otimização da força iônica do eletrólito de corrida	175
3.4.1.3	Modificação e caracterização do EOF.....	176
3.4.1.4	Otimização da estratégia de injeção	178
3.4.1.4.1	<i>Simulações das injeções múltiplas</i>	<i>178</i>
3.4.1.4.2	<i>Minimização do tempo instrumental de análise usando diferentes modos de injeção</i>	<i>184</i>
3.4.1.3	Injeção múltipla sequencial de uma amostra de xarope	185
3.4.2	Desempenho analítico do método.....	186
3.4.3	Análise de iodeto nas amostras de xarope.....	192
3.5	CONCLUSÕES	194
	REFERÊNCIAS	195
CAPÍTULO 4 – MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE BETAINA E METIONINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ELETROFORESE CAPILAR EMPREGANDO CAPILAR MODIFICADO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA RETICULADO E κ-CARRAGENA.....		
4.1	REVISÃO DA LITERATURA	199
4.2	OBJETIVOS	202
4.2.1	Objetivo Geral.....	202

4.2.2	Objetivos Específicos.....	202
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	204
4.3.1	Reagentes e soluções.....	204
4.3.2	Preparo das amostras e sistema de eletroforese capilar	204
4.3.3	Método comparativo usando LC-MS/MS	206
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	208
4.4.1	Desenvolvimento do método para separação de betaina e metionina	208
4.4.1.1	Seleção dos componentes do eletrólito de corrida e padrão interno	208
4.4.1.2	Influência do solvente orgânico, tensão e tempo de injeção na separação.....	211
4.4.1.3	Comparação da separação de betaina e metionina em um capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena e um capilar não revestido.....	217
4.4.1.4	Verificação da possibilidade de injeção sequencial e tempo instrumental de análise do método otimizado.....	219
4.4.2	Desempenho analítico do método	223
4.4.3	Análise de betaina e metionina nas amostras de hepatoprotetor	228
4.5	CONCLUSÕES.....	232
	REFERÊNCIAS.....	233
CAPÍTULO 5 – CAPILAR REVESTIDO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA RETICULADO E κ-CARRAGENA USADO NO DESENVOLVIMENTO DE UM		

MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA, HISTIDINA, ÁCIDO HIPÚRICO E ÁCIDO MANDÉLICO EM AMOSTRAS DE URINA POR ELETROFORESE CAPILAR... 239

5.1	REVISÃO DA LITERATURA	239
5.2	OBJETIVOS	244
5.2.1	Objetivo Geral.....	244
5.2.2	Objetivos Específicos	244
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	246
5.3.1	Reagentes e soluções.....	246
5.3.2	Sistema de eletroforese capilar.....	246
5.3.3	Amostras de urina	247
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	249
5.4.1	Parâmetros para um método rápido para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico por CE ...	249
5.4.1.1	Escolha dos componentes do eletrólito de corrida e padrão interno	249
5.4.1.2	Avaliação das condições de separação usando o <i>software PeakMaster</i> e uso de capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena no desenvolvimento do método rápido de separação.....	251
5.4.1.3	Efeito Joule, força iônica e tensão de separação	254
5.4.1.4	Eletroferograma simulado e experimental e tempo de injeção no método proposto.....	255
5.4.1.5	Injeção de amostra de urina diversas vezes para verificar desempenho do método e tempo instrumental de análise.....	259
5.4.2	Desempenho analítico do método.....	263

5.4.3 Aplicação do método otimizado na análise de amostras de urina e avaliação do efeito de diferentes bebidas ingeridas no sinal do ácido hipúrico.....	270
5.5 CONCLUSÕES.....	279
REFERÊNCIAS.....	280
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERPECTIVAS.....	285

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, a eletroforese capilar (CE, do inglês “*Capillary Electrophoresis*”) tornou-se uma técnica analítica muito importante na ciência de separações. Ela apresenta algumas características interessantes como rapidez nas separações, alto poder de resolução, necessidade de pequenas quantidades de amostra (alguns nanolitros para injeção) e possibilidade de miniaturização instrumental (PUIG *et al.*, 2008). É uma técnica de separação efetuada em colunas capilares e baseada nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (solutos iônicos ou ionizáveis) sob ação de um campo elétrico, em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos ou mistos. Estes eletrólitos podem conter aditivos, como surfactantes, ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, entre outros, que interagem com os solutos e alteram suas mobilidades eletroforéticas permitindo, por exemplo, a separação de moléculas neutras e isômeros ou mesmo modificar a mobilidade de moléculas ionizadas (SILVA *et al.*, 2007).

Em CE existe um fenômeno importante que está sempre presente nas separações chamado de fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “*Electroosmotic flow*”). O EOF resulta da aplicação de tensão em um capilar preenchido com solução eletrolítica. O EOF atua nas separações transportando com velocidade constante o volume de solução dentro do capilar como um todo para uma dada direção. O EOF pode apresentar diferentes magnitudes dependendo da constituição química da superfície da parede do capilar, normalmente composto de sílica, e do pH do eletrólito. Quando esta magnitude for elevada, ele é responsável pela condução dos solutos até o detector sem distinção de carga (catiônicos, aniônicos e neutros), permitindo a análise simultânea destes solutos em uma mesma amostra, apesar de não existir discriminação temporal entre os compostos neutros (TAVARES, 1996). O EOF pode influenciar significativamente em uma separação por CE alterando a velocidade da separação, a repetibilidade dos tempos de migração dos solutos e a resolução entre os picos. Com isso, é de grande importância tanto o controle do EOF, como as possibilidades de modificação deste parâmetro, a fim de facilitar separações de solutos que requeiram condições especiais de direção e magnitude de EOF em um dado pH, diferentes de um capilar de sílica fundida.

A CE tem uma aplicação muito vasta podendo ser empregada na separação e quantificação de moléculas presentes nos mais diferentes tipos de amostras como: biológica (aminoácidos e proteínas em urina e plasma humano); ambiental (metais e herbicidas em água e solo); de alimentos (pesticidas e fungos em bebidas e frutas) e produtos farmacêuticos (flavonóides e anfetaminas em extratos de plantas e comprimidos) (SIMPSON; QUIRINO; TERABE, 2008). Entretanto, a determinação de algumas substâncias por CE é suscetível a interferências que podem limitar ou impedir a detecção. Um exemplo é a separação de proteínas, a qual necessita de uma atenção especial, pois estas moléculas têm uma forte interação com o capilar ficando adsorvidas nas paredes do mesmo. A adsorção de proteínas no capilar pode provocar o surgimento de picos assimétricos destas espécies e baixa eficiência de separação, além de EOF modificado durante as análises resultando em uma velocidade de migração não reprodutível. Muitas pesquisas tem sido realizadas com o propósito de controlar as interações entre essas moléculas e a superfície do capilar, incluindo o uso de condições de pH extremos, tampões com elevada força iônica e modificações da superfície das paredes dos capilares de sílica (SHAH; WANG; LEE, 2002; LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008). A vantagem do uso de capilares modificados em relação aos outros modos de minimizar interações indesejáveis de moléculas da amostra com a sílica é a simplicidade de preparo dessas modificações e, dependendo do tipo de modificação, não ocorre contribuição para a força iônica do eletrólito de corrida, o que auxilia na diminuição do efeito Joule, efeito este que prejudica as separações por CE. Outras vantagens destas colunas revestidas são a boa condutividade térmica, o que facilita a dissipação do calor gerado pela aplicação de tensão no capilar prevenindo o efeito Joule, e a transparência para a região do UV-visível, pois muitos dos detectores usados em CE são UV-visível. Essas características importantes são alcançadas com o uso de modificadores adequados (CIFUENTES *et al.*, 1998). O uso de capilar modificado quando previne a adsorção de proteínas nas paredes do capilar, contribui para a qualidade das análises dessas substâncias e também minimiza variações do EOF entre as corridas. Um EOF controlado empregando capilar modificado permite análises de outras substâncias em amostras que contenham proteínas, minimizando a necessidade de procedimentos para remoção dessas proteínas do capilar entre corridas. Isso

proporciona a vantagem de realizar análises com procedimentos mais rápidos, pela diminuição de etapas no preparo das amostras, o que minimiza problemas de perdas e/ou contaminação do analito na amostra, por procedimentos de precipitação das proteínas com solvente orgânico, por exemplo; e principalmente pode contribuir para uma boa reprodutibilidade no tempo de migração dos solutos. Outra vantagem dos capilares modificados é a possibilidade de obter perfis de mobilidade do EOF em função do pH diferentes de um capilar de sílica fundida e utilizar os novos valores de mobilidade do EOF no desenvolvimento de métodos de separação onde a mobilidade do EOF seja somada a mobilidade dos analitos catiônicos ou aniônicos, a fim de diminuir o tempo de separação contribuindo com a frequência analítica. Além disso, com o EOF conhecido e controlado, é possível simular as separações usando *software* específicos para esta finalidade, economizando reagentes e tempo do analista no desenvolvimento de métodos.

Muitos tipos de polímeros tem sido empregados na modificação das paredes internas de capilares (LUONG *et al.*, 2005). Um biopolímero que vem sendo recentemente estudado como modificador de capilares é a quitosana (QTS). É um polieletrólito catiônico hidrofílico obtido da reação de desacetilação da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (FU *et al.*, 2007). Esse biopolímero se caracteriza por apresentar em sua estrutura grupamentos amino que são facilmente protonados, tornando-o polímero carregado positivamente, o que permite sua interação com os grupos silanóis da sílica da parede do capilar, modificando o EOF. Além disso, esses grupamentos são relativamente reativos possibilitando a formação de ligações cruzadas entre cadeias de QTS com glutaraldeído, de derivados da QTS e, também, a sua associação com polímeros aniônicos e surfactantes, que podem ser usados como modificadores, a fim de se obter diferentes perfis de EOF em função do pH, permitindo o emprego destes capilares modificados em diversas aplicações por CE. A versatilidade da QTS e o seu potencial de uso como modificador de capilares associada às vantagens citadas anteriormente do emprego de capilares modificados em separações por CE, justificam a realização do presente trabalho.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é a preparação e caracterização de capilares modificados com QTS, sal de quitosana

quaternizada (SAQQ) e κ -carragena; e sua aplicação no desenvolvimento de metodologias para análises de nitrato e tiocianato em amostras de saliva humana; iodeto em amostras de fármacos; betaina e metionina também em amostras de fármacos; creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina. Também, explorar as modificações no sentido de contribuir com a diminuição do tempo de separação dos analitos nos métodos propostos através de separações no modo co-eletrosmótico. Além disso, usar a modificação de capilar para prevenir a adsorção de proteínas presentes nos fluidos biológicos analisados e permitir o desenvolvimento de um método para a separação simultânea de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em urina.

REFERÊNCIAS

- CIFUENTES, A.; CANALEJAS, P.; ORTEGA, A.; DIEZ-MASA, J. C. Treatments of fused-silica capillaries and their influence on the electrophoretic characteristics of these columns before and after coating. *Journal of Chromatography A*, v. 823, p. 561-571, 1998.
- FU, X.; HUANG, L.; ZHAI, M.; LI, W.; LIU, H. Analysis of natural carbohydrate biopolymer-high molecular chitosan and carboxymethyl chitosan by capillary zone electrophoresis. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, p. 511-516, 2007.
- LUCY, C. A.; MACDONALD, A. M.; GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 81-105, 2008.
- LUONG, J. H. T.; BOUVRETTE, P.; LIU, Y.; YANG, D-Q.; SACHER, E. Electrophoretic separation of aniline derivatives using fused silica capillaries coated with acid treated single-walled carbon nanotubes. *Journal of Chromatography A*, v. 1074, p. 187-194, 2005.
- PUIG, P.; BORRULL, F.; CALULL, M.; AGUILAR, C. Sorbent preconcentration procedures coupled to capillary electrophoresis for environmental and biological applications. *Analytica Chimica Acta*, v. 616, p. 1-18, 2008.
- SHAH, R. S.; WANG, Q.; LEE, M. L. Cycloaliphatic epoxy resin coating for capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 952, p. 267-274, 2002.
- SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Quimica Nova*, v. 30, p. 740-744, 2007.
- SIMPSON, S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 504-541, 2008.

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

CAPÍTULO 1 – MODIFICAÇÃO DE CAPILARES DE SÍLICA FUNDIDA UTILIZANDO QUITOSANA, SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA E κ -CARRAGENA

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Estratégias de prevenção contra adsorção de proteínas em capilares de sílica

A maioria dos capilares utilizados em CE para as mais diversas aplicações são de sílica fundida e a adsorção de proteínas presentes nas amostras pode ocorrer, pois a superfície interna desses capilares não é quimicamente inerte. Entretanto, existem diferentes estratégias de minimizar essas interações para controlar os problemas gerados pela adsorção das proteínas no capilar, assim como alterações das propriedades físico-químicas do eletrólito de corrida e modificações das paredes do capilar. As mudanças nas propriedades da solução de corrida compreendem o uso de pH extremos e soluções de corrida com alta força iônica. Entretanto, em muitos casos, essas medidas não são suficientes para evitar a adsorção das proteínas e, além disso, podem trazer outros problemas para a determinação, como alteração estrutural das proteínas em valores de pH não-biológico e possibilidade de surgimento do efeito Joule com uso de elevadas forças iônicas no eletrólito de corrida (LAUER; ROZING, 2009; LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008). A outra maneira de prevenção contra a adsorção de proteínas consiste na modificação das paredes dos capilares. Idealmente, uma modificação deve apresentar as principais características: facilidade, reprodutibilidade e baixo custo de preparação; estabilidade do EOF gerado; ser aplicável com a utilização de uma ampla gama de soluções de separação; não deve interferir na detecção (devendo ser compatível com detectores ótico e espectrômetro de massas) (LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008). As modificações das paredes dos capilares podem ser classificadas como: uso de pequenas moléculas como aditivos na solução de separação;

revestimento polimérico covalentemente ligado a sílica; e revestimento usando polímero adsorvido fisicamente na sílica.

A modificação das paredes do capilar utilizando pequenas moléculas como aditivos, assim como pequenas aminas e surfactantes, minimiza a adsorção de proteínas nos capilares, sendo empregada em diferentes aplicações. Porém, o uso de aditivos na solução de separação, além de modificar as paredes do capilar, pode interferir nas propriedades de alguns analitos consistindo em um problema para a análise. Se uma condição biológica for requerida, por exemplo, na determinação de proteínas ou estudos de interação proteína substrato, um surfactante usado como modificador adicionado no eletrólito pode atuar como um desnaturante do analito alterando a conformação natural da proteína, o que prejudica sua análise. Outra limitação pode ser o tempo de equilíbrio necessário a fim de se obter uma superfície reproduzível e com EOF estável. Além disso, esse tipo de modificação não é adequado ao uso de detectores pós-coluna, como o detector de massas, pois dependendo da concentração do aditivo, podem ocorrer interferências significativas no sinal gerado pelo detector dificultando a identificação exata e a quantificação do analito (DOHERTY, 2003; LAUER; ROZING, 2009).

O segundo tipo de modificação compreende polímeros ou pequenas moléculas ligados covalentemente a algum dos grupos funcionais da sílica. Essas modificações resultam na redução da adsorção de proteínas no capilar e modificação do EOF. Entretanto, muitas dessas modificações envolvem reações lentas que ocorrem em várias etapas, necessidade de condições especiais como alta temperatura, uso de solventes tóxicos e, além disso, os procedimentos não são muito reproduzíveis (DOHERTY, 2003; LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008).

O outro tipo de modificação é baseado na adsorção física de polímeros nas paredes dos capilares. Este tipo de revestimento pode trazer algumas vantagens em relação às demais maneiras de modificação do EOF e prevenção da adsorção de proteínas, assim como simplicidade na formação do revestimento, possibilidade de regeneração do revestimento, conhecimento prévio das propriedades dos polímeros o que permite um planejamento da modificação. Esse polímero adsorvido pode ser neutro, positivamente carregado, ou negativamente carregado. As modificações com polímeros adsorvidos fisicamente podem ser

feitas usando o polímero na solução de separação (revestimento dinâmico); modificação sem a presença do polímero na solução de separação (revestimento semipermanente ou estático); e modificação regenerada por lavagem com solução ácida ou básica e depois reconstituída utilizando uma solução diluída de polímero. Destes modos, o revestimento estático ou semipermanente, é o mais atrativo, pois permite a utilização de detectores específicos modernos, como o espectrômetro de massas. Essa vantagem existe, pois o não uso de aditivos na solução de separação resulta em um espectro de massa mais “limpo” e, além disso, previne eventuais problemas na ionização dos analitos (introdução no espectrômetro de massa) que poderiam surgir devido a interações com o modificador (DOHERTY, 2003). Outra vantagem dos revestimentos estáticos é a presença de um ruído da linha de base, normalmente menor que aqueles observados nos revestimentos dinâmicos, contribuindo para a obtenção de melhores limites de detecção.

1.1.2 Revestimentos poliméricos semipermanentes ou estáticos

Um revestimento semipermanente ou estático é aquele em que a camada polimérica é formada por simples lavagem do capilar com solução do polímero ou por lavagens alternadas com soluções poliméricas e outras soluções. Para isso, podem ser usados polímeros neutros hidrofílicos, catiônicos e aniônicos. A interação de polímeros neutros com a parede do capilar ocorre por ligação de hidrogênio de heteroátomos, como oxigênio e/ou nitrogênio, presentes na cadeia polimérica com os grupos silanóis da sílica. Já os polímeros catiônicos interagem eletrostaticamente com a sílica negativamente carregada na parede do capilar. E por fim, a interação de polímeros aniônicos ocorre com polímeros catiônicos previamente adsorvidos na sílica. O modo de revestimento usando polímeros catiônicos e aniônicos promovendo a formação da camada polimérica por lavagens sucessivas e alternadas do capilar com diferentes soluções poliméricas é conhecido como sucessivas múltiplas camadas iônicas poliméricas (SMIL, do inglês “*Successive Multiple Ionic-polymer Layer*”). Muitos exemplos de polímeros usados como modificadores formando revestimentos estáticos

são descritos na literatura. O óxido de polietileno (TSENG; LIN; CHANG, 2002), o álcool polivinílico (GILGES; KLEEMISS; SCHOMBURG, 1994), a poliacrilamida (ALBARGHOUTH; STEIN; BARRON, 2003), e derivados de celulose (BUSCH; KRAAK; POPPE, 1995), são exemplos de polímeros neutros que interagem com a sílica formando uma superfície hidrofílica neutra sendo empregados em métodos de análise de proteínas por CE. Polímeros catiônicos como polietilenoimina (ERIM *et al.*, 1995), polibreno (CORDOVA; GAO; WHITESIDES, 1997), agarose substituída (ULLSTEN *et al.*, 2004) e quitosana (YAO; LI, 1994), também são empregados como modificadores de capilares. Polímeros aniônicos como dextran sulfato e polivinilsulfonato são utilizados no modo de modificação SMIL. Um exemplo de polímeros empregados no modo SMIL é polibreno e dextran sulfato ou polibreno e polivinilsulfonato, usados na formação de revestimentos de duas ou três camadas poliméricas e empregados além da análise de proteínas (HASELBERG; DE JONG; SOMSEN, 2010), também na determinação de metabólitos em fluidos corporais (RAMAUTAR *et al.*, 2008), hormônios do crescimento (CATAI *et al.*, 2007) e aminoácidos em urina (RAMAUTAR *et al.*, 2008). O uso destes modificadores contribui para prevenir contra a adsorção de proteínas e também para a obtenção de bons resultados de separação dessas macromoléculas com alta eficiência de separação e baixos valores de coeficientes de variação para o tempo de migração das proteínas analisadas. Além disso, esses revestimentos são compatíveis com diversos tipos de sistemas de detecção, como espectrofotometria e massas, sendo largamente empregados no desenvolvimento de métodos de separação com estes tipos de detectores. A estabilidade dos revestimentos é variável e vai depender das características do polímero e procedimento de revestimento empregado. No caso em que o revestimento é formado por simples lavagem do capilar com solução polimérica, a renovação da camada após a degradação pode ser feita da mesma forma, isto é, lavando o capilar com uma solução contendo o polímero. Em alguns casos, essas lavagens são mais frequentes (entre corridas), enquanto que em outros, onde os revestimentos apresentam uma maior estabilidade, a lavagem é feita somente após um determinado número de injeções. Já no caso de revestimentos por procedimentos mais complexos, como lavagens alternadas com diferentes soluções envolvendo ligações químicas entre cadeias poliméricas ou simples

interação entre cadeias poliméricas catiônicas e aniônicas, a regeneração geralmente ocorre pela repetição de todo o processo. Nesse último, a vantagem é que, normalmente, os procedimentos de revestimento são rápidos e automatizados com uma estabilidade significativamente maior, com isso o capilar modificado pode ser usado por mais tempo. Assim, diante da diversidade de polímeros que podem ser empregados e da versatilidade dos procedimentos para promover os revestimentos, fica claro o potencial de aplicação deste modo de modificação de capilares (LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008).

1.1.3 O biopolímero quitosana como modificador de capilares em CE

A QTS é um copolímero constituído de unidades $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose, obtido a partir da reação de desacetilação parcial da quitina, de acordo com a Figura 1.1 (KUMAR, 2000; GUIBAL, 2004).

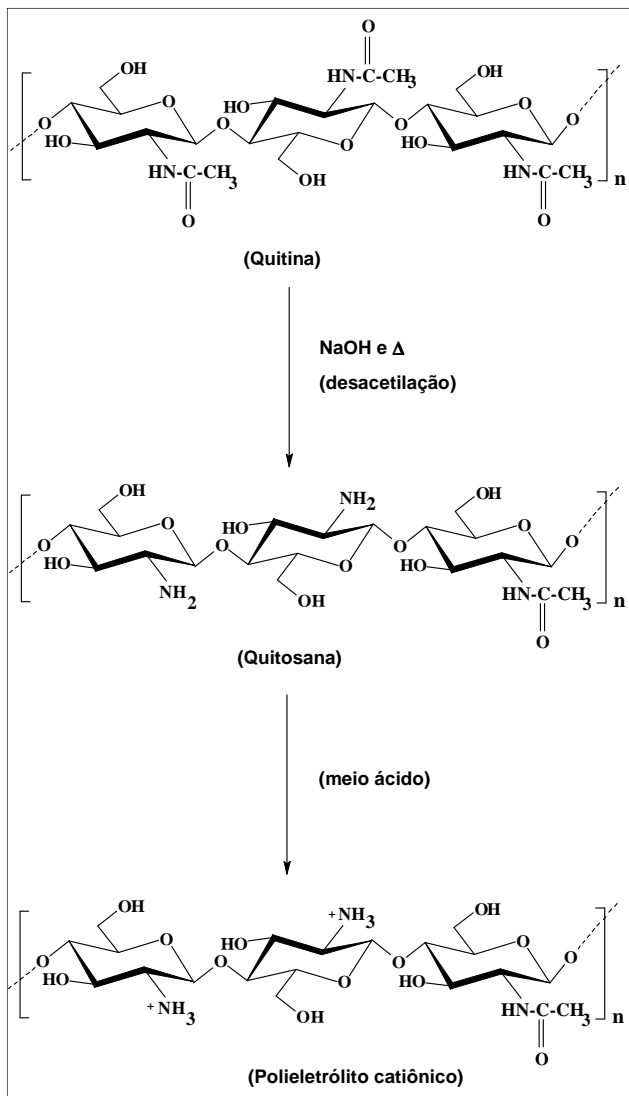


Figura 1.1 Obtenção da quitosana por meio da reação de hidrólise básica da quitina e representação da quitosana como polieletrólito catiônico.

O precursor da QTS é um polímero natural muito semelhante a celulose, presente em muitas espécies de animais marinhos e plantas inferiores. A quitina pode ser encontrada na parede celular das leveduras e exoesqueleto de invertebrados como camarão, siri, caranguejos e insetos. Sua obtenção comercial é principalmente advinda de cascas de camarão e siri, disponíveis em grandes quantidades no processamento da indústria pesqueira. A quitina apresenta em torno de 10% de grupos amino livres, enquanto que a QTS é caracterizada pela presença de uma percentagem de grupos amino superior a 60%. Durante o processo de desacetilação da quitina, os grupamentos acetamido ($-\text{NHCOCH}_3$) são transformados parcialmente em grupos amino ($-\text{NH}_2$) ao longo da cadeia polimérica através de hidrólise por via ácida ou básica (KUMAR, 2000; GUIBAL, 2004). A presença de grupos amino primários na cadeia polimérica possibilita que o biopolímero QTS atue como polieletrólito catiônico, quando em soluções levemente ácidas ou ácidas ($\text{pH} < 5$). Esses grupos amino, quando protonados, apresentam uma alta densidade de carga positiva propiciando a interação por ligação iônica com superfícies carregadas negativamente como, por exemplo, a sílica, componente básico dos capilares usados em separações por CE (LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008). A modificação dos capilares de sílica com polieletrólitos catiônicos como a QTS pode resultar em uma inversão do EOF. Essa inversão do EOF é originada pela modificação das características químicas da parede (a adsorção do polímero introduz novos grupos funcionais na parede que vão influenciar na densidade de cargas da superfície do capilar) o que altera o potencial zeta, e também modifica o EOF. Enquanto no EOF normal os compostos catiônicos migram no mesmo sentido do EOF (modo co-eletrosmótico), os ânions migram no sentido contrário (modo contra-eletrosmótico). Com o EOF invertido, ânions passam a migrar no mesmo sentido do EOF e cátions em sentido contrário. Essas mudanças podem trazer algumas vantagens para as separações, dentre elas, diminuir o tempo de análise de uma determinada espécie, e também contribuir para melhorar a resolução de separação entre espécies no modo contra-eletrosmótico.

O primeiro estudo realizado empregando QTS como modificador de capilares de sílica fundida para aplicações em CE foi feito por Yao e Li (YAO; LI, 1994). Eles empregaram a QTS como modificador dinâmico e estático usado para análise de proteínas. No revestimento dinâmico, a presença de 0,002% de polímero no eletrólito de corrida foi suficiente para inverter o EOF. Entretanto, a saturação da superfície ocorre com QTS 0,1% no eletrólito e o revestimento é realizado lavando o capilar durante 5 min com eletrólito e deixando em contato estático por mais 15 min para atingir o equilíbrio. Enquanto isso, no modo estático, o capilar foi preparado da mesma forma que o dinâmico, porém sem adição do polímero no eletrólito e lavando entre corridas durante 1 minuto para garantir a reprodutibilidade do EOF. O revestimento promoveu uma redução da interação de proteínas com a sílica, permitindo sua análise com alta eficiência de separação, e além disso, no modo estático foi observada uma reprodutibilidade do tempo de migração menor que 1%. Entretanto, a modificação somente foi efetiva na faixa de pH 3,0 - 5,5. Isto se deve ao fato da QTS apresentar um pKa em torno de 6,5, logo, em pH acima de 6,0 começa ocorrer a deprotonação do polímero provocando sua remoção da superfície do capilar, o que limita seu emprego como modificador apenas em uma estreita faixa de pH (DOHERTY *et al.*, 2003; HUANG; WANG; HUANG, 2006; LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008).

Em 2006, Huang e colaboradores propuseram um novo tipo de revestimento estático empregando a QTS como modificador e usando o agente reticulante glutaraldeído (GLU) por um procedimento rápido (60 min) e totalmente automatizado (HUANG; WANG; HUANG, 2006). A modificação com QTS reticulada é feita inicialmente condicionando o capilar com hidróxido de sódio e água deionizada, e posteriormente lavando com QTS 0,2%, em seguida com GLU 12,5%, e por fim novamente com QTS 0,2%. Esse procedimento de reticulação explora a reatividade dos grupos amino presentes na cadeia da QTS (Figura 1.2) com o objetivo de diminuir a suscetibilidade de a QTS ser removida da parede do capilar em pH elevados pela formação de uma camada polimérica na superfície do capilar, o que evita a degradação do revestimento. Isso, conseqüentemente, confere um aumento da estabilidade do revestimento, especialmente quando comparado com a modificação usando somente QTS. A reticulação com GLU forma ligações cruzadas entre cadeias poliméricas de QTS pela formação de

ligação química imina diminuindo o caráter básico do polímero o que contribui para uma menor dependência do pH do eletrólito para sua manutenção na superfície do capilar.

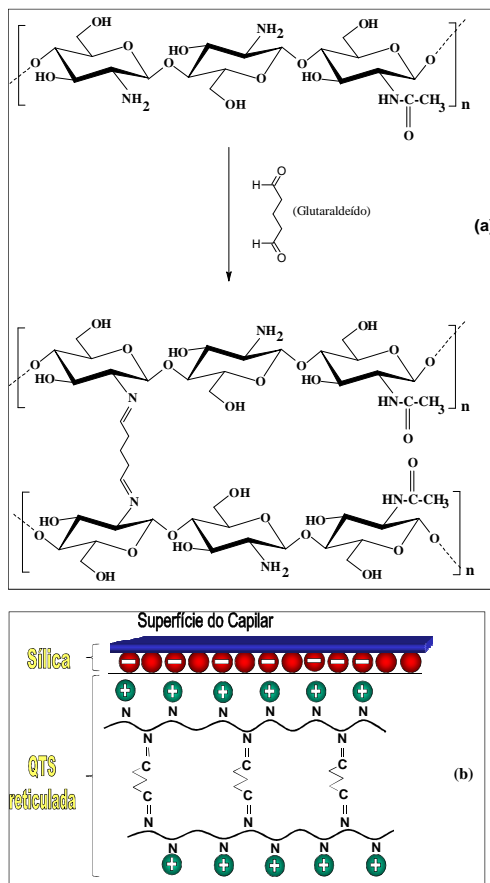


Figura 1.2 (a) Esquema representando a reticulação da QTS com GLU pela formação da ligação química imina; (b) representação do revestimento de capilar de sílica com QTS reticulada.

O capilar com QTS reticulada foi usado ao longo da faixa de pH 1,8 – 12,0 (HUANG; WANG; HUANG, 2006), uma faixa de pH muito maior que aquela observada no trabalho descrito por Yao e Li (YAO; LI, 1994). A variação do EOF em função do pH revelou um EOF invertido de pH 1,8 a 4,5 e um EOF normal acima de pH 4,5. Esse perfil de EOF observado no capilar modificado permite a separação de ânions em pH baixo e cátions em pH alto no modo co-eletromótrico, usando o mesmo capilar. O capilar revestido com QTS reticulada mostrou estabilidade do EOF após mais de 500 corridas em pH 1,8 e em torno de 150 corridas em pH 12,0, enquanto o capilar tratado estaticamente somente com QTS apresentou um EOF decrescendo continuamente, permanecendo invertido durante menos de 14 corridas em pH 3,0. A reprodutibilidade do EOF usando modificação estática com QTS reticulada mostrou bons resultados. O coeficiente de variação (CV) das medidas do EOF entre corridas foi 0,5% ($n = 6$), entre dias diferentes foi 1,1% ($n = 6$), e entre capilares diferentes foi 1,7% ($n = 4$). Os ensaios de estabilidade química revelaram que o capilar tratado com QTS reticulada foi minimamente afetado pela exposição a diferentes soluções. A estabilidade foi avaliada comparando os valores de EOF medidos antes e depois da lavagem do capilar com a solução teste durante 15 min. Os resultados expressos em porcentagem de alteração do EOF foram: uréia 5 mol L^{-1} (0,5%), metanol (1,8%), acetonitrila (2,7%), ácido fórmico (1,5%), ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (3,6%) e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (12,2%). A aplicação do capilar revestido com QTS reticulada foi avaliada na análise de proteínas ácidas (Albumina de Soro Bovino – BSA; ponto isoelétrico 4,4) e básica (Citocromo C; ponto isoelétrico 10,2), e também em amostras teste. A eficiência de separação dos padrões das proteínas foi, em média, $5,8 \times 10^5$ pratos m^{-1} para pH 4,0 e $2,0 \times 10^5$ pratos m^{-1} para pH 7,5. Os autores também investigaram a separação das mesmas proteínas em um capilar tratado estaticamente com QTS e um capilar não revestido. No capilar não revestido, nenhum pico pôde ser detectado após uma hora de corrida em pH 4,0 e em 7,5, devido a forte adsorção das proteínas nas paredes do capilar. No capilar tratado estaticamente com QTS, foram obtidos bons resultados de separação das proteínas. Entretanto, a separação ocorreu apenas em pH 4,0, pois em pH alcalinos ocorre a deprotonação do polímero tornando-o neutro e, conseqüentemente, isso provocou a degradação do revestimento. A aplicação dos capilares revestidos com

QTS, QTS reticulada e capilar não revestido, na análise de uma amostra de *Elaphglossum yoshinagae* (extrato de planta) mostrou que apenas poucos picos foram detectados no capilar não tratado em diferentes pH, enquanto nos capilares revestidos observaram-se bons resultados de separação evidenciando que o revestimento minimiza a adsorção de componentes da amostra na superfície do capilar. Entretanto, foram observados problemas de eficiência de separação e desaparecimento de alguns picos na quarta replicata, indicando que existem interações parciais de alguns componentes da amostra com a superfície do capilar, especialmente no capilar revestido estaticamente com QTS. Para solucionar este problema, o capilar teve que ser lavado entre corridas com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ a fim de renovar a superfície. No capilar revestido estaticamente com QTS a lavagem com solução básica remove completamente o revestimento danificando a modificação, assim é necessário realizar um novo procedimento para recomposição da camada polimérica. Enquanto isso, no capilar revestido usando QTS reticulada o procedimento de lavagem com solução alcalina entre corridas pode ser realizado com eficácia, devido a estabilidade química apresentada pelo revestimento garantindo um bom desempenho de separação dos analitos durante as análises.

Outro trabalho utilizando um derivado da QTS como modificador de capilar para aplicação em CE foi desenvolvido por Ma e colaboradores (MA *et al.*, 2007). Eles empregaram, como modificador, um sal de quitosana quaternizada ou simplesmente quitosana quaternizada (SAQQ), obtido pela reação do cloreto de trimetil glicidil amônio com o polímero QTS (Figura 1.3).

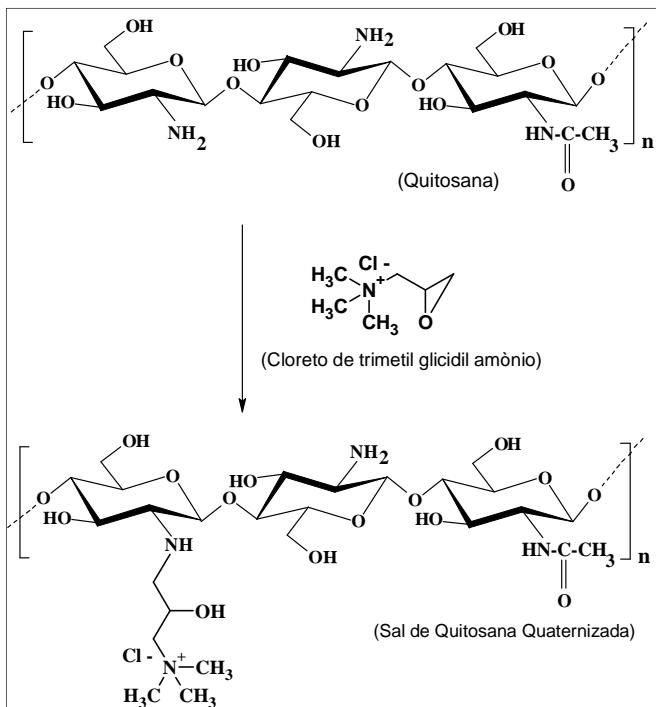


Figura 1.3 Representação da equação química para a obtenção do sal de quitosana quaternizada a partir da QTS e do cloreto de trimetil glicidil amônio.

Nesse trabalho desenvolvido por Ma e colaboradores (MA *et al.*, 2007), é informado que 76% dos grupos amino da QTS foram substituídos por grupos quaternizados e 24% não reagiram. A grande vantagem do uso do SAQQ em relação a QTS é que a introdução dos grupos amônio quaternário na cadeia do polímero o torna solúvel em toda a faixa de pH devido a presença de uma carga positiva na cadeia do polímero independentemente do pH da solução. Isso permite que o mesmo seja usado como modificador também em pH alcalino sem os problemas de deprotonação que ocorrem com a QTS nesse meio. A concentração de SAQQ usada no eletrólito de corrida para saturar a superfície do capilar e se obter um EOF constante foi de 0,005%. O comportamento do EOF em toda a faixa de pH testada (2,0 -10,0) foi

invertido (anódico), com um perfil sigmoidal, sendo uma intensidade um pouco maior em pH baixo, e um pouco menor em pH alto, devido a protonação/deprotonação dos grupos amino residuais. A reprodutibilidade do EOF usando modificação dinâmica com SAQQ mostrou resultados adequados. O CV das medidas do EOF entre corridas foi 0,5% ($n = 6$), entre dias diferentes foi 2,1% ($n = 6$), e entre capilares diferentes foi 2,9% ($n = 6$). Nesse trabalho os autores usaram SAQQ como modificador dinâmico para determinação de resíduos de sulfonamidas de uso veterinário em amostras de carne de frango, carne bovina e mel. No método proposto por Ma e colaboradores, usando um capilar modificado dinamicamente com SAQQ, a separação das sulfonamidas feita em pH 6,8 ocorreu em menos de 20 min enquanto que, em um capilar não revestido, a separação foi alcançada em cerca de 50 min (MA *et al.*, 2007).

Diante dos diferentes tipos de revestimentos de capilares de sílica descritas na literatura usando QTS e SAQQ e, tendo em vista a presença de grupos funcionais reativos na cadeia destes polímeros, seria possível propor novas modificações combinando as vantagens de cada um. Por exemplo, usar o procedimento de revestimento da QTS reticulada com o agente reticulante GLU, trocando a QTS pelo SAQQ para obter o SAQQ reticulado (Figura 1.4-a e c). Essa modificação poderia trazer uma estabilidade química maior que usando QTS reticulada, especialmente em situações que o capilar tivesse que ser lavado entre corridas com solução de hidróxido de sódio como ocorre durante a análise de proteínas (degradação da QTS reticulada com hidróxido de sódio 12%). Essa vantagem seria atribuída à não influência do pH na solubilidade do SAQQ, fato esse o provável responsável pela degradação parcial observada na modificação com QTS reticulada. Além disso, a modificação proposta com SAQQ reticulado poderia ser usada como uma camada polimérica base para interação com polieletrólitos aniônicos como, por exemplo, a carragena (Figura 1.4-d).

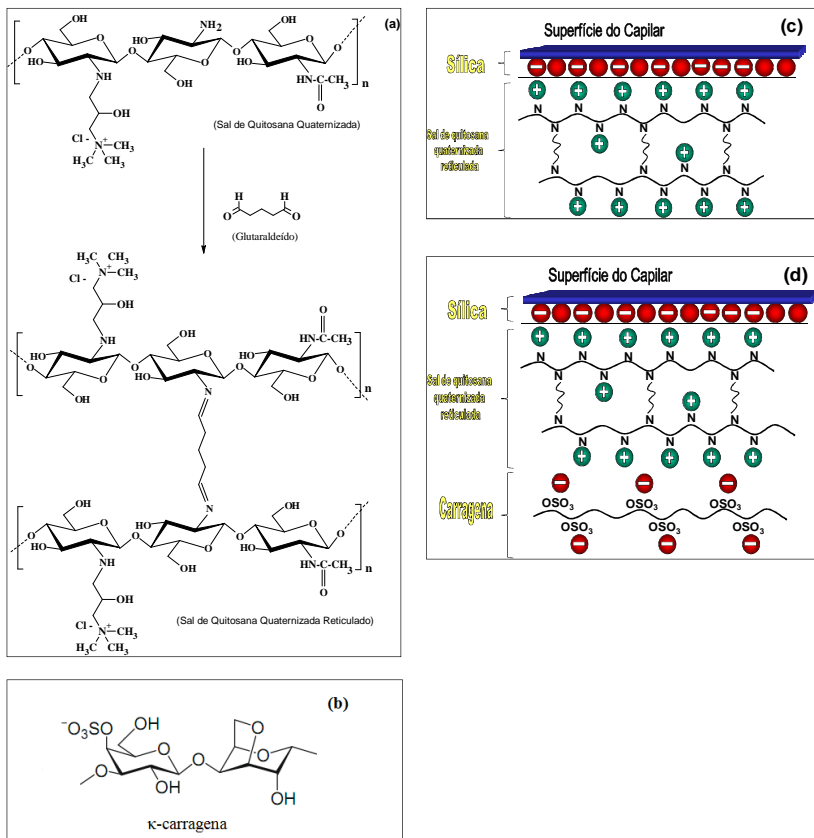


Figura 1.4 Representação da equação química para a obtenção do SAQQ reticulado (a); estrutura química da κ -carragena (b); representação da camada de SAQQ reticulado com GLU sobre a superfície de sílica (c); interação dessa camada de SAQQ reticulado com κ -carragena (d).

A carragena é um polissacarídeo extraído de algas vermelhas marinhas e tem sua aplicação em diferentes áreas como alimentos, cosméticos, farmacêutica, entre outras. A carragena contém em sua estrutura os grupos funcionais hidroxila e sulfato, sendo estes últimos os responsáveis pela densidade de carga negativa apresentada pelo polímero (CAMPO *et al.*, 2009). A interação desse polímero com outra camada polimérica catiônica ocorre por atração eletrostática, e essa nova modificação pode originar diferentes perfis de EOF em função do pH. Esses novos perfis de EOF podem ser explorados para novas aplicações em CE, não somente como um modo de minimizar a adsorção de proteínas quando estas forem analisadas, mas também podem atuar como prevenção contra adsorção de proteínas ou outros componentes presentes em diferentes matrizes complexas, permitindo o desenvolvimento de novos métodos rápidos de separação com menor pré-tratamento possível das amostras. Isto é, o revestimento apresenta dupla função, atua como camada protetora contra a adsorção de proteínas e, também, pode permitir a separação do analito no modo co-eletrosmótico diminuindo o tempo gasto nas análises. Além disso, o conhecimento dos valores de EOF em função do pH para um determinado revestimento pode contribuir para a otimização de um método por possibilitar a simulação de separações utilizando *software* de simulação muito empregados em CE. Isso é uma grande vantagem, pois a otimização do método de separação pode ser feita com pouco ou nenhum gasto de reagentes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Modificar colunas capilares com QTS, SAQQ, glutaraldeído e κ -carragena, formando revestimentos estáticos, por simples lavagens do capilar com soluções destes modificadores. Também, caracterizar cada revestimento, determinando o perfil de fluxo eletrosmótico em função do pH e verificar a reprodutibilidade de preparo e sua estabilidade.

1.2.2 Objetivos Específicos

- sintetizar o SAQQ e determinar o grau de substituição dos grupos amino por grupos quaternários;
- modificar a superfície interna de capilar de sílica fundida usando QTS reticulada com GLU, formando revestimento por ligações cruzadas entre cadeias do polímero;
- modificar a superfície interna de capilar de sílica fundida usando SAQQ reticulada com glutaraldeído como uma primeira camada polimérica catiônica formada por ligações cruzadas entre cadeias do polímero, seguida de uma camada negativa usando o polieletrólito aniônico κ -carragena;
- modificar um capilar de sílica fundida usando SAQQ por simples lavagem do capilar com o solução do polímero para formação do revestimento;
- caracterizar cada uma das modificações da superfície dos capilares de sílica utilizando análise elementar de Dispersão de raio-x (EDX, do inglês “*Energy-Dispersive X-ray*”);
- determinar o perfil de variação do EOF em função do pH para cada modificação;
- avaliar a reprodutibilidade da preparação dos revestimentos;
- avaliar a estabilidade química dos revestimentos empregando-se soluções ácidas, básicas, sais concentrados e solventes orgânicos;

- verificar a estabilidade das modificações preparadas ao longo de várias corridas;
- avaliar um procedimento para reconstrução dos revestimentos.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Instrumentação

As análises de CE foram realizadas em um equipamento de Eletroforese Capilar da marca Agilent Technologies modelo HP^{3D} CE (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas foram feitas em capilares de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato com comprimento total de 32 cm ou 48,5 cm, diâmetro interno (DI) 50 μm ou 75 μm , e diâmetro externo (DE) 375 μm , provenientes da empresa Microtube (Araraquara, SP, Brasil). Os dados foram adquiridos e tratados empregando-se o *software HP Chemstation*[®], rev A.06.01.

A titulação potenciométrica do SAQQ foi realizada em um titulador automático da marca Metrohm, modelo Titrino Plus 848 acoplado a um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl).

As análises elementares semiquantitativas de energia dispersiva de raio-x (EDX) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM-6390LV.

As medidas de pH das soluções foram realizadas em um pHmetro Corning, modelo pH/ion analyzer 350.

1.3.2 Reagentes e soluções

QTS com grau de desacetilação de 90% e massa molar média 122,74 kDa foi adquirida da Companhia Purifarma (São Paulo, SP, Brasil), glutaraldeído (GLU) 25% (v/v) em água foi adquirido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e κ -carragena foi adquirida da Sigma (São Paulo, SP, Brazil). O SAQQ foi sintetizado como descrito por Qin (QIN *et al.*, 2004) usando QTS e cloreto de trimetil glicidil amônio (CTGA, teor $\geq 90\%$ m/m) adquirido da Fluka Chemica (São Paulo, SP, Brasil). Uma solução estoque de QTS 1,0% (m/v) em ácido acético 1,0% (v/v) foi preparada por agitação a temperatura ambiente. Soluções estoque de SAQQ 1,0% (m/v), GLU 12,5% (v/v) e κ -carragena 0,1% (m/v), foram

preparadas em água deionizada. As soluções foram filtradas com membrana de 45 µm e reservadas para serem usadas nas modificações da superfície dos capilares.

Ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de sódio, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido 2-hidroxi-isobutírico (HIBA, do inglês “*2-Hydroxy-Isobutyric Acid*”), ácido acético, ácido morfolino etanossulfônico (MES, do inglês “*2-N-morpholino ethanesulfonic acid*”), hidrogenocarbonato de sódio e carbonato de sódio, todos com grau analítico de pureza, foram usados na preparação das soluções tampão para medir o EOF. As soluções tampão e seus respectivos pH usadas para medir o EOF foram: fosfato (pH 2,4 e 2,8); Tris/HIBA (pH 3,3 – 4,2; e pH 7,6 – 8,9); Tris/ácido acético (pH 4,7 e 5,3); Tris/MES (pH 5,9 – 7,4); carbonato (pH 9,5); todos com força iônica de aproximadamente 20 mmol L⁻¹ e capacidade tamponante acima de 6,0 mmol L⁻¹.

Na titulação potenciométrica do SAQQ foi usada uma solução de hidróxido de potássio padrão (isenta de CO₂) preparada por diluição de ampolas adquiridas da J. T. Baker Chemical (Phillipsburg, EUA).

As soluções de ácido clorídrico, hidróxido de sódio, ácido acético, uréia e os solventes orgânicos acetonitrila e etanol, empregados nos ensaios de estabilidade química dos capilares, foram todos de grau analítico. As soluções dos ácidos, de hidróxido de sódio e uréia, foram todas preparadas usando água deionizada.

1.3.3 Síntese e caracterização da quitosana quaternizada

A síntese do SAQQ (solúvel em água) foi feita em um balão de 125 mL, no qual foram adicionados 5,0 gramas de QTS (insolúvel em água) dispersos em 50 mL de água deionizada e um total de 10,1 g de CTGA. A adição do CTGA foi realizada em três frações de cerca de 3,4 gramas a cada 2,5 horas. A síntese foi realizada em banho termostaticado a 60 °C (± 5 °C) por 24 horas, sob agitação magnética constante de 600 rpm. Depois de finalizada a reação, a mistura foi transferida para frascos de 10 mL e centrifugada a 3000 rpm por 5 min para remover resíduo de QTS que não reagiu. Posteriormente, o sobrenadante da mistura centrifugada onde está o produto da reação

solubilizado na água, foi colocado em um béquer e o pH dessa solução foi ajustado para 5,4 com adição de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, o produto da reação foi precipitado pela inserção dessa solução aquosa em acetona. Por fim, o produto precipitado foi filtrado em funil de Büchner, seco em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, triturado em moinho e armazenado em dessecador. A determinação da quantidade de grupos quaternários introduzidos na QTS após a reação de quaternização foi feita por titulação potenciométrica.

A titulação potenciométrica foi realizada em uma cela refrigerada mecanicamente por um banho de circulação termostaticado a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). Nesta cela foram adicionados cerca de 30 mg de SAQQ, cerca de 185 mg de cloreto de potássio, 25 mL de água bidestilada fervida e 20 mL de ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. O cloreto de potássio foi usado para ajustar a força iônica do meio e o ácido clorídrico para reduzir o pH e garantir a protonação dos grupos amino residuais do SAQQ. O sistema foi mantido sob fluxo de argônio para eliminar a presença de CO_2 atmosférico. Para a titulação, foi utilizada uma solução padronizada de KOH $0,09837 \text{ mol L}^{-1}$ isenta de CO_2 , onde foram adicionadas alíquotas de 0,05 mL até pH 11, empregando um titulador automático acoplado a um eletrodo de vidro combinado. O titulante utilizado foi padronizado com ftalato ácido de potássio, previamente seco a $110 \text{ }^\circ\text{C}$, por 2 horas, usando como indicador uma solução de fenolftaleína 1% (m/v) em etanol. As constantes de dissociação ácida e os mmols de cada grupamento titulado do SAQQ foram calculadas a partir da curva de titulação obtida experimentalmente utilizando o programa BEST7 (MOTEKAITIS; MARTELL, 1982). Com os mmols calculados foi possível determinar quantos grupos amino foram substituídos, e assim determinar o grau de substituição do SAQQ obtido na reação.

1.3.4 Metodologia para revestimento dos capilares

A preparação dos revestimentos nas colunas capilares foi feita por lavagens alternadas do capilar com as soluções das substâncias que constituem cada revestimento. A fim de economizar tempo de uso do equipamento de CE e tempo de uso da lâmpada de deutério, aumentar a vida útil da bomba de pressão do equipamento, facilitar o preparo dos revestimentos, e principalmente devido a possibilidade de realizar diferentes revestimentos ao mesmo tempo, os revestimentos foram preparados em um sistema fora do equipamento. Esse sistema está apresentado na Figura 1.5.

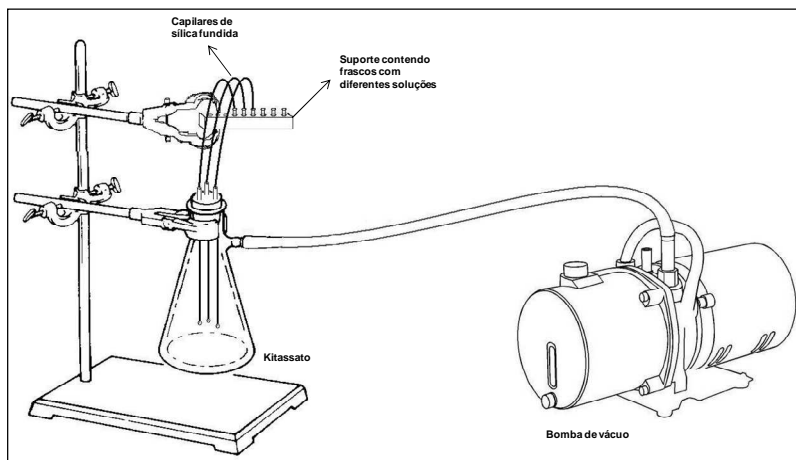


Figura 1.5 Esquema representando o sistema usado para realizar as modificações de capilares fora do equipamento de CE.

O sistema é constituído por um suporte universal, garras, um suporte contendo diferentes frascos cada um com uma solução na qual uma das extremidades do capilar é inserida, um kitassato no qual é introduzida a outra extremidade do capilar e uma bomba de vácuo para

gerar pressão negativa e forçar a passagem da solução pelo capilar. Para controlar o tempo de lavagem do capilar com cada solução basta utilizar um cronômetro. O sistema também pode ser empregado no condicionamento normalmente realizado em capilares de sílica fundida lavando com solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} e água deionizada, para vários capilares simultaneamente, sendo possível inclusive fazer o condicionamento do capilar com o eletrólito de corrida do método a ser utilizado.

1.3.4.1 Capilar revestido com QTS reticulada

A modificação da superfície de sílica fundida de tubos capilares utilizando QTS e GLU foi realizada como descrito por Huang e colaboradores (HUANG; WANG; HUANG, 2006). O procedimento de revestimento foi iniciado pelo condicionando do capilar lavando com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ durante 30 min e posteriormente lavando com água deionizada por 15 min para promover a hidratação da superfície do capilar. Após o pré-condicionamento, o capilar foi lavado com solução de QTS 0,2% (m/m) por 10 min e mantido em contato estático por mais 10 min, com isso a QTS foi adsorvida pelos grupos silanóis presentes na superfície do capilar. Então, o capilar foi lavado com solução de GLU 12,5% (v/v) durante 5 min e mantido em contato estático por 15 min, tempo suficiente para que a reação de ligação do GLU na camada de QTS adsorvida seja completada. Por fim, o capilar foi novamente lavado com solução de QTS (mesma concentração da etapa anterior) por 10 min e mantido em contato estático durante 10 min, formando o revestimento catiônico da superfície interna do capilar com QTS reticulada.

1.3.4.2 Capilar revestido somente com SAQQ sem reticulação

O procedimento de revestimento do capilar com SAQQ somente lavando com solução polimérica (sem camada de GLU) foi iniciado pelo condicionando do capilar lavando com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ durante 30 min e posteriormente lavando com água deionizada por 15 min. Após o pré-condicionamento, o capilar foi lavado com solução de SAQQ 0,2% (m/v, diluído com ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) por 5 min e mantido em contato estático por mais 5 min, com isso o SAQQ foi adsorvido pelos grupos silanóis presentes na superfície do capilar formando o revestimento catiônico na superfície interna do capilar com SAQQ sem uso do polímero como aditivo no eletrólito.

1.3.4.3 Capilar revestido com SAQQ reticulado e capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena

A modificação de capilares de sílica fundida utilizando SAQQ e GLU para formar o revestimento de SAQQ reticulado foi realizada de maneira semelhante ao procedimento de revestimento da QTS reticulada. Inicialmente o capilar foi lavado 30 min com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e 15 min com água deionizada. Depois, o capilar foi lavado com solução de SAQQ 0,2% (m/m) por 10 min e mantido em contato estático durante 10 min. Em seguida o capilar foi lavado com solução de GLU 12,5% (v/v) durante 5 min e mantido em contato estático por 15 min. Posteriormente o capilar foi novamente lavado com solução de SAQQ (mesma concentração da etapa anterior) por 10 min e mantido em contato estático durante 10 min para gerar a camada polimérica catiônica reticulada.

O procedimento para formação do revestimento com SAQQ reticulado e κ -carragena foi realizado empregando exatamente as mesmas etapas do revestimento da SAQQ reticulado (camada usada como base polimérica catiônica), seguido da lavagem do capilar com solução de κ -carragena 0,1% (m/m) durante 10 min e mantidos em contato estático por 10 min.

1.3.5 Caracterização dos capilares revestidos

1.3.5.1 Preparação dos capilares para análises de EDX

As análises de EDX foram realizadas em segmentos de capilares de sílica fundida de cerca de 3 cm. Estes tiveram seu revestimento externo de poliacrilato removidos com maçarico e acetona ficando com a sílica exposta. Nesses capilares foram realizados os diferentes revestimentos propostos no presente trabalho por imersão do mesmo nas soluções empregadas em cada revestimento, usando concentração e tempo de contato idêntico ao procedimento realizado internamente nos capilares. O tempo de lavagem do capilar com solução foi substituído por tempo de agitação usando barra magnética. Os capilares com cada revestimento realizado na parte externa foram deixados em dessecador sob vácuo contendo sílica durante dois dias para eliminar água e umidade. Estes capilares foram fixados em suportes metálicos com fita dupla face e inseridos no microscópio eletrônico para análise de EDX na superfície externa.

1.3.5.2 Caracterização dos capilares revestidos utilizando eletroforese capilar

Todos os experimentos de medida de EOF para caracterização dos capilares revestidos empregando eletroforese capilar foram feitos usando eletrólitos com força iônica constante cerca de 20 mmol L^{-1} , em toda a faixa de pH estudada. Todas as lavagens dos capilares com solução foram feitas aplicando a pressão máxima do equipamento de CE (1,0 bar), quando este foi usado, ou o vácuo máximo obtido pela bomba de vácuo usada fora do equipamento (0,9 bar).

Os ensaios de avaliação da mobilidade do EOF em função do pH foram feitos na faixa de pH 2,0 a 9,5. Antes das medidas de mobilidade em cada pH os capilares revestidos foram lavados com o

respectivo eletrólito cerca de 20 volumes de capilar. Para cada pH foram realizadas no total quatro medidas de mobilidade em dois capilares preparados da mesma maneira para cada tipo de revestimento.

A verificação da estabilidade química dos revestimentos foi feita por lavagem dos capilares com soluções de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, uréia $5,0 \text{ mol L}^{-1}$, e com os solventes orgânicos acetonitrila e etanol. A mobilidade do EOF foi medida antes da lavagem do capilar revestido com a solução/solvente e comparada com a mobilidade medida depois de lavar o capilar cerca de 100 volumes de lavagem com a solução teste. O pH do eletrólito usado nas medidas de mobilidade foi 3,3. Antes das medidas de mobilidade os capilares foram lavados com eletrólito cerca de 50 volumes de capilar.

A estabilidade dos diferentes revestimentos construídos foi avaliada ao longo de 150 corridas realizadas em pH 2,4 (tampão fosfato) e 8,9 (Tris/HIBA), ambos com força iônica cerca de 20 mmol L^{-1} . Cada corrida foi feita lavando o capilar com o respectivo eletrólito (sem nenhum aditivo) cerca de 5 volumes de lavagem e aplicando 25 kV durante 2 min. Após cada corrida realizada a mobilidade do EOF foi medida.

O estudo de remoção do revestimento para posterior reconstrução visando a reutilização dos capilares foi realizada em um capilar revestido com QTS reticulada. O capilar revestido contendo as dimensões $48,5 \text{ cm } (L_{tot}) \times 75 \text{ } \mu\text{m } (DI)$ foi lavado com solução de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ usando diferentes volumes de lavagem. A mobilidade do EOF no capilar revestido foi medida antes e depois da lavagem com solução removedora. O pH do eletrólito usado neste experimento foi 2,85. Antes de cada medida de mobilidade do EOF o capilar foi lavado com água 25 volumes de capilar e com eletrólito 25 volumes.

Todos os cálculos de volumes de lavagem dos capilares foram realizados empregando as seguintes equações (LANDERS; 2008):

$$(volume)_{lav} = \frac{(volume)_{int}}{(volume)_{cap}} \quad (\text{Equação 1.1})$$

$$(volume)_{cap} = \pi r^2 L_{tot} \quad (\text{Equação 1.2})$$

$$(volume)_{int} = \pi r^2 \left[\frac{\Delta P r^2 t_{int}}{8 \eta L_{tot}} \right] \quad (\text{Equação 1.3})$$

onde, $(volume)_{lav}$ é o volume de lavagem em m^3 ; $(volume)_{cap}$ é o volume interno do capilar em m^3 ; $(volume)_{int}$ é o volume de solução introduzido em m^3 ; r é o raio interno do capilar em m; ΔP é a variação de pressão em $N\ m^{-2}$; t_{int} é tempo de introdução da amostra ou tempo de lavagem em s; η é a viscosidade da solução em $N\ s\ m^{-2}$; L_{tot} é o comprimento total do capilar em m. O valor de viscosidade usada nos cálculos foi $8,9 \times 10^{-4}\ N\ s\ m^{-2}$ (25 °C) (BERSTAD *et al.*, 1988). Para termos de conversão de unidades de pressão foi usado 1,0 bar equivalendo a $99920\ N\ m^{-2}$.

1.3.5.2.1 Medidas de mobilidade do fluxo eletrosmótico

Todas as medidas de mobilidade do EOF nos capilares com diferentes revestimentos foram feitas utilizando o método de Williams e Vigh (WILLIAMS; VIGH, 1996), que é um método interessante por ser preciso e permitir medidas de mobilidades tão baixas quanto $0,5 \times 10^{-10}\ m^2\ V^{-1}\ s^{-1}$, com maior rapidez que o modo normal e com boa reprodutibilidade. O método consiste em uma sequência de etapas que combina a injeção de um marcador neutro, por exemplo, acetona (usada nas medidas de EOF deste trabalho), e sua transferência ao longo do capilar por aplicação de tensão e por pressão, como mostra a Figura 1.6.

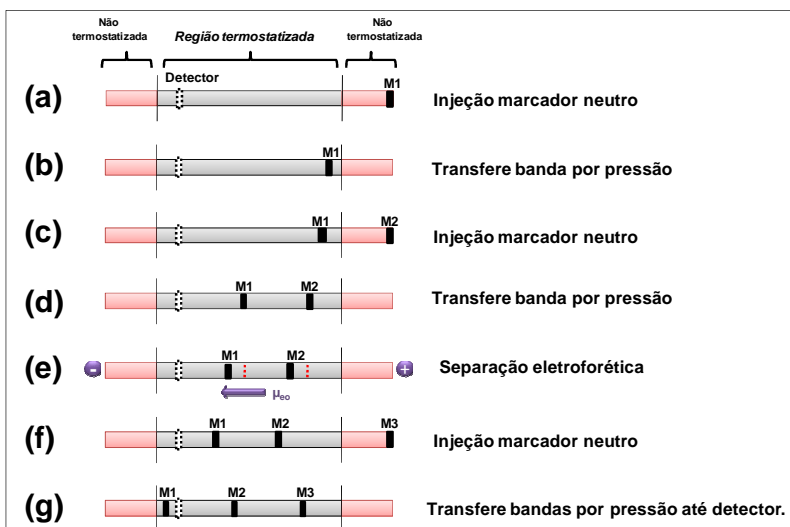


Figura 1.6 Etapas do método para determinação da mobilidade do EOF por aplicação de tensão e pressão (adaptado de: WILLIAMS; VIGH, 1996).

Primeiramente, o capilar é lavado com o eletrólito de corrida. Em seguida, uma solução do mesmo eletrólito contendo o marcador é injetada no capilar, como mostra a etapa (a), originando a banda M1. Então, na etapa (b) a banda M1 é transferida uma determinada distância por pressão durante determinado tempo. Em seguida, na etapa (c) outra banda do marcador neutro é injetada originando a banda M2. Na etapa (d), novamente a banda M2 é transferida aplicando a mesma pressão e mesmo tempo de transferência da banda M1. A transferência da primeira e da segunda banda foi feita aplicando pressão durante tempo suficiente para as bandas atingirem a região termostatzada do capilar, o que minimiza efeitos da temperatura na medida do EOF. Este tempo de transferência depende das dimensões do capilar usado. Na etapa (e) é aplicado potencial durante determinado tempo, para que ambas as bandas M1 e M2 se movam na direção do cátodo (para um EOF catódico), com mobilidades iguais á mobilidade do fluxo eletrosmótico. Então, após retornar ao potencial zero, na etapa (f), uma terceira banda do marcador é injetada originando a banda M3. Por fim, na etapa (g), as

três bandas do marcador são transferidas até o detector por pressão. As equações que permitem realizar o cálculo da medida do EOF utilizando o método descrito acima é a equação que segue:

$$\mu_{eo} = \frac{L_{EO} \cdot L_{tot}}{V_{apl} \left(t_{migr} - \frac{t_{ramp-up}}{2} - \frac{t_{ramp-down}}{2} \right)} \quad (\text{Equação 1.4})$$

onde, μ_{eo} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico ($m^2 V^{-1} s^{-1}$); V_{apl} potencial aplicado (V); t_{migr} tempo de aplicação do potencial (s); $t_{ramp-up}$ e $t_{ramp-down}$ são os tempos (s) para atingir o potencial programado e tempo para retornar ao zero de potencial, respectivamente; L_{tot} é o comprimento total do capilar (m); e por fim L_{EO} representa a distância entre os marcadores neutros (m), o qual é obtido da equação abaixo:

$$L_{EO} = [(t_{M3} - t_{M2}) - (t_{M2} - t_{M1})] V_m \quad (\text{Equação 1.5})$$

na qual t_{M1} , t_{M2} e t_{M3} são os tempos de migração (s) dos três pluguessa do marcador injetado e V_m é a velocidade de mobilização final por aplicação de pressão ($m s^{-1}$), a qual pode ser calculado de acordo com a equação abaixo:

$$V_m = \frac{L_{det}}{t_{M3} + \frac{t_{inj}}{2} - t_D} \quad (\text{Equação 1.6})$$

onde, L_{det} é o comprimento do capilar até o detector (m); t_{M3} é o tempo de chegada do terceiro plugue do marcador (s); t_{inj} é o tempo de injeção do plugue (s); e t_D é o tempo (s) entre o início da aplicação de pressão para transferência dos três pluguessa do marcador até o detector e o início processo de aquisição de dados. Os valores de $t_{ramp-up}$, $t_{ramp-down}$ e t_D , estimados para serem usados nos cálculos do EOF foram 2, 1 e 2 s, respectivamente. Os demais parâmetros dependeram da configuração usada para medir o EOF em cada capilar revestido.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1 Caracterização do SAQQ sintetizado

A caracterização do SAQQ sintetizado a partir da QTS e do CTGA foi realizada determinando o grau de substituição dos grupos amino da QTS por grupos quaternários do CTGA utilizado titulação potenciométrica. A curva de titulação obtida está apresentada na Figura 1.7.

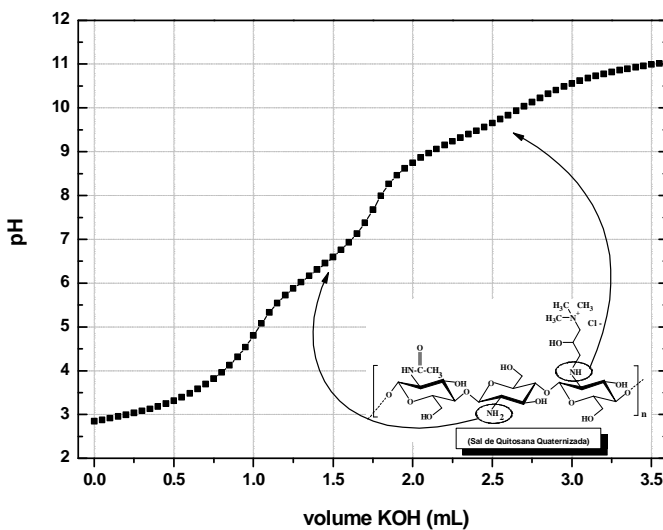


Figura 1.7 Curva de titulação potenciométrica do SAQQ.

O tratamento dos dados experimentais da curva de titulação foi realizado com o auxílio do *software* BEST7. Os resultados obtidos da titulação mostraram um ponto de viragem em pH 4,52 referente ao ácido

clorídrico usado para reduzir o pH da solução antes do início da titulação. O segundo ponto de viragem determinado no pH 7,64 representa a titulação dos grupos amino remanescentes da QTS que não reagiram. E o terceiro ponto de viragem, em pH 9,85, mostra o fim da titulação dos grupos amino substituídos pelos grupos quaternários. A quantidade de mmols determinada de aminos que não reagiram foi de 0,08785 (volume gasto de KOH 0,09837 mol L⁻¹ foi 0,893 mL) e de grupos amino substituídos foi de 0,10635 (volume gasto de KOH foi 1,081 mL). Com esses valores foi determinado o grau de substituição utilizando a seguinte equação:

$$GS = \frac{N_{as} \cdot 100}{N_{at}} \quad (\text{Equação 1.7})$$

onde, GS é o grau de substituição em porcentagem; N_{as} é o número de mmols de amino substituídos; N_{at} é o número de mmols de amino totais obtido pela soma da quantidade de amino que não reagiram e a quantidade de amino substituídos. Assim, a porcentagem de substituição calculada foi de 54,8%. Isso significa que mais da metade dos grupos amino presentes na cadeia da QTS foram substituídos por grupos quaternários formando o SAQQ. Comparando a quantidade de grupos quaternários obtidos no SAQQ sintetizado no presente estudo por titulação potenciométrica, que foi 3,54 mmol por grama de SAQQ, pode-se verificar que esse resultado está um pouco diferente do obtido por Spinelli e colaboradores (SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004), usando titulação do cloreto, contra-íon do grupo quaternário titulado com nitrato de prata, que foi de 2,09 mmol de grupos quaternários por grama de SAQQ. Essa diferença pode ser devido a uma substituição menos efetiva dos grupos amino em função da síntese do SAQQ que é realizada sob condições especiais envolvendo diversas etapas. Com relação aos pontos de equivalência da curva de titulação, especialmente o valor de pH observado para a titulação dos grupos amino remanescentes na cadeia do SAQQ (pH 7,64), este foi diferente do pH 6,5, valor do pKa dos grupos amino presentes na QTS (pKa ~ 6,5) que corresponde ao pH onde ocorre a equivalência da titulação deste polímero. Essa diferença pode ocorrer devido a constante de dissociação de um polieletrólito não ser um valor constante, mas sim dependente, dentre outros fatores, do número de grupos presentes na

cadeia do polímero que conferem as características ácidas ou básicas ao polímero em solução (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Assim, com a reação de substituição realizada na QTS as características do novo polímero SAQQ sintetizado são diferentes da QTS e dependentes do grau de substituição da reação. No caso do SAQQ, além dos grupos quaternários contribuírem com as cargas positivas do polímero independente do pH da solução, também os grupos amino remanescentes e os amino substituídos contribuem.

1.4.2 Concentrações dos reagentes e tempos de cada etapa no procedimento de modificação dos capilares de sílica para construir os diferentes revestimentos com QTS, SAQQ, GLU e κ -carragena

1.4.2.1 Revestimento de QTS reticulada

As condições experimentais de concentração dos reagentes e tempo de cada etapa do procedimento de modificação do capilar, adotadas para promover o revestimento com QTS reticulada foram as mesmas descritas no artigo de Huang e colaboradores (HUANG; WANG; HUANG, 2006). A concentração de 0,2% (m/v) de QTS usado foi o resultado de concentração obtido na otimização do artigo citado. Os tempos de lavagem e contato estático empregados em cada etapa, para as concentrações dos reagentes selecionadas, seja na adsorção da QTS na parede conforme descrito no artigo citado seja na reação de formação da imina com GLU (12,5%, v/v), são suficientes para obter a camada de QTS reticulada (MONTEIRO JR.; AIROLDI, 1999; KILDEEVA *et al.*, 2009).

1.4.2.2 Revestimento com SAQQ somente lavando o capilar com solução do polímero

Para a formação do revestimento com SAQQ somente lavando o capilar com solução polimérica e sem usar o polímero como aditivo no

eletrólito foi realizado um experimento lavando o capilar com soluções de diferentes concentrações de SAQQ (0 – 0,25%, m/v) diluídas em ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para garantir a protonação dos grupos amino que também contribuem para a fixação do SAAQ na parede por atração eletrostática. A densidade de cargas positivas do SAQQ é atribuída aos grupos amino especialmente em pH baixos devido ao seu pKa (cerca de 6), e aos grupos amino quaternário que estão carregados independentemente do pH do meio. O procedimento para modificar o capilar de sílica com SAQQ foi feito por lavagem do capilar com solução polimérica durante 5 min e manutenção em contato estático com a solução durante 5 min. Os resultados foram avaliados observando o valor do EOF em função da concentração da solução de SAQQ usada na lavagem do capilar (medidas em duplicata). A Figura 1.8 mostra o perfil de variação do EOF obtido. Foi possível verificar que o EOF partiu de um valor próximo a zero de mobilidade característico de um capilar não revestido, e com o aumento das concentrações de SAQQ na solução de lavagem o EOF tornou-se anódico e a intensidade do EOF aumentou exponencialmente até um valor de cerca de $-37 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com 0,10% de SAQQ em solução, permanecendo praticamente constante a partir desta. Em concentrações maiores de SAQQ, ocorre uma saturação efetiva da superfície do capilar com o polímero, verificada pela estabilidade da intensidade do EOF. Assim, a condição para revestimento do capilar com SAQQ selecionada foi a modificação usando solução polimérica 0,20 %.

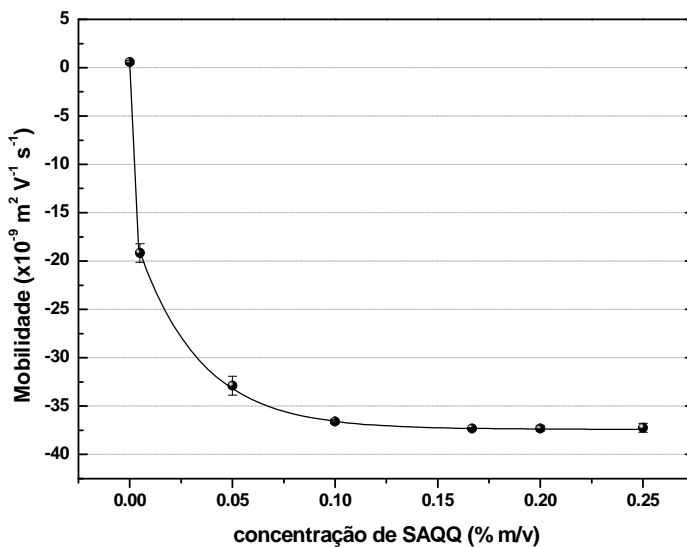


Figura 1.8 Otimização da concentração de SAQQ para modificação do capilar somente lavando o capilar com solução polimérica. Condições experimentais: capilar 32 cm condicionado inicialmente com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} por 30 min e água deionizada por 15 min e depois com SAQQ em diferentes concentrações, e eletrólito de corrida fosfato pH 2,4. Procedimento para revestimento do capilar e medida do EOF: lava o capilar com solução de diferentes concentrações de SAQQ (% m/v) durante 5 min, deixa 5 min em contato estático, lava 3 min com eletrólito de corrida (sem SAQQ) e mede o EOF usando $10 \text{ kV}/0,5 \text{ min}$ de separação e acetona como marcador neutro.

1.4.2.3 Revestimento de SAQQ reticulado e revestimento de SAQQ reticulado e κ -carragena

No revestimento de SAQQ reticulado, a concentração de SAQQ na etapa de lavagem do capilar foi escolhida de acordo com o resultado da otimização descrita no item anterior, no qual o valor de concentração de SAQQ selecionado para garantir uma máxima cobertura da superfície do capilar foi de 0,2% (m/v). Como o SAQQ apresentou cerca de 55% de substituição de grupos amino por grupos quaternários, restando ainda cerca de 45% de grupos amino, a reação de reticulação entre cadeias poliméricas através da reação de formação da imina usando GLU como agente reticulante é possível. Assim, as condições experimentais adotadas para a formação do revestimento com SAQQ reticulado, incluindo tempo de lavagem e contato estático com cada solução e a concentração de GLU, foram as mesmas do procedimento de modificação do capilar com QTS reticulada, apenas substituindo QTS por SAQQ, pois são valores suficientes para que o equilíbrio de interação entre os reagentes ocorra.

A modificação do EOF usando κ -carragena leva em consideração desenvolver um revestimento semi-permanente, isto é, uma modificação do capilar sem necessidade do uso de polímero aniônico como aditivo no eletrólito, assim como as outras modificações propostas. Por isso, a fim de permitir uma máxima fixação do polímero aniônico na parede do capilar foi feita sobre a sílica uma camada polimérica catiônica composta de SAQQ reticulado com GLU para servir como uma camada de ligação entre a sílica e a κ -carragena. A camada catiônica foi construída simplesmente lavando o capilar com soluções de SAQQ, GLU e novamente SAQQ, como descrito anteriormente. Sobre essa camada catiônica foi realizada a modificação com κ -carragena por lavagens do capilar usando solução deste polímero aniônico durante 10 min e mantidos em contato estático por 10 min. Para verificar qual a concentração da solução de κ -carragena deve ser usada nesta última etapa do revestimento, o capilar foi lavado com soluções de κ -carragena com concentrações variando de 0,0 a 0,1% (m/v) e o EOF foi medido após lavagem do capilar com cada solução. A variação da mobilidade do EOF em função da concentração de κ -carragena está apresentada na Figura 1.9.

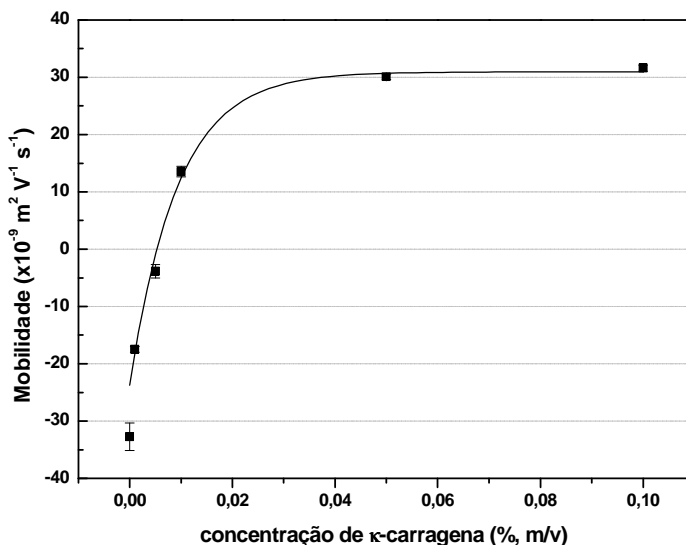


Figura 1.9 Otimização da concentração de κ -carragena usada na última etapa da modificação do capilar sobre a camada de SAQQ reticulado. Eletrólito fosfato em pH 2,8, força iônica 20 mmol L^{-1} , entre os experimentos lava com eletrólito 5 min, lavagem com solução de κ -carragena por 10 min e mantém em contato estático por 10 min, medida do EOF por pressão usando $\pm 10 \text{ kV}/0,5 \text{ min}$ e acetona como marcador neutro.

Os resultados obtidos mostraram que o EOF partiu de um valor cerca de $-33 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com 0,0% de κ -carragena (EOF anódico, característico da presença das cargas positivas na parede relativas ao SAQQ) e diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de polímero aniônico até ser invertido para $14 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ com 0,01% de polímero (EOF catódico, característico da prevalência de cargas negativas na parede do capilar referentes especialmente a κ -carragena por estar ionizada no pH 2,8 (CAMPO *et al.*, 2009). A partir de 0,05%

de polímero, o EOF atingiu seu valor máximo de cerca de $30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ permanecendo praticamente constante com concentrações maiores deste polímero. Assim, foi escolhida a concentração 0,1% de κ -carragena para construir o revestimento. A camada catiônica com SAQQ reticulado interage fortemente por atração eletrostática com os silanóis ionizados da sílica e com os grupos sulfato da κ -carragena, permitindo a fixação do polímero aniônico na parede. A presença de grupos amino e amino quaternário na estrutura do SAQQ contribui para uma boa fixação da κ -carragena e uma consequente alteração do EOF. Além disso, a presença de grupos hidroxila no SAQQ e na κ -carragena também contribui para a interação entre estes polímeros por ligação de hidrogênio, assim como contribui para interação dessa camada polimérica com a parede do capilar que apresenta em sua constituição grupos silanóis.

1.4.3 Caracterização dos capilares revestidos

1.4.3.1 Análise semi-quantitativa de Energia Dispersiva de raio-x (EDX)

Para confirmar a presença dos polímeros empregados nos revestimentos propostos formando as diferentes modificações nos capilares de sílica fundida foram realizadas análises semi-quantitativas de EDX a fim de detectar a presença dos elementos químicos que constituem os polímeros usados nas modificações. Essa análise é realizada na superfície de um sólido, isto é, constitui-se em uma análise superficial em que a penetração do feixe de raio-x depende da intensidade da energia do feixe (STEFANIAK *et al.*, 2006). Além disso, os resultados dependem também da espessura da camada polimérica. A realização das medidas de EDX foi feita em capilares de sílica fundida revestidos exatamente como procedimentos descritos para cada modificação (QTS reticulada; SAQQ somente lavando o capilar com solução polimérica; SAQQ reticulado; SAQQ reticulado e κ -carragena), com a única exceção que foram feitas na parte externa de capilares de sílica após remoção do revestimento externo de poliácrlato (Figura

1.10). Os resultados das análises de EDX obtidos estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Valores de porcentagem em massa dos elementos silício (Si), oxigênio (O), carbono (C), nitrogênio (N), e enxofre (S), obtidos por análise elemental de Energia Dispersiva de raio-x, para as amostras de capilares com as diferentes modificações.

	Si (%)	O (%)	C (%)	N (%)	S (%)
Sílica fundida	59	41	-	-	-
QTS reticulada	1	24	67	8	-
SAQQ somente lavando	3	33	55	9	-
SAQQ reticulado	1	16	76	7	-
SAQQ reticulado e κ-carragena	8,5	55	32	4	0,5

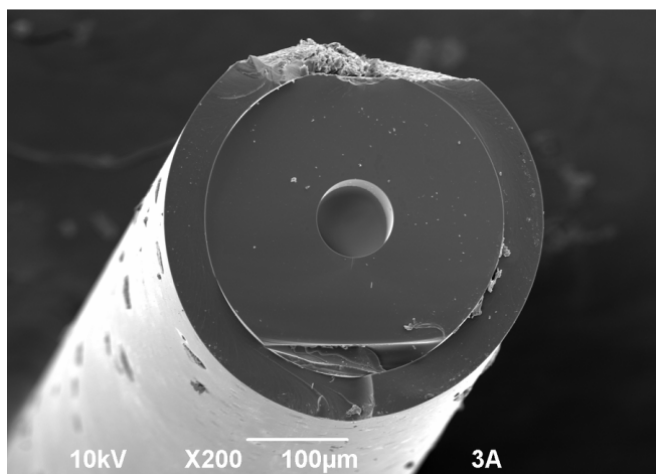


Figura 1.10 Microscopia eletrônica de varredura de um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato (aproximação de 200 vezes).

Os resultados mostraram que no capilar não tratado somente foram detectados silício e oxigênio, enquanto que nos capilares revestidos com QTS reticulada, SAQQ somente lavando e SAQQ reticulado, foram verificadas as presenças além de silício, oxigênio, também carbono e nitrogênio, estes últimos elementos que compõe a estrutura polimérica da QTS e SAQQ, indicando a presença dos polímeros na superfície do capilar e, conseqüentemente, da formação do revestimento. Uma parte da porcentagem de carbono e oxigênio detectada é atribuída ao GLU usado na reação de reticulação da QTS e SAQQ. Quanto aos resultados de análise elementar para a modificação com SAQQ reticulado e κ -carragena, foram encontrados além de silício, oxigênio, carbono, nitrogênio, referentes a camada catiônica com SAQQ reticulado na superfície de sílica, também o enxofre foi detectado. Este último elemento compõe apenas a estrutura da κ -carragena, sugerindo que o polímero aniônico está presente na superfície do capilar formando a modificação da parede com a κ -carragena.

1.4.3.2 Fluxo eletrosmótico nos diferentes revestimentos

Uma característica importante das colunas capilares usadas em CE que deve ser conhecida é o fluxo eletrosmótico. Esse fenômeno irá contribuir positiva ou negativamente para as separações em CE no dado pH escolhido para a separação (SILVA *et al.*, 2007). Por isso se faz necessário avaliar o perfil do EOF, catódico ou anódico, além de sua intensidade, em função do pH do eletrólito, para cada um dos diferentes revestimentos propostos. A variação do EOF em função do pH para as modificações realizadas estão apresentadas na Figura 1.11.

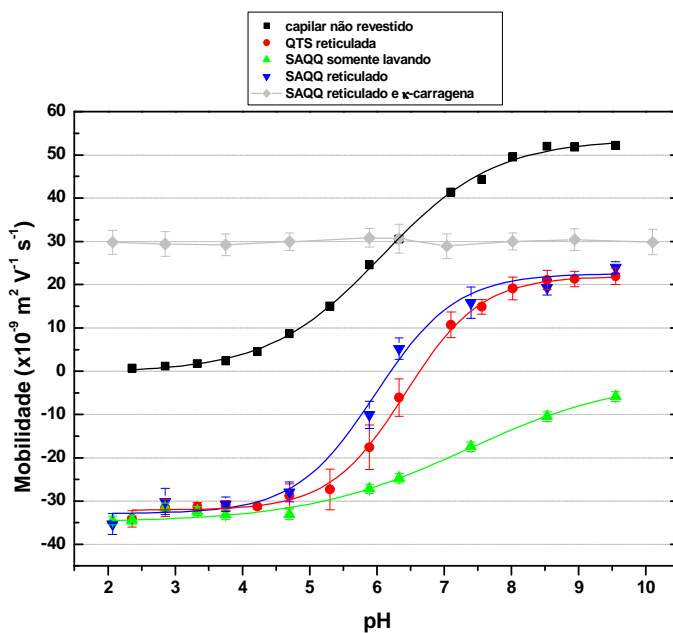


Figura 1.11 Curvas de mobilidade do EOF em função do pH, para os capilares de sílica fundida usando diferentes modificadores e um capilar não revestido. Resultados de EOF para os capilares revestidos referentes a 4 medidas em dois capilares, para cada modificação. Eletrólitos com força iônica cerca de 20 mmol L^{-1} .

No capilar revestido com QTS reticulada, a mobilidade do EOF observada em função do pH apresentou um perfil sigmoidal, ficando constante e anódico em pH abaixo de 4,7; apresentando uma inflexão em pH 6,3, que se inicia em pH 5,3 (EOF anódico) e termina em pH 7,5 (EOF catódico), e com EOF permanecendo constante e catódico acima de pH 8,0. Como observado no gráfico a mobilidade anódica do EOF em pH menores que 6,0 é resultante da existência de uma densidade de cargas positivas na parede do capilar devido aos grupos amino protonados presentes na cadeia do polímero fixado na parede. Já em pH acima de 7,0 o EOF catódico é gerado pela densidade de cargas negativas dos silanóis residuais que não interagiram com a QTS. Apesar da preparação do revestimento do capilar de sílica fundida com QTS e GLU usada no presente trabalho ter sido idêntica ao descrito por Huang e colaboradores (HUANG; WANG; HUANG, 2006), a variação do EOF observada foi diferente. O comportamento do EOF *versus* pH obtido por Huang e colaboradores mostrou um aumento praticamente linear do EOF com o aumento do pH na faixa de pH 1,8 – 5,0 com um EOF anódico em pH menores que 4,0 e um EOF constante e catódico acima de pH 6,0. O perfil do EOF em função do pH no presente estudo está de acordo com o que deveria ser esperado para esta modificação devido aos valores de pKa para a QTS (6,3 – 6,7) (GUIBAL; 2005) e a sílica (4,0 – 6,0) (LANDERS; 2008). Esse comentário decorre da consideração de que a medida da mobilidade do EOF *versus* pH é uma titulação da parede do capilar, e como os valores de pKa da QTS e da sílica são próximos, embora um seja referente a protonação e o outro a deprotonação, seria esperado uma inflexão da curva de mobilidade em um pH próximo do pKa de cada um. Por isso é observado um perfil sigmoidal tanto para o capilar revestido com QTS reticulada com uma inflexão em pH cerca de 6,3, quanto para o capilar não revestido com uma inflexão em pH cerca de 6. Enquanto que no capilar revestido em pH abaixo de 5,0 a QTS está protonada caracterizando um EOF anódico, no capilar não revestido a sílica tem uma pequena ionização originando EOF catódico. A comparação dos valores de EOF determinados num capilar revestido com QTS e não revestido em pH acima de 7,0, evidencia que a menor intensidade do EOF observado no capilar revestido não ocorre em função da QTS da camada externa do revestimento (contato com o eletrólito), a qual nestes pH está neutra não contribuindo para as cargas da parede, mas sim em função da

quantidade remanescente de grupos silanóis ionizados da sílica que não interagiram com a QTS da camada interna do revestimento (primeira camada de QTS em contato com a sílica). Assim, em pH acima do valor do pKa da QTS, o polímero atua apenas como um redutor da densidade de cargas negativas dos grupos silanóis presentes na parede do capilar, justificando a diferença de EOF em relação ao capilar não revestido, o qual tem uma maior densidade de cargas negativas atribuídas aos silanóis ionizados que conferem a este um EOF catódico com valor acentuado. Com base nestas informações é possível estimar a porcentagem de substituição dos grupos silanóis após o revestimento com QTS reticulada comparando o valor da mobilidade do EOF de um capilar revestido e um capilar não revestido, em pH acima de 8,0. O valor de substituição determinado foi de $59,8 \pm 3,6$ % (média das porcentagens de substituição \pm desvio padrão), calculado considerando os valores de EOF dos pH 8,0; 8,5 e 9,0; de um capilar não revestido e de dois outros capilares revestidos com QTS reticulada. As mobilidades medidas ($n = 4$) em toda a faixa de pH para dois capilares apresentaram um CV de 1,7 a 70% com um valor médio de 15%. Os maiores desvios foram observados na região da inflexão da curva de mobilidade. Considerando somente as mobilidades medidas fora da região de inflexão (faixas de pH 2,4 - 4,7 e 7,6 - 9,55) o CV variou de 1,7 a 13% com uma média de 7%.

Na modificação com SAQQ somente lavando o capilar com solução polimérica, o comportamento observado para o EOF em função do pH foi um valor de mobilidade praticamente constante e anódico de pH 2,0 a 4,7; e a partir deste pH até pH 9,5 observou-se uma diminuição linear da intensidade do EOF com o aumento do pH, mas ainda assim mantendo-se anódico. Da mesma forma que observado no revestimento com QTS reticulada a presença de grupos amino protonados e também de grupos amino quaternizados na cadeia do SAQQ fazem com que a densidade de carga na parede seja positiva resultando em um EOF anódico. Em pH mais elevados, acima de 5,5, a densidade de cargas da superfície do capilar começa a ter influência dos silanóis remanescentes que não interagiram com SAQQ e também começa a ocorrer a deprotonação dos grupos amino que provocam uma diminuição das cargas positivas da parede. Entretanto, no caso desta modificação a densidade de cargas em pH alcalino ainda é positiva mantendo o EOF anódico em toda a faixa de pH. Os valores de CV para as mobilidade

medidas ($n = 4$) em toda a faixa de pH realizada em dois capilares variaram de 2 a 10% com valor médio de 7,5%.

Para a modificação com SAQQ reticulado, da mesma forma que para a QTS reticulada, foi observado um perfil sigmoidal da mobilidade do EOF em função do pH, inclusive com valores de mobilidade muito semelhantes aos da QTS reticulada. A curva de mobilidade do EOF *versus* pH da SAQQ reticulado indicou um comportamento de cargas da parede muito semelhante ao da QTS reticulada, sugerindo que apesar da introdução do grupo quaternário na cadeia da QTS originando o SAQQ a sua interação com a parede do capilar de sílica e as cargas resultantes dessa interação não foram alteradas significativamente. A diferença desta modificação em relação ao uso do SAQQ somente lavando é que a reticulação com GLU pode ter gerado uma conformação das cadeias do polímero na parede de forma que a camada polimérica de SAQQ reticulado resultasse em um perfil de densidade de cargas similar a QTS reticulada, especialmente em pH acima de 5. As mobilidades medidas ($n = 4$) em toda a faixa de pH para dois capilares apresentaram um CV de 5,4 a 47% com um valor médio de 16%. Da mesma forma que para o revestimento com QTS reticulada, os maiores desvios foram observados na região da inflexão da curva de mobilidade. Considerando somente as mobilidades medidas fora da região de inflexão (faixas de pH 2,1 - 4,7 e 7,4 - 9,55), o CV variou de 5,4 a 22% com uma média de 9,7%.

A variação do EOF em função do pH obtida para o novo revestimento com SAQQ reticulado e κ -carragena mostrou um EOF catódico praticamente constante, em torno de $30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ao longo de toda a faixa de pH estudada. Este perfil obtido é bem diferente do capilar de sílica fundida não modificado que apresenta um EOF também catódico, porém com perfil sigmoidal. Assim, o grande diferencial observado do novo capilar modificado foi o EOF catódico com alta intensidade na faixa de pH 2,0 a 4,5. Isso ocorre devido a κ -carragena apresentar grupos sulfatos em sua estrutura que tem um pK_a cerca de 2 (GU; DECKER; MCCLEMENTS, 2005), os quais conferem ao polímero uma densidade de cargas negativas na parede constante em toda a faixa de pH, inclusive em pH baixo. A fixação da κ -carragena na parede do capilar ocorre por intermédio da interação dos grupos sulfatos desse polímero aniônico com os grupos catiônicos da SAQQ previamente adsorvida na sílica. Além disso, estes grupos sulfatos da κ -carragena introduzida na parede do capilar contribuem para o caráter

aniônico do novo revestimento formado. Uma possível explicação para o comportamento de EOF catódico constante com a intensidade observada em toda a faixa de pH pode ser devido a densidade negativa de cargas resultante na parede relativas a camada de κ -carragena depositada sobre a camada de SAQQ, não havendo uma contribuição significativa das cargas dos grupos silanóis residuais. Essa observação do não aumento do EOF em pH alcalinos como resultado da contribuição dos grupos silanóis pode estar relacionada com a interação destes grupos, não substituídos pelo SAQQ, com a κ -carragena, tornando o EOF dependente apenas das propriedades do polímero aniônico. Um experimento para verificar este efeito foi realizado usando um capilar de sílica que foi lavado com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} 20 min, H_2O deionizada 20 min, 5 min com κ -carragena 0,1%, mantido em contato estático por 5 min e lavado com eletrólito pH 3 (fosfato, força iônica 22 mmol L^{-1}) por 3 min. A mobilidade do EOF medido foi de cerca de $10 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Isso mostra que existe certa interação da κ -carragena com a sílica da parede, provavelmente por ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila presentes na cadeia do polímero e os grupos silanóis da sílica. Uma hipótese é a de que este comportamento observado justifique a não alteração do EOF em pH elevado, pois os grupos silanóis remanescentes da formação da camada positiva com SAQQ reticulado interagem com a κ -carragena, e assim o EOF medido é resultante da densidade de cargas deste polímero aniônico presente na parede do capilar. Os valores de CV para as mobilidade medidas ($n = 4$) em toda a faixa de pH realizada em dois capilares revestidos com SAQQ reticulado e κ -carragena variou de 6,7 a 11% com valor médio de 8,7%.

1.4.3.3. Estabilidade química dos revestimentos

A estabilidade química dos revestimentos propostos foi investigada usando diferentes soluções e solventes. O EOF foi medido antes e depois da lavagem do capilar revestido com solução teste e a estabilidade química foi avaliada em termos de razão de alteração do EOF. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.2.

Para o revestimento com QTS reticulada todas as soluções usadas no teste da estabilidade química desse revestimento por lavagens

do capilar provocaram uma alteração do EOF menor que 3,0%, exceto para a solução de hidróxido de sódio na qual o EOF variou cerca de 15%. O percentual de alteração do revestimento com QTS reticulada frente a solução de hidróxido de sódio pode ser atribuído a possível deprotonação parcial de grupos amino presentes na QTS ancorada na superfície do capilar e a remoção algumas cadeias de polímero da parede que possivelmente não estariam reticuladas. Entretanto, esse valor de alteração pode ser considerado satisfatório uma vez que se fosse usado somente QTS, sem a reticulação com GLU, o revestimento todo seria degradado devido a deprotonação da QTS no pH elevado com a solução de hidróxido de sódio.

Com relação aos revestimentos usando SAQQ somente lavando capilar com solução polimérica e SAQQ reticulado, os resultados de estabilidade química obtidos foram satisfatórios. A razão de alteração obtida para os dois tipos de revestimento empregando todas as soluções teste variaram de -5,4 a 4,9%. A presença dos grupos amino quaternário na cadeia do SAQQ pode ter contribuído para estes bons resultados de estabilidade química observados. Esses grupos quaternários conferem uma densidade de carga positiva constante na cadeia do SAQQ que auxiliam na fixação do polímero na superfície do capilar independentemente do pH do meio.

Quanto ao revestimento com SAQQ reticulado e κ -carragena, este mostrou uma boa estabilidade após a lavagem do capilar com as soluções ácidas testadas e também com os solventes orgânicos, com uma porcentagem de alteração menor ou igual a 5%. Com solução de uréia 5 mol L^{-1} , a degradação do revestimento foi mais expressiva que as anteriores. Entretanto, com hidróxido de sódio a razão de alteração foi a maior de todas as soluções testadas ocorrendo a inversão do EOF após a lavagem do capilar com esta solução. Isso representa a remoção da κ -carragena da superfície do capilar. Esse efeito pode ser resultado de diferentes fatores. Com o elevado valor de pH dessa solução, cerca de 13, ocorre a deprotonação dos grupos amino da cadeia polimérica do SAQQ (no SAQQ cerca de 45% são grupos amino) que estavam interagindo por atração eletrostática com a κ -carragena, ao mesmo tempo a ionização dos silanos residuais (aqueles que não interagem com o SAQQ) fica máxima surgindo cargas residuais negativas na parede o que provoca repulsão eletrostática da κ -carragena. Com isso, a atração eletrostática dos grupos amino quaternário não é suficiente para

manter a κ -carragena fixa na superfície do capilar ocorrendo a remoção da última camada de polímero aniônico. Entretanto, após a lavagem do capilar com uma solução ácida (15 volumes de lavagem do capilar com solução pH 3), seguida da repetição da última etapa do procedimento de modificação do capilar, lavagem com solução de κ -carragena, ocorre a reconstrução da camada de κ -carragena refazendo o revestimento. A lavagem com solução ácida é feita para novamente protonar os grupos amino da camada de SAQQ reticulado, os quais contribuem para as cargas positivas da parede que irão interagir com a κ -carragena.

Tabela 1.2 Resultados da estabilidade química dos vestimentos construídos nos capilares de sílica fundida.

Solução	QTS reticulada (EOF ^a ; EOF ^b) (alteração)	SAQQ somente lavando (EOF ^a ; EOF ^b) (alteração)	SAQQ reticulado (EOF ^a ; EOF ^b) (alteração)	SAQQ reticulado e κ-carragena (EOF ^a ; EOF ^b) (alteração)
ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹	-31,4 ; -30,5 (-2,2%)	-31,3 ; -29,6 (-5,4%)	-32,8 ; -33,0 (0,61%)	26,7 ; 25,3 (-5,2%)
hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹	-31,0 ; -26,5 (-14,5%)	-30,7 ; -30,4 (-1,0%)	-33,4 ; -33,3 (0,30%)	27,6 ; -26,1 (-195%)
ácido acético 0,1 mol L⁻¹	-31,1 ; -30,6 (-1,6%)	-31,0 ; -30,5 (-1,6%)	-32,1 ; -30,7 (4,4%)	27,9 ; 26,9 (-3,6%)
acetonitrila	-31,3 ; -32,1 (2,6%)	-30,8 ; -31,7 (2,9%)	-33,4 ; -32,1 (3,9%)	27,2 ; 26,4 (-2,9%)
etanol	-29,6 ; -29,3 (-1,0%)	-29,8 ; -30,1 (1,1%)	-30,6 ; -31,7 (3,6%)	27,8 ; 27,1 (-2,5%)
uréia 5 mol L⁻¹	-31,3 ; -30,9 (-1,3%)	-31,2 ; -30,2 (-3,2%)	-32,7 ; -31,1 (4,9%)	28,7 ; 25,1 (-12,5%)

^a EOF ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) medido antes da lavagem do capilar com solução ou solvente.

^b EOF ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) medido após 100 volumes de lavagem do capilar com solução ou solvente.

^c Razão de alteração = $((\text{EOF}^b - \text{EOF}^a)/\text{EOF}^a) \times 100$. Condições experimentais: eletrólito Tris/HIBA, pH 3,3, força iônica cerca de 20 mmol L⁻¹, medidas do EOF usando método por pressão ($\pm 10 \text{ kV}/0,67 \text{ min}$), lavagem com eletrólito entre as medidas cerca de 50 volumes de lavagem do capilar.

1.4.3.4 Estabilidade dos revestimentos ao longo de várias corridas

Outro ponto importante a ser avaliado é a durabilidade do revestimento ao longo de várias corridas. Esse estudo foi realizado em dois eletrólitos com pH diferentes, um em pH 2,4 e outro em pH 8,9. As condições das corridas realizadas foram: lavagem do capilar durante 1 min entre corridas (equivalente a 5 volumes de lavagem) e aplicação de tensão de 25 kV por 2 min. Os resultados obtidos de medida da mobilidade do EOF ao longo de 150 corridas realizadas em cada pH para os revestimentos propostos estão apresentados na Figura 1.12.

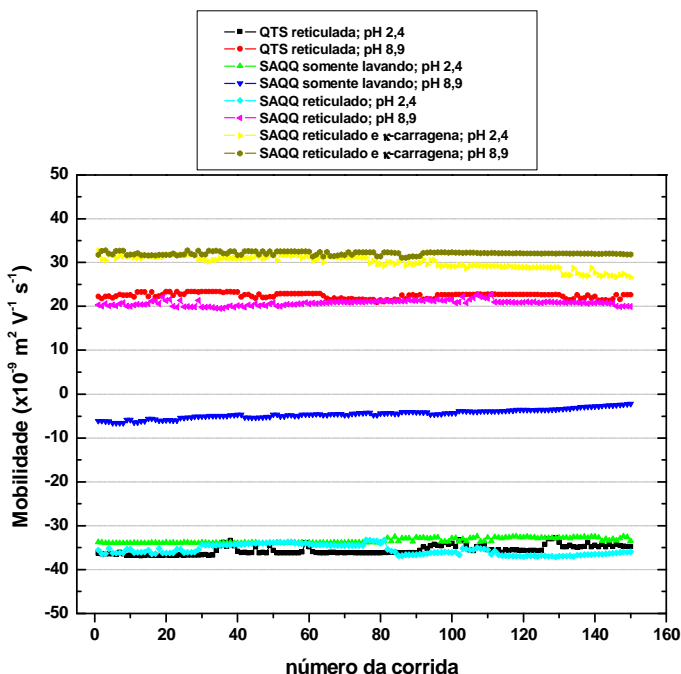


Figura 1.12 Estabilidade dos diferentes revestimentos construídos ao longo de 150 corridas realizadas em pH 2,4 e 8,9 (eletrólitos com força iônica cerca de 20 mmol L⁻¹). Corrida: lavagem do capilar com eletrólito entre corridas 1 min (equivalente a 5 volumes de capilar) e aplicação de 25 kV por 2 min.

Para a modificação usando QTS reticulada as medidas foram realizadas em dois capilares preparados igualmente, um usado com o eletrólito pH 2,4 e o outro com pH 8,9. Ao longo de todas as medidas feitas foi possível verificar algumas pequenas oscilações do EOF medido nos dois pH estudados. A mobilidade média do EOF em pH 2,4 foi de $-35,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 2,8%) e para o pH 8,9 foi $22,4 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 2,7%).

Para o revestimento com SAQQ somente lavando o capilar com solução polimérica os experimentos foram realizados no mesmo capilar, somente recondicionando-o um única vez antes do início da sequência de medidas em cada pH empregado. O comportamento do EOF medido ao longo das corridas foi mais estável no eletrólito pH 2,4 que no pH 8,9. Os valores de mobilidade médios do EOF determinados para o pH 2,4 e 8,9 foram $-33,4 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 1,7%) e $-3,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 29%), respectivamente. O elevado valor de CV para o eletrólito do pH 8,9 ocorreu devido à variação significativa do EOF ao longo das corridas o qual na primeira corrida foi de $-5,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e na corrida número 150 foi de $-1,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Entretanto, apesar da variação, o EOF ainda permaneceu anódico ao longo das corridas. Além disso, dependendo da aplicação desta modificação a mudança do EOF observada talvez não comprometesse uma separação, devido justamente a baixa intensidade do EOF medido que iria interferir pouco em uma separação usando essa condição.

Para a modificação com SAQQ reticulado os ensaios foram realizados em dois capilares revestidos exatamente da mesma forma, um para pH 2,4 e outro para o pH 8,9. Os resultados obtidos foram bem semelhantes aos do revestimento com QTS reticulada. Foram observadas algumas pequenas variações do EOF em ambos pH dos eletrólitos usados nas corridas. A mobilidade média do EOF em pH 2,4 foi $-35,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 3,1%) e em pH 8,9 foi $20,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CV = 2,9%).

Para o revestimento com SAQQ reticulado e κ -carragena após o término das 150 corridas em pH 2,4 o capilar foi recondicionado apenas com solução ácida (pH 3) seguida da repetição da última etapa do procedimento de modificação do capilar usando κ -carragena, tornado-o pronto para as posteriores medidas do EOF no pH 8,9. Foi possível observar que no pH 2,4 o EOF permaneceu estável em torno de $30,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ao longo de 130 corridas, e depois apresentou uma leve

diminuição para $27 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mantendo esse valor até o fim das corridas. Enquanto isso, no pH 8,94 o EOF se manteve praticamente constante, em torno de $32 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ao longo de todas as corridas. O CV de todos os valores de EOF foi menor que 5% para o pH 2,4 e menor que 1,5% para o pH 8,94, mostrando uma boa estabilidade do EOF para o revestimento.

De maneira geral todos os revestimentos propostos apresentaram um bom desempenho de estabilidade ao longo das 150 corridas realizadas em dois pH extremos (pH 2,4 e 8,9), mantendo um valor de EOF relativamente estável. Isso é mais um indicativo reforçando que os revestimentos apresentam potencial para serem empregados no desenvolvimento de métodos de separação por CE mantendo suas características ao longo de várias corridas.

1.4.3.5 Procedimento para reconstrução dos diferentes revestimentos

A reconstrução dos revestimentos propostos nos capilares de sílica fundida foi avaliada. Para o condicionamento do capilar revestido com QTS reticulada foram testadas como soluções removedoras da camada polimérica hidróxido de sódio e ácido clorídrico na concentração 1 mol L^{-1} . A remoção do recobrimento é uma etapa importante para contribuir com a reprodutibilidade da formação de uma nova camada polimérica mantendo as características do revestimento. A verificação da melhor solução removedora do revestimento de QTS reticulada foi realizada medindo a mobilidade do EOF em função de diferentes volumes de lavagem do capilar com cada solução removedora. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.13.

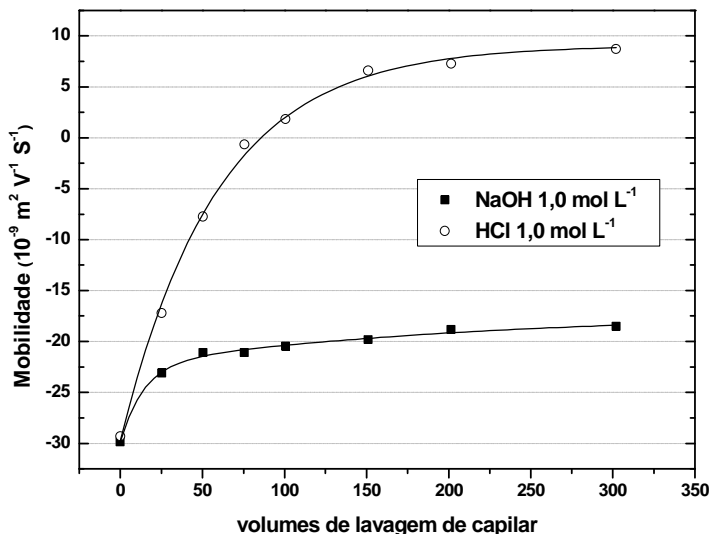


Figura 1.13 Variação da mobilidade do EOF em função do volume de lavagem do capilar com solução removedora, hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹ ou ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, para remover o revestimento com QTS reticulada. Eletrólito usado tampão fosfato pH 2,85; força iônica 22,4 mmol L⁻¹; acetona como marcador neutro e medida do EOF por pressão. Antes de cada medida de mobilidade do EOF o capilar foi lavado com água 25 volumes de capilar e com eletrólito 25 volumes.

É possível observar que os valores de mobilidade de EOF medidos no eletrólito pH 2,85 foram diminuindo de intensidade com o aumento do número de lavagens do capilar, tanto para a solução de hidróxido de sódio quanto para ácido clorídrico, até atingir um nível constante de mobilidade. Entretanto, com a solução de ácido clorídrico essa diminuição foi muito mais acentuada chegando ao ponto de reverter um EOF anódico em um EOF catódico a partir de cerca de 100 volumes de lavagens de capilar. Isso indica a remoção do revestimento de QTS reticulada da parede do capilar. O efeito obtido das soluções de

hidróxido de sódio e ácido clorídrico sobre o EOF do revestimento de QTS reticulada foi diferente do observado no estudo de estabilidade química. Essa diferença pode ser devido a concentração dez vezes maior dessas soluções nesse estudo de reconstrução dos revestimentos. Uma possível explicação do efeito provocado pelo ácido clorídrico é sua atuação protonando os silanois da sílica que repelem por repulsão eletrostática a camada polimérica de QTS reticulada. Assim, a solução de ácido clorídrico 1 mol L^{-1} foi empregada como solução removedora da camada de QTS reticulada usando 100 volumes de lavagem. Para auxiliar nesse processo de remoção da camada polimérica além da lavagem do capilar a solução de ácido clorídrico foi mantida em contato estático com a superfície interna do capilar por 20 min. Depois desta etapa de remoção da camada polimérica foi realizado novamente o procedimento de revestimento do capilar conforme descrito na parte experimental para formação do novo revestimento de QTS reticulada, usando hidróxido de sódio, água deionizada, QTS e GLU. O novo revestimento apresentou EOF característico semelhante ao EOF do revestimento anterior indicando a possibilidade de reconstrução da modificação.

A reconstrução do revestimento com SAQQ reticulado foi feita utilizando o mesmo procedimento de remoção da camada polimérica realizada para o revestimento com QTS reticulada. Posteriormente a remoção da camada de SAQQ reticulado com ácido clorídrico 1 mol L^{-1} procedeu-se com o procedimento para formação do novo revestimento de SAQQ reticulado como descrito na parte experimental. Da mesma forma que o capilar reconicionado com QTS reticulada, também o capilar de SAQQ reticulado reconstruído apresentou EOF próximo do valor do revestimento anterior no mesmo capilar.

Para o recondicionamento do capilar revestido com SAQQ somente lavando o capilar com solução polimérica bastou repetir todas as etapas do procedimento de revestimento para esta modificação desde o início.

O recondicionamento do revestimento de SAQQ reticulado e κ -carragena foi realizado em duas etapas. Inicialmente o revestimento de SAQQ reticulado foi reconstruído conforme descrito neste mesmo ítem refazendo a camada catiônica na parede. Posteriormente, o capilar foi lavado com solução de κ -carragena reconstruindo a camada aniônica no revestimento do capilar (última etapa do revestimento de SAQQ

reticulado e κ -carragena). Quando o capilar com este revestimento foi usado dias seguidos (3 dias) ou guardado por alguns dias (~7 dias) somente foi necessário renovar a camada aniônica lavando antes o capilar com eletrólito pH 3, para protonar o SAQQ da parede, e posteriormente lavando com solução de κ -carragena obtendo-se o capilar renovado.

1.5 CONCLUSÕES

A síntese do SAQQ foi realizada e o grau de substituição dos grupos amino por grupos quaternários determinado por titulação potenciométrica foi cerca de 55%. As análises de EDX permitiram identificar elementos característicos da estrutura dos polímeros envolvidos em cada modificação realizada indicando a formação do revestimento na parede do capilar. Foram construídos revestimentos de capilares de sílica por simples lavagens do capilar com solução usando QTS, SAQQ, GLU e κ -carragena, nos quais se observaram diferentes perfis de mobilidade de EOF em função do pH com intensidades características. Para os capilares revestidos com QTS reticulada e SAQQ reticulado o comportamento do EOF *versus* pH foi anódico em pH abaixo de 6,0 e catódico em pH acima de 7,0. Enquanto o perfil de mobilidade do EOF para o capilar revestido somente por lavagem com solução de SAQQ foi anódico em toda a faixa de pH estudada, com intensidades maiores em pH abaixo de 5,0. Já para o revestimento com SAQQ reticulado e κ -carragena as mobilidades do EOF foram praticamente constantes e independentes do pH do eletrólito, apresentando um EOF catódico, com o grande diferencial de uma elevada intensidade em pH abaixo de 5,0. De maneira geral, a reprodutibilidade de preparação dos diferentes revestimentos realizada em dois capilares e avaliada através de medidas das mobilidades do EOF em diversos pH nas regiões fora de inflexão apresentou um CV médio menor que 10%. Os revestimentos propostos apresentaram uma boa estabilidade química frente a diferentes soluções, exceto no caso da SAQQ reticulado e κ -carragena que com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ teve a camada de polímero aniônico removida. Entretanto, a reconstrução desse revestimento foi alcançada apenas lavando o capilar com solução ácida e depois repetindo a última etapa do preparo desta modificação com κ -carragena. Os revestimentos foram submetidos a um teste de desempenho por realização de várias corridas em pH 2,4 e 8,9, sendo que todos mostraram bons resultados de estabilidade do EOF medido ao longo de 150 corridas. Por fim, foi verificado um procedimento para reconstrução dos revestimentos que mostrou a possibilidade de reutilização dos capilares para novamente formar cada revestimento. A simplicidade das modificações propostas aliada a

versatilidade de preparo destas modificações gerando perfis de mobilidade de EOF distintos, permite explorar as características de cada revestimento obtido no desenvolvimento de métodos por CE, trazendo vantagens a estes métodos, seja no desenvolvimento de métodos rápidos de separação, seja usando o revestimento como uma camada protetora da superfície do capilar, ou de ambos.

REFERÊNCIAS

- ALBARGHOUTH, M. N.; STEIN, T. M.; BARRON, A. E. Poly-N-hydroxyethylacrylamide as a novel, adsorbed coating for protein separation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 1166-1175, 2003.
- BERSTAD, D. A.; KNAPSTAD, B.; LAMVIK, M.; SKJØLSVIK, P. A.; TØRKLEP, K.; ØYE, H. A. Accurate measurements of the viscosity of water in the temperature range 19.5 – 25.5 °C. *Physica A*, v. 151, p. 246-280, 1988.
- BUSCH, M. H. A.; KRAAK, J. C.; POPPE, H. Cellulose acetate-coated fused-silica capillaries for the separation of proteins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 695, p. 287-296, 1995.
- CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA JR., D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 167–180, 2009.
- CATAI, J. R.; TORAÑO, J. S.; JONGEN, P. M. J. M.; DE JONG, G. J.; SOMSEN, G. W. Analysis of recombinant human growth hormone by capillary electrophoresis with bilayer-coated capillaries using UV and MS detection. *Journal of Chromatography B*, v. 852, p. 160–166, 2007.
- CÓRDOVA, E.; GAO, J. M.; WHITESIDES, G. M. Noncovalent Polycationic Coatings for Capillaries in Capillary Electrophoresis of Proteins. *Analytical Chemistry*, v. 69, p. 1370-1379, 1997.
- DOHERTY, E. A. S.; MEAGHER, R. J.; ALBARGHOUTH, M. N.; BARRON, A. E. Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 24, p. 34-54, 2003.

ERIM, F. B.; CIFUENTES, A.; POPPE, H.; KRAAK, J. C. Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 708, p. 356-361, 1995.

GILGES, M.; KLEEMISS, M. H.; SCHOMBURG, G. Capillary Zone Electrophoresis Separations of Basic and Acidic Proteins Using Poly(vinyl alcohol) Coatings in Fused Silica Capillaries. *Analytical Chemistry*, v. 66, p. 2038-2046, 1994.

GU, Y. S.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of pH and carrageenan type on properties of b-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 83-91, 2005.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Progress in Polymer Science*, v. 30, p. 71-109, 2005.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology*, v. 38, p. 43-74, 2004.

HASELBERG, R.; DE JONG, G. J.; SOMSEN, G. W. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene-dextran sulfate-Polybrene-coated capillaries: System optimization and performance. *Analytica Chimica Acta*, v. 678, p. 128-134, 2010.

HUANG, X.; WANG, Q.; HUANG, B. Preparation and evaluation of stable coating for capillary electrophoresis using coupled chitosan as coated modifier. *Talanta*, v. 69, p. 463-468, 2006.

KILDEEVA, N. R.; PERMINOV, P. A.; VLADIMIROV, L. V.; NOVIKOV, V. V.; MIKHAILOV, S. N. About Mechanism of Chitosan Cross-Linking with Glutaraldehyde. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 35, p. 360-369, 2009.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000.

LAUER, H. H.; ROZING, G. P. (Ed.) **High Performance Capillary Electrophoresis**. 2nd ed. Germany: Agilent Technologies, Publication Number 5990-3777EN, 2009.

LUCY, C. A.; MACDONALD, A. M.; GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 81-105, 2008.

MA, M.; ZHANG, H-S; XIAO, L-Y; XIAO, L.; WANG, P.; CUI, H-R; WANG, H. Quaternary ammonium chitosan derivative dynamic coating for the separation of veterinary sulfonamide residues by CE with field-amplified sample injection. *Electrophoresis*, v. 28, p. 4091-4100, 2007.

MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol—Total analysis time reduction strategies. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7957-7961, 2009.

MONTEIRO JR., O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26 p. 119–128, 1999.

MOTEKAITIS, R. J.; MARTELL, A. E. BEST - A new program for rigorous calculation of equilibrium parameters of complex multicomponent systems. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 60, p. 2403-2409, 1982.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, p. 641–678, 2009.

QIN, C.; XIAO, Q.; LI, H.; FANG, M.; LIU, Y.; CHEN, X.; LI, Q. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 34, p. 121-126, 2004.

RAMAUTAR, R.; MAYBORODA, O. A.; DEELDER, A. M.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Metabolic analysis of body fluids by capillary electrophoresis using noncovalently coated capillaries. *Journal of Chromatography B*, v. 871, p. 370–374, 2008.

RAMAUTAR, R.; MAYBORODA, O. A.; DERKS, R. J. E.; VAN NIEUWKOOP, C.; VAN DISSEL, J. T.; SOMSEN, G. W.; DEELDER, A. M.; DE JONG, G. J. Capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry using noncovalently bilayer-coated capillaries for the analysis of amino acids in human urine. *Electrophoresis*, v. 29, p. 2714–2722, 2008.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Quimica Nova*, v. 30, p. 740-744, 2007.

SPINELLI, V. A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium(VI) ion. *Reactive & Functional Polymers*, v. 61, p. 347–352, 2004.

STEFANIAK, E. A.; WOROBIEC, A.; POTGIETER-VERMAAK, S.; ALSECZ, A.; TÖRÖK, S.; VAN GRIEKEN, R. Molecular and elemental characterisation of mineral particles by means of parallel micro-Raman spectrometry and Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Analysis. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 61, p. 824–830, 2006.

TSENG, W. L.; LIN, Y. W.; CHANG, H. T. Improved Separation of Microheterogeneities and Isoforms of Proteins by Capillary Electrophoresis Using Segmental Filling with SDS and PEO in the Background Electrolyte. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 4828-4834, 2002.

ULLSTEN, S.; SODERBERG, L.; FOLESTAD, S.; MARKIDES, K. E. Quaternary ammonium substituted agarose as surface coating for capillary electrophoresis. *Analyst*, v. 129, p. 410-415, 2004.

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 1174-1180, 1996.

YAO, Y. J.; LI, S. F. Y. Capillary zone electrophoresis of basic proteins with chitosan as a capillary modifier. *Journal of Chromatography A*, v. 663, p. 97-104, 1994.

CAPÍTULO 2 – CAPILAR MODIFICADO COM QUITOSANA RETICULADA PARA DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR ELETROFORESE CAPILAR USANDO INJEÇÕES MÚLTIPLAS: APLICAÇÃO NA ANÁLISE DE NITRATO E TIOCIANATO EM SALIVA HUMANA

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

Em matrizes biológicas podem ser separados e determinados por CE analitos de alta e baixa massa molar, quer estejam neutros ou carregados, como por exemplo, ânions e cátions inorgânicos, proteínas, drogas, fármacos, entre outros (JABEE *et al.*, 2006). Entretanto, análises em amostras biológicas por CE requerem certo cuidado, uma vez que muitas podem conter elevadas concentrações de sais e proteínas (CHEN *et al.*, 2008). Ambas as características podem causar problemas em uma análise por CE, sendo assim, a composição de uma amostra biológica é decisiva na determinação de qual abordagem analítica será tomada. Na maioria dos modos de CE, a separação ocorre em solução em um capilar de sílica fundida, e as interações entre os componentes da amostra e as paredes capilares são indesejáveis. As proteínas encontradas em muitas amostras biológicas podem se ligar fortemente a superfície de sílica do capilar sob condições de pH neutro ou moderadamente ácidas ou básicas. Essa adsorção manifesta-se na separação por mudanças no EOF, alargamento dos picos, que no caso da análise de proteínas pode dificultar a quantificação e pode também encobrir parte do eletroferograma, além de mudanças da linha de base (LOYD, 2008). Existe uma variedade de opções para prevenir a adsorção de proteínas, seja no preparo da amostra, por precipitação com solvente orgânico, ou com uso de capilares revestidos não covalentemente empregando surfactantes e polímeros adsorvidos fisicamente. No caso da determinação de anions inorgânicos em saliva por CE, apesar desse fluido biológico não apresentar uma quantidade de proteínas muito elevada, algumas medidas de prevenção contra adsorção de proteínas normalmente são adotadas como precipitação das proteínas com

acetonitrila (GLATZ; NOVÁKOVÁ; ŠTĚRBOVÁ, 2001), uso de hidróxido de sódio e dodecilsulfato de sódio no condicionamento entre corridas (GÁSPÁR; JUHÁSZ; BÁGYI, 2005), uso de hidroxipropilcelulose como aditivo no eletrólito (XU *et al.*, 2008), capilar tratado com sucessivas camadas de polímero iônico (TANAKA *et al.*, 2004). O revestimento não covalente dos capilares além de prevenir contra adsorção de proteínas apresenta as vantagens de ser normalmente um procedimento simples com boa estabilidade do EOF, e permitir a modificação e o controle do EOF possibilitando a simulação da separação em programas específicos o que elimina o consumo de reagentes nesta etapa. Adicionalmente, as análises podem ser mais rápidas devido à possibilidade da separação ocorrer no modo co-eletromótico. Outra característica que pode ser observada nestes sistemas é a necessidade de um pequeno tempo de condicionamento do capilar com eletrólito de corrida entre corridas o que é capaz de reduzir consideravelmente o tempo instrumental das análises (LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008).

Saliva é um fluido biológico produzido diariamente pelos seres humanos em quantidades que variam de 500 – 1500 mL, normalmente constituída de 98% de água e 2% de outras substâncias como compostos inorgânicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_3^{2-}); orgânicos (ácido úrico, bilirrubina, creatinina, glicose, colesterol, ácido linoléico, lactato); proteínas e enzimas (amilase, albumina, lisozima, transferrina) e hormônios (cortisol, testosterona, progesterona, estradiol) (CHIAPPIN *et al.*, 2007; HEFLIN; WALSH; BAGAJEWICZ, 2009). A saliva pode ser usada como matriz biológica para análise de diferentes substâncias seja para informar o uso ou estudar a liberação de fármacos (PERRETT; ROSS, 1995; ZAUGG; THORMANN, 2000; BOONE *et al.*, 1999), na identificação de drogas de abuso e, além disso, a análise de componentes da saliva pode ser usada em diagnóstico de doenças locais e sistêmicas (LOYD, 2008). Nesse último caso, a saliva constituindo-se em uma fonte alternativa de informações médicas pouco exploradas que podem aumentar a exatidão dos diagnósticos, poupando o paciente de alguns desconfortos associados a procedimentos invasivos como exame de sangue, por exemplo. Muitos biomarcadores ou substâncias usadas como indicadores do estado biológico podem ser facilmente encontrados na saliva (HEFLIN; WALSH; BAGAJEWICZ, 2009). Um exemplo conhecido do uso da saliva como bioindicador é a determinação de

nitrito que está relacionado com os níveis de estresse oxidativo e nitrosativo; e tiocianato que é um marcador da exposição em fumantes e não fumantes, resultado da desintoxicação do ácido cianídrico, presente na fumaça do cigarro, por uma enzima chamada rodanase ($\text{CN}^- \xrightarrow{\text{rodanase}} \text{SCN}^-$) (TANAKA *et al.*, 2004; GLATZ; NOVÁKOVÁ; SŤĚRBOVA, 2001).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

O propósito do presente estudo foi desenvolver um método simples e rápido por CE empregando o capilar revestido com QTS reticulada para análise de saliva humana determinando, na mesma corrida, as concentrações de nitrato e tiocianato e o volume de amostra coletado com *swab*.

2.2.2 Objetivos Específicos

- verificar o efeito de diferentes contra-íons da parede (ao mesmo tempo são co-íons componentes do eletrólito para separação de nitrato e tiocianato) no valor de EOF do capilar modificado com QTS reticulada;
- usar o valor de EOF característico da modificação no dado pH, para simular a separação de nitrato e tiocianato utilizando o *software PeakMaster* e selecionar as melhores condições de análise, bem como a escolha adequada das concentrações do co e contra-íon componentes do eletrólito de corrida;
- selecionar um padrão interno adequado para o método;
- verificar o efeito da força iônica do eletrólito de corrida;
- desenvolver um procedimento de coleta da saliva e otimizar o método de injeções múltiplas para corrigir o volume de amostra coletado;
- verificar a possibilidade de pré-concentração injetando diferentes volumes de amostra;
- comparar a separação proposta pelo método otimizado em um capilar revestido com QTS reticulada e um não revestido;
- avaliar o método de correção do volume de saliva coletado;
- realizar a avaliação do método proposto para quantificação de nitrato e tiocianato em saliva incluindo a determinação dos parâmetros: seletividade; limites de detecção e quantificação,

precisão instrumental, intra-ensaio e intermediária; resolução e número de pratos, entre outros;

- analisar amostras de saliva;
- comparar algumas características do método proposto com outros métodos descritos na literatura.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e soluções empregadas no revestimento do capilar com QTS reticulada estão descritos no Capítulo 2. Soluções estoque de ácido sulfúrico (20%, v/v) e Tris (60,4 mmol L⁻¹), reagentes adquiridos da Labsynth (Diadema, Brasil), foram utilizadas para preparar o eletrólito de corrida das análises de nitrato e tiocianato. As concentrações dos componentes do eletrólito otimizado foram Tris 12,0 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, em pH 2,5. Soluções padrão estoque (10 mmol L⁻¹) de nitrato, tiocianato e bromato, foram preparadas por dissolução em água deionizada dos respectivos sais de potássio ou de sódio, todos adquiridos da Labsynth (Diadema, Brasil). As soluções de calibração dos ânions foram preparadas por diluições apropriadas das soluções estoque. Água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), resistividade de 18,2 MΩ cm, foi usada na preparação de todas as soluções.

2.3.2 Preparo das amostras de saliva

Na Figura 2.1 está representado o procedimento usado no preparo das amostras de saliva. Amostras de saliva de voluntários fumantes e não fumantes foram coletadas usando *swab* com ponta de Rayon esterilizados por radiação gama, fabricados por Alamar Tecno Científica LTDA (Diadema, Brasil). Imediatamente após a coleta, o pedaço do *swab* contendo a amostra absorvida foi cuidadosamente cortado e imerso em 1,0 mL de uma solução de bromato de sódio 0,2 mmol L⁻¹ (bromato 25,6 mg L⁻¹, padrão interno) contida em um microtubo de 2,0 mL, agitado vigorosamente por 1,0 minuto e por fim centrifugado a 6000 rpm durante 10 min. Uma alíquota da solução centrifugada foi retirada e reservada para separação eletroforética.

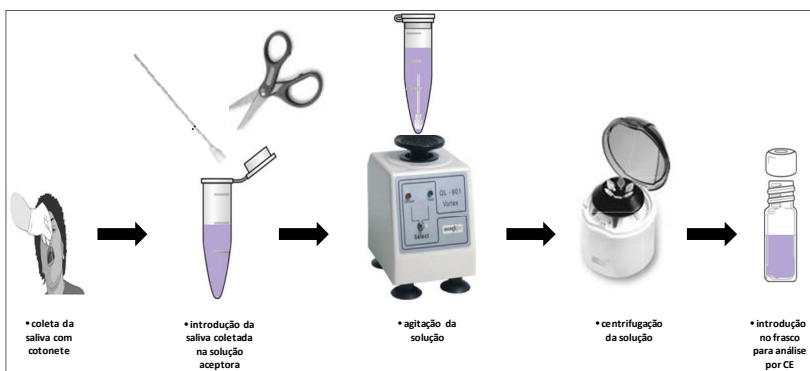


Figura 2.1 Esquema representando as etapas envolvidas na coleta e preparação da amostra de saliva.

2.3.3 Instrumentação e método analítico

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies modelo HP^{3D} CE (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas para determinação de nitrato e tiocianato foram realizadas em 200 nm, com temperatura controlada de 25°C em um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato proveniente da empresa Microtube (Araraquara, Brasil) apresentando 48,5 cm de comprimento total (8,5 cm até o detector) x 75 µm DI x 365 µm DE. O capilar foi tratado por revestimento dinâmico com QTS reticulada preparado como descrito anteriormente (ver parte experimental do Capítulo 1). As medidas do EOF para verificação do efeito dos diferentes componentes do eletrólito de corrida na modificação foram feitas de acordo com procedimento descrito anteriormente por Williams e Vigh (WILLIAMS; VIGH, 1996), usando acetona como marcador neutro. Antes da determinação de nitrato e tiocianato nas soluções padrão e nas amostras de saliva, o capilar foi lavado entre as corridas durante 30 s a uma pressão de 1,0 bar (lavagem equivalente a 2 volumes de capilar) com eletrólito de corrida Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹. Os padrões e as amostras foram introduzidos na parte mais curta do capilar até o detector e injetados por pressão

hidrodinâmica (40 mbar = 3997,0 Pa) com pressão negativa, de acordo com os seguintes passos: 40 mbar/4 s (padrão interno); 40 mbar/3 s (eletrólito); 40 mbar/4 s (amostra ou padrão); 40 mbar/3 s (eletrólito). A tensão de separação aplicada foi de 25 kV com polaridade negativa na injeção. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados utilizando o *software HP Chemstation*[®], rev A.06.01.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Seleção das condições experimentais de separação

2.4.1.1 Influência de diferentes contra-íons da parede no EOF do capilar revestido com QTS reticulada

No capilar revestido com QTS reticulada abaixo do pH 6,5 o co-íon componente do eletrólito de corrida que influencia na separação dos analitos nitrato e tiocianato, atua ao mesmo tempo como contra-íon da parede também influenciando no valor do EOF medido. A verificação dessa influência no EOF é importante, pois permite a simulação da separação de nitrato e tiocianato em condições mais próximas das condições reais usando o *software PeakMaster*. Os ânions que apresentam mobilidade próxima dos analitos, o que previne fenômenos de assimetria dos picos, e, portanto, tem potencial para serem escolhidos como co-íons componentes do eletrólito de corrida são cloreto, perclorato e sulfato, como mostra a Figura 2.2.

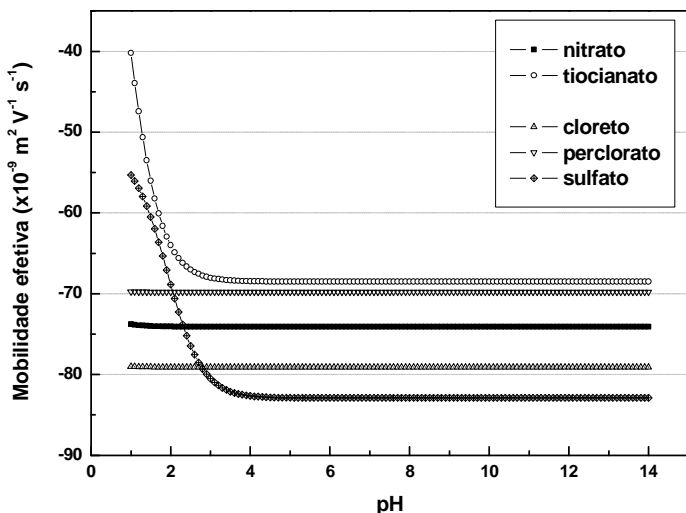


Figura 2.2 Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH dos analitos nitrato e tiocianato, e dos co-íons candidatos a compor o eletrólito de corrida cloreto, perclorato e sulfato, feitas utilizando o simulador Simul (MICKÉ, 2004).

Assim, se faz necessário medir o EOF com cada um desses ânions atuando como contra-íons da parede do capilar modificado. Os resultados demonstraram que a variação do co-íon altera consideravelmente o EOF, uma vez que com cloreto ($-3,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e perclorato ($-2,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a intensidade do EOF observado foi cerca de três vezes maior que com sulfato ($-1,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Uma possível explicação para este comportamento é que no pH 2,5 o ânion sulfato apresenta uma densidade de cargas maior que cloreto e perclorato, devido a dissociação quase total do segundo próton do ácido sulfúrico (pKa 1,92). Assim, o sulfato exerce um maior efeito de interação iônica com a QTS da parede que cloreto e perclorato, o que provoca a diminuição significativa da intensidade do EOF. Segundo CUI e co-autores, que fizeram um estudo do tipo de interação do sulfato com membranas de QTS, esse efeito representa uma reticulação iônica

da QTS pelos íons sulfato. Entretanto, neste mesmo estudo foi constatado que essa reticulação ocorre apenas com os íons sulfato localizados entre dois grupos NH_3^+ de cadeias vizinhas do polímero (CUI *et al.*, 2008).

2.4.1.2 Seleção das condições de separação usando o *software PeakMaster*

As características de um eletrólito de corrida adequado incluem uma boa capacidade tamponante e co-íon e contra-íon apropriados a fim de minimizar efeitos de assimetria dos picos. Além destes, outros parâmetros que influenciam na separação são facilmente obtidos pelo *software PeakMaster* (GAŠ *et al.*, 2001; ŠTĚDRÝ; JAROŠ; GAŠ, 2002; ŠTĚDRÝ; JAROŠ; VČELÁKOVÁ, 2003). Na simulação da separação deve ser considerado o uso de um detector de UV, sabendo que os analitos nitrato e tiocianato absorvem nessa região. Logo, os componentes do eletrólito de corrida não devem absorver, especialmente, no mesmo comprimento de onda dos analitos.

A simulação para a seleção do co-íon componente do eletrólito foi feita empregando Tris como contra-íon e testando três diferentes co-íons, cloreto, perclorato e sulfato, considerando o EOF característico de cada co-íon em um capilar tratado com QTS reticulada. Os resultados de alguns parâmetros da simulação com os três co-íons testados estão apresentados na Figura 2.3.

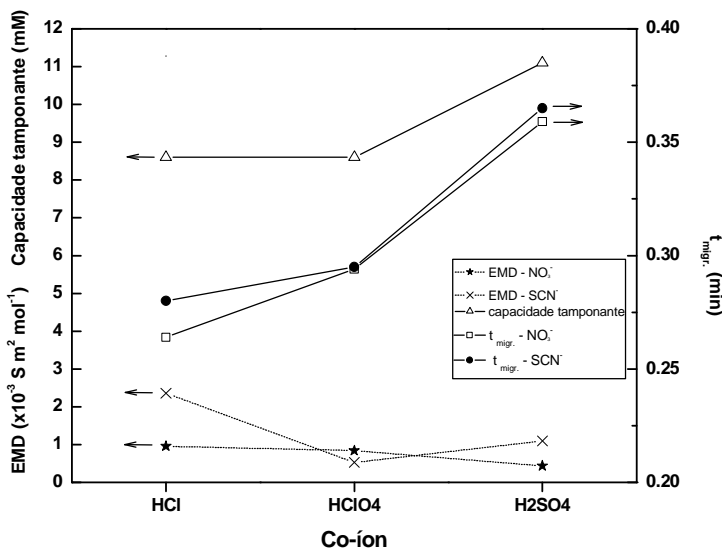


Figura 2.3 Dados da simulação da separação de nitrato e tiocianato para seleção do co-íon componente do eletrólito. Condições da simulação usando o *software PeakMaster*: comprimento total do capilar 48,5 cm; comprimento efetivo do capilar 8,5 cm; tensão de 25 kV; pH = 2,50; valores de t_{migr} considerando o EOF característico de cada co-íon. Valores de EOF usados na simulação: HCl ($-3,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$); HClO₄ ($-2,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$); H₂SO₄ ($-1,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo.

Os valores de EOF usados foram: $-3,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o cloreto; $-2,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o perclorato e $-1,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o sulfato. Foi possível observar que dos três co-íons testados na simulação o sulfato apresentou as melhores condições de separação dos analitos. Com o sulfato observou-se uma dispersão por eletromigração (EMD, do inglês “*Electromigration Dispersion*”) média semelhante a do perclorato e melhor que com cloreto, e a capacidade tamponante foi a maior dos três, em decorrência do pH do eletrólito na simulação ser cerca de 2,5, valor próximo do pKa do ácido sulfúrico. A diferença entre

os tempos de migração do nitrato e tiocianato usando sulfato como co-íon ($\Delta t = 0,006$ min) foi cerca de 2,6 vezes menor que com cloreto ($\Delta t = 0,0016$ min). Apesar disso, com sulfato como co-íon foi observada a melhor separação, especialmente devido aos baixos valores de EMD obtidos com este co-íon. Também o menor valor de EOF com sulfato contribuiu para uma melhor separação, uma vez que a migração dos analitos está ocorrendo no mesmo sentido do EOF, e com isso separações em tempos muito curtos com maiores valores de EMD favorecem a separação não efetiva dos analitos. Portanto, o sulfato foi escolhido para compor o eletrólito de corrida.

Na Figura 2.4 está ilustrada a simulação para a escolha das melhores condições de separação de nitrato e tiocianato utilizando Tris como contra-íon (concentração fixa em 10 mmol L^{-1}) e diferentes concentrações de sulfato.

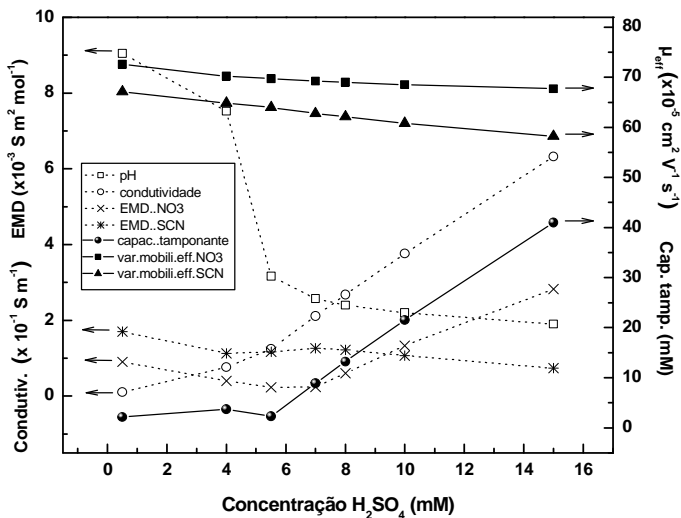


Figura 2.4 Dados da simulação da condições de separação de nitrato e tiocianato usando concentração fixa 10 mmol L⁻¹ de Tris e variando a concentração de sulfato como co-íon. Condições da simulação usando o *software PeakMaster*: ver Figura 2.3. Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo.

A análise do gráfico permitiu observar que a proporção Tris/sulfato que resultou em uma boa condição de separação foi 1,4:1,0 (v/v). Nesta composição selecionada, o pH da solução foi em torno de 2,5 com uma capacidade tamponante não muito baixa (~ 9,0 mmol L⁻¹), valor de condutividade adequado (~ 0,2 S m⁻¹), e principalmente uma EMD baixa (nitrato ~ 0,2 e tiocianato ~ 1,3 S m² mol⁻¹) para ambos os analitos. Assim, a concentração dos componentes do eletrólito Tris e ácido sulfúrico preparados para serem usados nas separações foi 12 mmol L⁻¹ e 8,5 mmol L⁻¹, respectivamente.

2.4.1.3 Escolha do padrão interno e força iônica do eletrólito de corrida

Com base na literatura (GLATZ; NOVÁKOVÁ; SĚRBOVA, 2001; TANAKA *et al.*, 2004; GÁSPÁR; JUHÁSZ; BÁGYI, 2005; XU *et al.*, 2008) os ânions presentes em amostras de saliva que possam ser detectados usando detecção direta por UV são brometo, iodeto, nitrato, nitrito, tiocianato e urato (ácido úrico). Entretanto, nas condições de separação selecionadas é possível detectar somente nitrato e tiocianato em um curto tempo de análise. Isso ocorre porque o urato (ácido úrico, $pK_{a1} = 5,4$ e $pK_{a2} = 10,3$) não está ionizado no pH do método proposto (pH = 2,5) e o nitrito (ácido nitroso, $pK_a = 3,22$) está muito pouco ionizado. Assim, o primeiro migra como espécie neutra e o segundo, parcialmente ionizado, migra em um tempo muito maior que nitrato e tiocianato, então o emprego do pH 2,5 aumenta a seletividade do método. Quanto ao brometo e iodeto, estes estão presentes na amostra em concentrações tão baixas que só seriam detectados se um método de pré-concentração fosse empregado. A escolha de um padrão interno apropriado para a separação foi feita com o auxílio do *software PeakMaster*. O ânion a ser selecionado como padrão interno deve apresentar as seguintes características: alta mobilidade efetiva no pH escolhido, absorver na região do UV, não reagir com os analitos e não estar presente na amostra. Um ânion que atende a todos esses requisitos é o bromato. Para comprovar experimentalmente estes fatos e confirmar a possibilidade de uso do padrão interno bromato selecionado sem interferências de outros picos, foi realizada uma corrida com uma amostra de saliva e comparada com um eletroferograma simulado, os quais estão apresentados na Figura 2.5. Os resultados mostram que no tempo de migração simulado para o bromato a linha de base do eletroferograma experimental está sem nenhum pico que possa provocar interferência no pico do padrão interno, logo, ele pode ser usado no método. Além disso, foi confirmado que dos ânions anteriormente detectados em amostras de saliva listados na literatura, somente o nitrato e tiocianato foram observados no eletroferograma experimental do presente método, mostrando a seletividade do método para estas espécies.

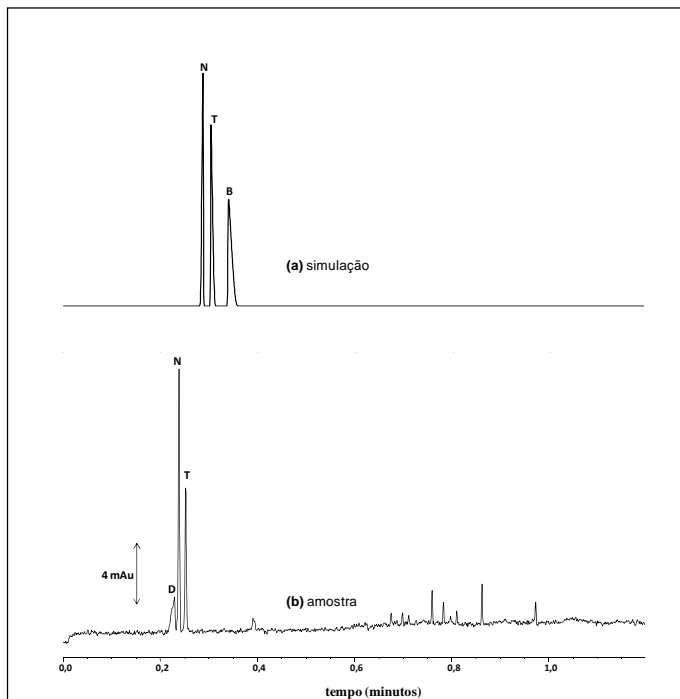


Figura 2.5 Electroferogramas: simulado (a) e de uma amostra de saliva diluída 10 vezes (b), usando o capilar modificado com QTS reticulada. Condições de separação: injeção -40 mbar/4s; tensão 30 kV; eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, pH 2,5; capilar 48,5 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), 75 μ m (DI), revestido com QTS reticulada. Na simulação foram usadas as mesmas condições experimentais e EOF $-11 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; D – desconhecido; B - bromato.

A seleção da tensão a ser empregada no método proposto foi feita levando em consideração a obtenção de uma separação com menor tempo possível sem interferências do aquecimento Joule. Essas interferências podem provocar a deformação dos picos e a sua comigração. A avaliação da existência do efeito Joule é testada verificando se a lei de Ohm é respeitada. A lei de Ohm é representada pela equação abaixo:

$$V_{apl} = R i \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde V_{apl} é a diferença de potencial elétrico ou tensão em volts, R a resistência elétrica e i é a intensidade da corrente elétrica medida em amperes. Uma boa correlação linear entre a corrente e a tensão para uma dada força iônica indica um efeito Joule minimizado. Para verificar a existência deste fenômeno foi observada a variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito de força iônica 23 mmol L⁻¹, selecionado na otimização usando o *software PeakMaster*, e também em soluções com outras forças iônicas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.6.

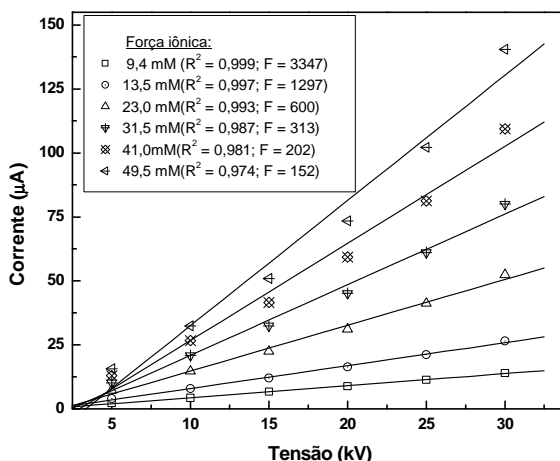


Figura 2.6 Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito Tris e ácido sulfúrico pH 2,50 em diferentes forças iônicas, demais condições ver Figura 2.5. Entre parêntesis estão os valores de coeficientes de determinação (R^2) e teste F.

No eletrólito de força iônica 23 mmol L⁻¹ foi observado um bom coeficiente de determinação ($R^2 = 0,993$) entre corrente e a tensão e o modelo linear mostrou ser significativo ($F = 600$), indicando que com esse eletrólito a lei de Ohm é obedecida. Quando a variação de tensão foi somente até 25 kV com a força iônica de 23 mmol L⁻¹ o coeficiente de determinação apresentou uma pequena melhora ($R^2 = 0,997$) e também aumentou a significância do modelo linear ($F = 1041$). Para os eletrólitos com força iônica maior que 23 mmol L⁻¹ foram observados coeficientes de determinação menores ou iguais a 0,987 evidenciando o desvio da lei de Ohm e com isso uma maior tendência a existência do efeito Joule. Enquanto isso, nos eletrólitos com força iônica menores que 23 mmol L⁻¹ foi verificada uma ótima relação linear da corrente e da tensão ($R^2 \geq 0,997$) permitindo o uso da tensão máxima de separação. Porém, para os eletrólitos de menor força iônica a capacidade tamponante foi cerca de 9 mmol L⁻¹, um pouco menor que o observado para o eletrólito com força iônica 23 mmol L⁻¹ que apresentou cerca de 11 mmol L⁻¹ de capacidade tamponante. Assim, tendo como compromisso uma capacidade tamponante boa e a máxima tensão possível para desenvolver um método rápido de separação sem tendência ao efeito joule, optou-se pelo uso do eletrólito de força iônica 23 mmol L⁻¹ com a tensão de separação de 25 kV, sendo esta a condição a ser empregada nos próximos experimentos. Outras informações importantes do efeito da tensão sobre os picos dos analitos no eletrólito de força iônica 23 mmol L⁻¹ selecionado estão apresentadas na Figura 7.

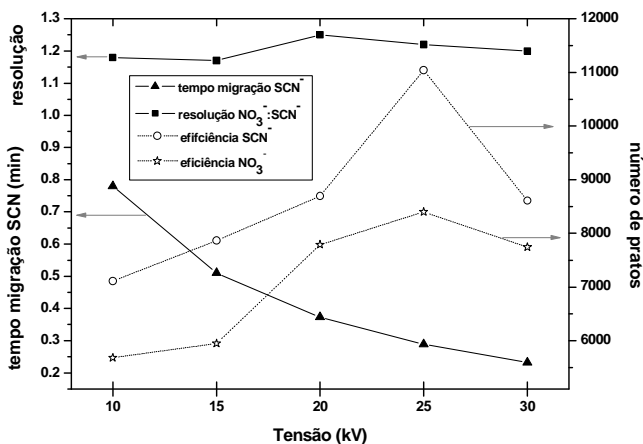


Figura 2.7 Parâmetros dos picos do nitrato e tiocianato para o eletrólito com força iônica 23 mmol L^{-1} em diferentes valores de tensão (concentração de nitrato e tiocianato cerca de 6 mg L^{-1} , demais condições ver Figura 2.5).

É possível observar que a resolução entre nitrato e tiocianato permanece praticamente constante com a variação de tensão. Quanto ao tempo de migração do tiocianato, tomado como referência, o mesmo diminui com o aumento da tensão até um valor mínimo em 30 kV. Porém, a diferença de tempo de migração do tiocianato usando 25 kV (0,29 min) e 30 kV (0,23 min) é menor que 4 s, não sendo significativa. Com relação as eficiências de separação dos picos dos analitos, ambos apresentaram um máximo em 25 kV, fato que confirma a escolha adequada desta tensão para o método.

2.4.1.4 Método para determinação do volume de saliva coletado e determinação de nitrato e tiocianato usando injeções múltiplas

Na Figura 2.8 está apresentado um método alternativo para coleta de saliva corrigindo o volume de amostra coletado e determinação de nitrato e tiocianato por CE.

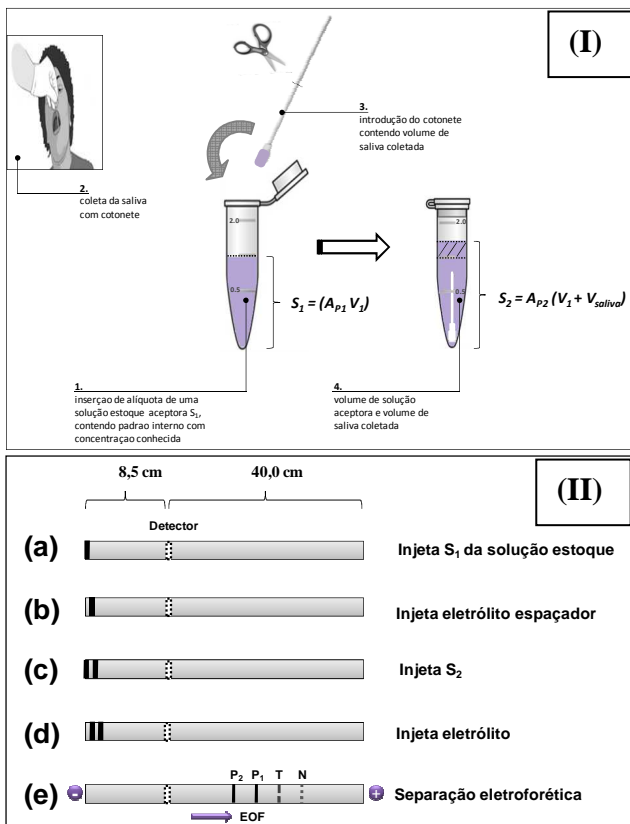


Figura 2.8 Esquema representando as etapas envolvidas no método de correção do volume de amostra de saliva coletada usando padrão interno e determinação de nitrato e tiocianato por eletroforese capilar. (I) procedimento de coleta da saliva e (II) etapas do método para determinar o volume de saliva coletada por CE. Legenda: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S_1 ; P₂ – bromato da solução S_2 .

A Figura 2.8 - (I) ilustra o modo de coleta de amostra de saliva. Inicialmente é preparada uma solução aceptora estoque (S_1) contendo uma determinada concentração do padrão interno, e em seguida é transferido um volume conhecido desta solução para um frasco com tampa. Neste frasco é introduzido um *swab* contendo um volume desconhecido de amostra de saliva coletada do voluntário originando uma segunda solução (S_2). Levando-se em consideração que a área do pico do padrão interno A_{P1} é proporcional a concentração do padrão interno e que a variação da área do padrão interno está diretamente relacionada a variação de volume da solução aceptora, tem-se que:

$$S_{1(n\ IS)} = S_{2(n\ IS)} \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde $S_{1(n\ IS)}$ é o número de mols do padrão interno na solução 1 e $S_{2(n\ IS)}$ é o número de mols do padrão interno na solução 2. Como $S_{1(n\ IS)} = A_{P1} V_1$ e $S_{2(n\ IS)} = A_{P2} V_2$, e $V_2 = (V_1 + V_{saliva})$, logo para o cálculo do volume de saliva coletada basta usar a seguinte equação:

$$A_{P1} V_1 = A_{P2} (V_1 + V_{saliva}) \quad (\text{Equação 2.3})$$

Rearranjando as equações acima descritas tem-se,

$$V_{saliva} = V_1 \left(\frac{A_{P1} - A_{P2}}{A_{P2}} \right) \quad (\text{Equação 2.4})$$

onde, V_{saliva} é o volume de saliva coletado; V_1 é o volume da alíquota retirada da solução aceptora estoque; A_{P1} é a área do padrão interno na solução aceptora estoque e A_{P2} é a área do padrão interno na solução aceptora contendo a amostra de saliva. Para a determinação das áreas do padrão interno A_{P1} e A_{P2} foi desenvolvido um método por CE que permitisse a aquisição destes dados em uma única corrida. Na Figura 2.8 -(II) está apresentada a sequência de passos do procedimento. Inicialmente é injetado no capilar um plugue da solução S_1 (a), em

seguida injeta o eletrólito espaçador (b), posteriormente injeta a solução S_2 (solução de padrão interno contendo um volume desconhecido de saliva) (c), injeta novamente eletrólito espaçador (d), e por fim aplica tensão para a separação eletroforética (e). O eletrólito injetado na última etapa tem por objetivo contribuir para bons resultados de repetibilidade. O eletroferograma obtido será constituído de quatro picos: 1- nitrato (N); 2- tiocianato (T); 3- padrão interno presente em S_1 (P1); 4- padrão interno da solução acceptora contendo a saliva coletada (P2). Variando-se o tempo de injeção do espaçador é possível determinar o tempo de migração do P1, de modo a que esse pico migre na posição desejada no eletroferograma obtendo-se uma resolução adequada deste pico em relação aos demais picos do eletroferograma. O cálculo do tempo de migração do P1 é realizado de acordo com a seguinte equação:

$$t_{P1} = \frac{L_{det} - L_{inj}}{\mu_{P1} E} \quad (\text{Equação 2.5})$$

sendo que,

$$L_{inj} = \frac{\Delta P t_{int} r^2}{8 L_{tot} \eta} \quad \text{e} \quad \mu_{P1} = (\mu_{eo} + \mu_{eff})$$

logo,

$$t_{P1} = \frac{L_{det} - \left(\frac{\Delta P t_{int} r^2}{8 L_{tot} \eta} \right)}{(\mu_{eo} + \mu_{eff}) E} \quad (\text{Equação 2.6})$$

onde t_{P1} e t_{int} são o tempo de migração do P1 e tempo total de aplicação de pressão durante a injeção de todos os plugues, respectivamente, em segundos; L_{det} , L_{inj} e L_{tot} , o comprimento do capilar até o detector, comprimento do plugue injetado e comprimento total do capilar, respectivamente, em metros; μ_{P1} , μ_{eo} e μ_{eff} , mobilidade aparente,

mobilidade do EOF e mobilidade efetiva do padrão interno, respectivamente, em $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$; E campo elétrico aplicado em V m^{-1} ; ΔP pressão de injeção em N m^{-2} ($1 \text{ mbar} = 99,92 \text{ N m}^{-2}$); η a viscosidade da solução a 25°C em N s m^{-2} .

2.4.1.5 Seleção das condições de injeção no desenvolvimento do método

No presente método foi escolhido realizar as injeções pelo comprimento menor do capilar até o detector utilizando uma pressão de injeção de 40 mbar injetando a solução estoque acceptora (S_1) e a amostra (S_2), conforme procedimento previamente descrito, durante 4 s. O modo de injeção escolhido teve como justificativa a obtenção de uma separação no menor tempo possível.

Utilizando as equações descritas no item 2.4.1.4 e um eletroferograma experimental dos padrões injetados pelo procedimento de injeções múltiplas proposto (Figura 2.9 - a), porém, injetando somente o plugue S_2 (4s) e usando 3s de eletrólito na última injeção (etapa d, Figura 2.8 - II), foi possível calcular e prever o tempo de migração do pico bromato referência P_1 no eletroferograma da amostra. Esta previsão foi realizada verificando o tempo em que o pico bromato referência P_1 deveria ser detectado para que migrasse separado dos demais picos sem comprometer a separação. Entre os picos do tiocianato e bromato P_2 da solução S_2 existe um espaço no qual o pico bromato referência P_1 pode ser inserido ($\sim 0,31 \text{ min}$). Para se obter um tempo de migração do bromato referência P_1 próximo do valor desejado, o tempo de eletrólito espaçador para a etapa “d” do procedimento de injeção foi fixado em 3 s e o tempo de eletrólito da etapa “b” foi estimado para se atingir a condição de interesse. Na Figura 2.9 - c está apresentado um eletroferograma de uma amostra de saliva coletada com *swab* no qual o tempo de migração do pico bromato referência P_1 foi calculado para $\mu_{eo} = -1,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ e $\mu_{eff} = -5,33 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ (dado retirado do software *PeakMaster*, considerando a força iônica do eletrólito - 23 mmol L^{-1}); $\eta = 8,9 \times 10^{-4} \text{ N s m}^{-2}$ (BERSTAD *et al.*, 1988); demais condições na seção experimental. Assim, o t_{PJ} calculado para $t_{int} = 14 \text{ s}$, devido à sequência de plugues injetados (4s - injeta S_1 ; 3s - injeta espaçador; 4s - injeta S_2 ; 3s - injeta espaçador), foi de 18,8 s o que

corresponde a 0,313 min, valor este que está próximo do valor de tempo de migração do P_1 observado no eletroferograma da amostra (0,310 min; dado adquirido do *software HP Chemstation*[®], rev A.06.01). Sabendo-se o tempo de migração calculado do bromato referência e a largura de base dos picos dos ânions (dados do eletroferograma injetando somente o plugue S_2 e eletrólito – Figura 2.9 - a) também é possível prever a resolução do bromato P_1 em relação ao tiocianato e ao bromato P_2 , uma vez que a largura de base do pico do bromato P_1 e P_2 será muito semelhante. As resoluções previstas para as combinações T: P_1 e P_1 : P_2 foram 0,92 (0,67 – 1,2; considerando o valor do desvio do EOF, $1,1 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, no cálculo) e 1,1 (0,87 – 1,3; considerando o valor do desvio do EOF, $1,1 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, no cálculo); enquanto as resoluções obtidas foram 0,83 e 1,3; respectivamente. É possível verificar também que os padrões se comportam de forma muito semelhante a amostra como mostrado na Figura 2.9 - b. Assim, as equações usadas permitem prever o tempo de migração do pico de interesse no método de injeções múltiplas de modo que ele seja detectado no eletroferograma experimental num tempo previamente determinado ou desejado, de acordo com a variação do tempo de introdução deste plugue.

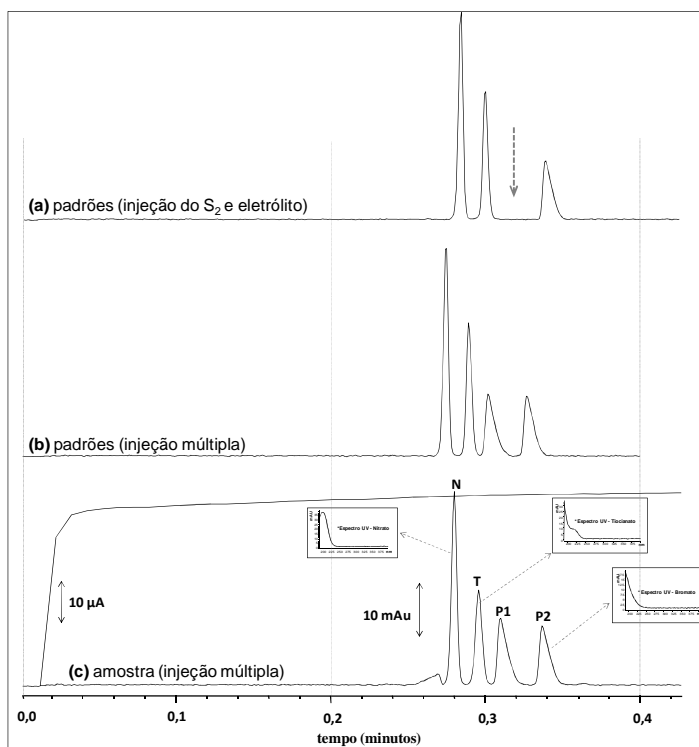


Figura 2.9 Electroferograma de uma solução padrão considerando a injeção dos pluguess S_2 e eletrólito (a); electroferograma de uma solução padrão (b) e electroferograma de uma amostra de saliva coletada com *swab* (c), injetando todos os pluguess pelo método proposto usando o capilar modificado com QTS reticulada. Eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, pH 2,5, força iônica 23 mmol L⁻¹. Condições de injeção: -40 mbar/4 s (S_1), -40 mbar/3 s (eletrólito), -40 mbar/4 s (S_2), -40 mbar/3 s (eletrólito); tensão + 25 kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min. Electroferogramas da solução padrão usando concentração de tiocianato 58 mg L⁻¹ e nitrate 62 mg L⁻¹. Solução acceptora S_1 contendo bromato 25,6 mg L⁻¹. Capilar de sílica fundida de 48,5 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 75 μm (DI). Legenda dos picos: N – nitrate; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S_1 ; P₂ – bromato da solução S_2 . Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm.

Para verificar a variação do tempo de migração do bromato da solução S_1 (P_1) foram realizados experimentos utilizando diferentes tempos de espaçador entre S_1 e S_2 , e os resultados estão apresentados na Figura 2.10.

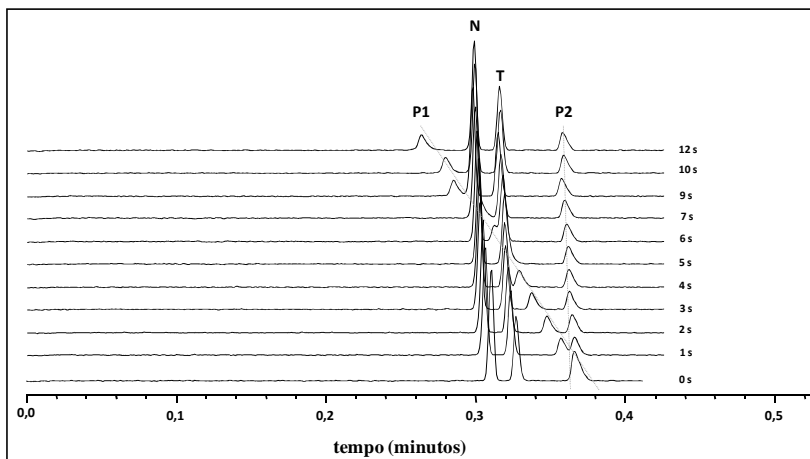


Figura 2.10 Eletroferogramas referentes a diferentes tempos de eletrólito espaçador injetados (entre S_1 e S_2), usando o capilar modificado com QTS reticulada. Condições de injeção: -40 mbar/4 s (S_1), -40 mbar/x s (eletrólito), -40 mbar/4 s (S_2); tensão + 25kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min; concentração de nitrato 6,20 mg L⁻¹, tiocianato 5,81 mg L⁻¹ e padrão interno bromato 12,8 mg L⁻¹. Capilar usado 48,5 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 75 μ m (DI), eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹ e ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹. Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S_1 ; P₂ – bromato da solução S_2 . Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm.

É possível observar que o P_1 migra entre o tiocianato e o P_2 com os tempos de eletrólito espaçador 2 - 4 s. Já com tempos de espaçador de 5 - 9 s o P_1 migra sob o nitrato e tiocianato. Enquanto isso, com tempo de espaçador 10 e 12s o P_1 migra antes de todos os picos dos ânions. Assim é possível mostrar experimentalmente as duas opções que podem ser usadas para o P_1 migrar entre os picos dos analitos sem prejudicar a separação. Uma com o P_1 migrando entre o tiocianato e o P_2 e a outra com P_1 migrando antes de todos os ânions. A primeira foi

calculada utilizando um sistema de equações mostrando uma boa previsão para o tempo de migração de P_1 desejado. Da mesma forma, se fosse de interesse que o P_1 migrasse antes dos analitos, o tempo de eletrólito espaçador também poderia ser previsto. Por fim, o procedimento de injeção selecionado para ser usado nos próximos experimentos foi: -40 mbar/4 s (S_1), -40 mbar/3 s (eletrólito espaçador), -40 mbar/4 s (S_2), -40 mbar/3 s (eletrólito).

2.4.1.6 Efeito do tempo de injeção no método proposto

O potencial de pré-concentração em linha do método proposto para a determinação dos ânions nitrato e tiocianato em amostras de saliva também foi avaliado. A pré-concentração de analitos carregados de uma amostra é provocada pelo movimento desses íons através de uma região limite que é formada entre a zona da amostra e a zona de separação dentro do capilar (PYELL, 2006; SIMPSON; QUIRINO; TERABE, 2008). A amostra é preparada em uma matriz com uma condutividade elétrica menor que a zona do eletrólito. Um longo plugue de amostra é injetado no capilar. Durante a aplicação de tensão, a baixa condutividade da zona da amostra sofre ação de um alto campo elétrico quando comparado com a região do eletrólito que deve apresentar uma alta condutividade e baixo campo elétrico. Assim, a velocidade eletroforética dos íons do analito na zona da amostra é então maior que na zona do eletrólito, pois a velocidade eletroforética definida como produto da mobilidade eletroforética efetiva do analito e a força do campo elétrico. A rápida mudança na velocidade dos íons dos analitos se movendo através da região limite entre a zona da amostra e a zona do eletrólito resulta no estreitamento da zona de migração do analito, isto é, um empilhamento dos íons devido a brusca mudança na velocidade eletroforética. Assim, as zonas resultantes dos analitos deveriam ter concentrações maiores das que a concentração original na amostra. O efeito de concentração obtido com esta técnica é dependente da razão entre a força do campo elétrico na zona da amostra e na zona do eletrólito (PYELL, 2006; SIMPSON; QUIRINO; TERABE, 2008). Na Figura 2.11 está apresentado um esquema que demonstra o efeito de empilhamento descrito.

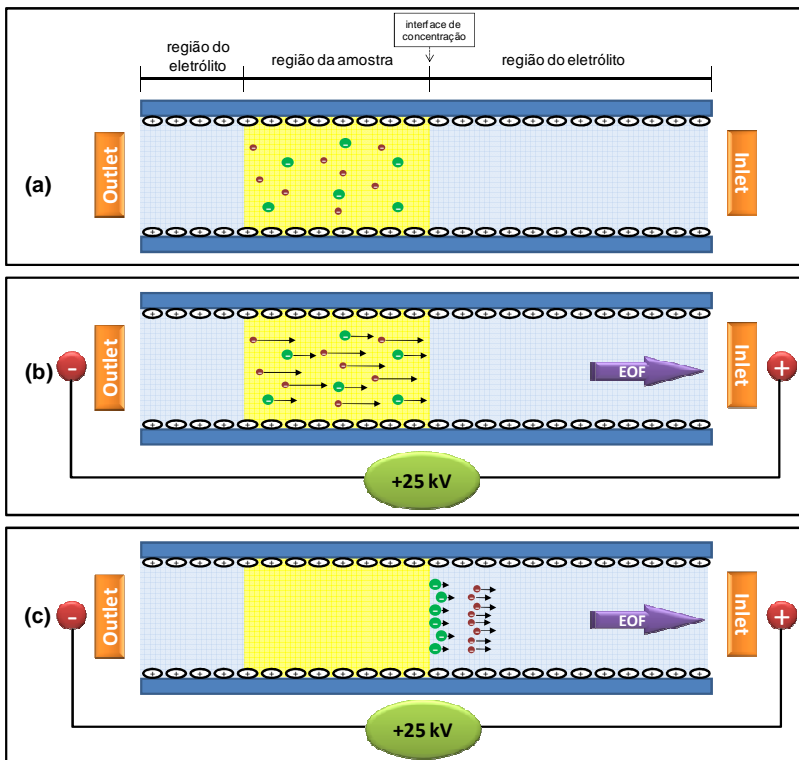


Figura 2.11 (a) Representa as regiões do eletrólito e da amostra no capilar as quais durante a aplicação de tensão tem diferentes campos elétricos; (b) migração dos íons na região da amostra imediatamente após a aplicação de tensão, e (c) migração dos íons na região do eletrólito.

A região da amostra que contém os íons do analito dispersos (região em amarelo) é uma solução de baixa condutividade elétrica (alta intensidade do campo elétrico) devido a alta quantidade de água e baixa quantidade de íons nessa região capazes de conduzir corrente elétrica (Figura 2.11 - a). Enquanto isso, a região do eletrólito (região azul) tem uma alta condutividade elétrica (baixa intensidade do campo elétrico), justamente devido a presença de quantidade razoável dos componentes do eletrólito (co-íon e contra-íon) que conduzem corrente elétrica. Essa diferença de condutividade, logo, de campo elétrico entre as duas regiões permite o surgimento do efeito de empilhamento dos íons promovendo um aumento no sinal obtido para cada analito. O empilhamento dos íons dos analitos dispersos no plugue da amostra decorre da sua migração mais rápida nessa região que na região do eletrólito (Figura 2.11 - b, setas indicando o grau de velocidade eletroforética das espécies). Imediatamente quando os analitos atingem essa região do eletrólito ocorre a diminuição da velocidade desses íons e conseqüentemente seu empilhamento em estreitas zonas de migração representada pelas duas linhas de íons separadas (Figura 2.11 - c).

A avaliação do potencial de pré-concentração do método proposto para a determinação de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva usando o capilar modificado com QTS reticulada foi realizada. A representação do tamanho dos plugues injetados, os eletroferogramas dos diferentes tempos de injeção, as correntes geradas durante aplicação de tensão para cada tempo de injeção, e a altura do pico e resolução nitrato:tiocianato em função do tempo de injeção, estão apresentados nas Figuras 2.12, 2.13, 2.14 e 2.15, respectivamente.

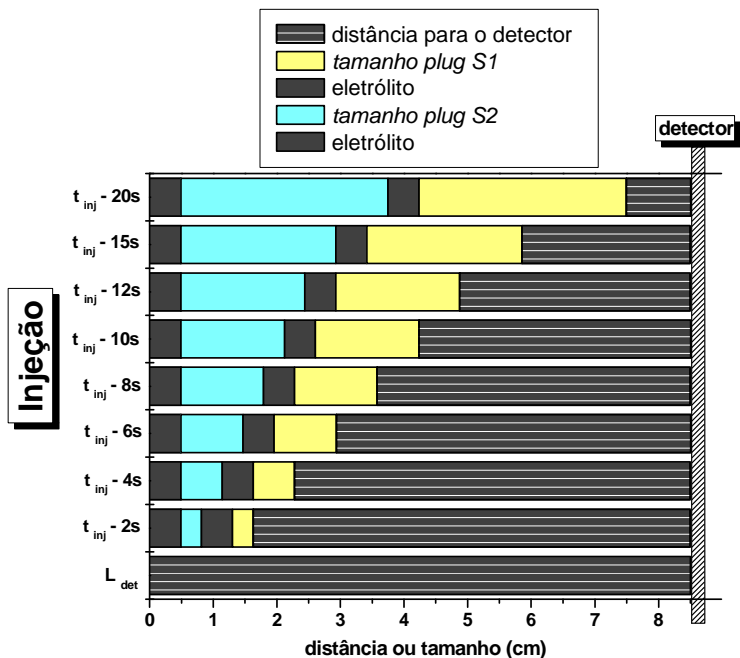


Figura 2.12 Representação do tamanho dos plugues injetados e da distância para o detector no estudo de pré-concentração do método proposto para a determinação de nitrato e tiocianato injetando pelo caminho mais curto do capilar até o detector.

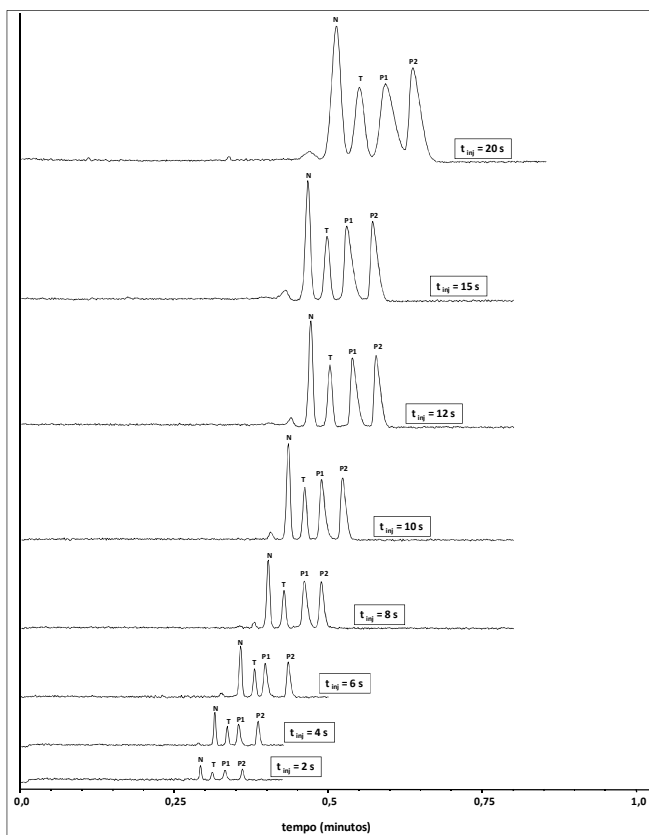


Figura 2.13 Eletroferogramas obtidos com diferentes tempos de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato e tiocianato usando o capilar modificado com QTS reticulada. Eletrólito Tris 12 mmol L⁻¹/ácido sulfúrico 8,5 mmol L⁻¹, pH 2,5, força iônica 23 mmol L⁻¹. Condições de injeção: -40 mbar/x s (*S*₁), -40 mbar/3 s (eletrólito), -40 mbar/x s (*S*₂), -40 mbar/3 s (eletrólito); tensão + 25kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito, 0,5 min; concentração de nitrato 0,620 mg L⁻¹, tiocianato 0,581 mg L⁻¹ e padrão interno bromato 5,12 mg L⁻¹. Capilar de sílica fundida de 48,5 cm (*L*_{tot}), 8,5 cm (*L*_{det}), e 75 μm (DI). Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução *S*₁; P₂ – bromato da solução *S*₂. Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm.

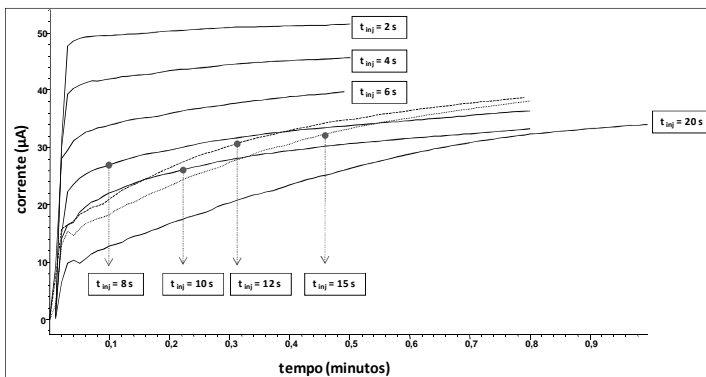


Figura 2.14 Correntes geradas durante aplicação de tensão para cada tempo de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato e tiocianato. Condições experimentais: ver Figura 2.13.

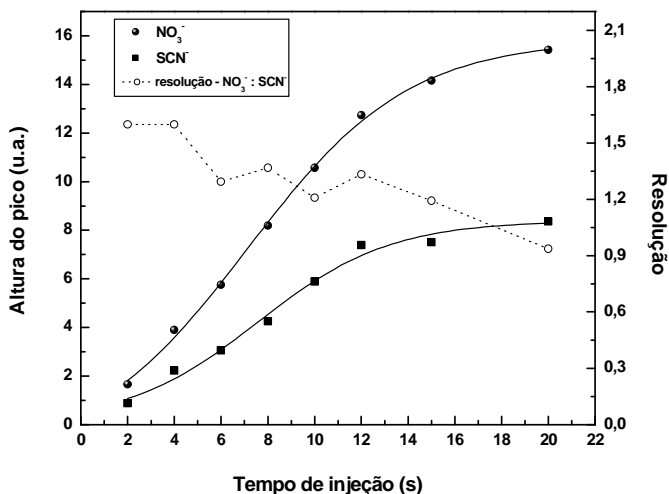


Figura 2.15 Altura do pico e resolução nitrato:tiocianato em função do tempo de injeção no estudo de pré-concentração do método proposto para determinação de nitrato e tiocianato. Condições experimentais: ver Figura 2.13.

A faixa de tempo de injeção hidrodinâmica do S_1 e do S_2 estudada (Figura 2.12) variou de 2 a 20 s. A distância dos plugues para o detector foi de 6,9 cm para o menor tempo de injeção usado e diminuiu com o tempo de injeção até atingir um mínimo de cerca de 1,0 cm com o maior tempo de injeção. Os perfis dos eletroferogramas obtidos (Figura 2.13) mostraram que os picos ficaram com boa separação, exceto para o tempo de 20 s de injeção. Também foi observado que o tempo de separação aumentou com o aumento do tempo de injeção e isso pode estar relacionado com a diminuição na corrente de separação (Figura 2.14). Quanto maiores os volumes dos plugues S_1 e S_2 maior a quantidade de analitos para preconcentrar e aumentar o sinal analítico, porém menor é a condutividade do eletrólito que preenche o capilar, logo, menor a corrente. Isso ocorre porque esses plugues atuam como isolantes do eletrólito de corrida resultando em uma redução da corrente de separação e uma demora maior na sua estabilização. Analisando a variação da altura do pico e da resolução do nitrato e tiocianato em função do tempo de injeção (Figura 2.15), foi possível observar que com o aumento do tempo de injeção ocorreu um aumento linear do sinal analítico (altura de pico) até 12 s de injeção com uma resolução entre nitrato e tiocianato cerca de 1,2. Com tempos de injeção maiores que 12 s o sinal também aumentou atingindo um máximo em 20 s. Entretanto, com o tempo de injeção 20 s o aumento do sinal dos analitos foi cerca de apenas 10% maior que com 15 s e, além disso, com este tempo ocorreu uma diminuição significativa da resolução entre nitrato e tiocianato (resolução < 1). Esse aumento do sinal é resultado do empilhamento dos íons do analito em uma estreita zona de migração devido ao aumento do volume de amostra injetado, exceto para o tempo de injeção de 20 s no qual a zona de migração é mais larga provocando perdas na resolução dos analitos. A redução gradativa da resolução com o aumento do tempo de injeção pode ter ocorrido devido ao aumento do tamanho do plugue injetado o que reduz a distância para o detector (L_{det}) tendo menos tempo para ocorrer uma separação efetiva dos íons dos analitos. Comparando os sinais obtidos para os tempos de 2 e 15 s de injeção observou-se um fator de enriquecimento de cerca de 7,8 vezes para o nitrato e 8,5 vezes para o tiocianato. Com relação ao maior valor de sinal absoluto observado para o nitrato talvez seja devido a sua maior absorvidade no comprimento de onda selecionado, uma vez que o máximo de absorção no UV do nitrato é em 200 nm e do tiocianato é em

190 nm. Foi utilizado como parâmetro de medida de pré-concentração a altura de pico, pois com isso é monitorada a pré-concentração dos analitos com perdas mínimas de resolução, isto é, o aumento do sinal é resultado de um aumento da quantidade de íons do analito em uma estreita zona de migração. Se fosse usada a área do analito estaria sendo desconsiderada a migração em uma zona estreita, pois o aumento do sinal seria atribuído também ao alargamento do pico devido a maior quantidade de analito migrando como uma zona larga especialmente em tempos de injeção elevados. Desta forma, o sinal continuaria aumentando em tempos de injeção maiores e o máximo de sinal seria obtido com tempo de injeção diferente daquele quando o sinal analítico é monitorado pela altura do pico.

Apesar do potencial de préconcentração do método proposto com tempos de injeção elevados o tempo de injeção de 4 s selecionado para ser usado nos experimentos é justificado pela concentração normalmente alta dos analitos na amostra.

2.4.1.7 Comparação de várias injeções no capilar modificado com QTS reticulada e em um capilar não revestido, e tempo instrumental de análise do método otimizado

Para avaliar o desempenho do capilar modificado com QTS reticulada na separação de nitrato e tiocianato foram realizadas vinte corridas (equivalentes à uma hora de trabalho) com uma amostra de saliva e comparadas com um capilar não revestido. Os vinte eletroferogramas sobrepostos para cada tipo de capilar obtidos empregando o método otimizado estão apresentados na Figura 2.16.

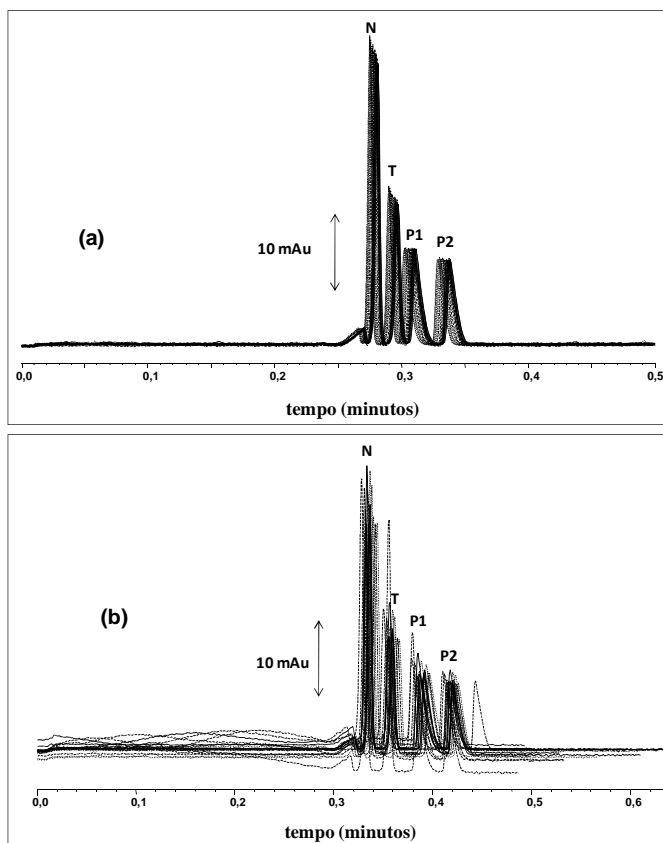


Figura 2.16 Vinte eletroferogramas sobrepostos de uma amostra de saliva coletada com *swab* obtidos empregando o método proposto: (a) capilar revestido com QTS reticulada e (b) capilar não revestido. Solução aceptora de bromato $25,6 \text{ mg L}^{-1}$. Eletrólito Tris 12 mmol L^{-1} e ácido sulfúrico $8,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 2,5, força iônica 23 mmol L^{-1} . Condições de injeção: $-40 \text{ mbar}/4 \text{ s}$ (S_1), $-40 \text{ mbar}/3 \text{ s}$ (eletrólito), $-40 \text{ mbar}/4 \text{ s}$ (S_2), $-40 \text{ mbar}/3 \text{ s}$ (eletrólito); tensão $+25 \text{ kV}$; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito $0,5 \text{ min}$. Capilar de sílica fundida de $48,5 \text{ cm}$ (L_{tot}), $8,5 \text{ cm}$ (L_{det}), e $75 \text{ }\mu\text{m}$ (DI). Legenda dos picos: N – nitrato; T – tiocianato; P₁ – bromato da solução S_1 ; P₂ – bromato da solução S_2 . Dados adquiridos do comprimento de onda 200 nm .

A comparação dos eletroferogramas obtidos mostrou que não existiram diferenças significativas no tempo de migração entre os dois tipos de capilares. Esse fato pode ser atribuído a alta mobilidade dos ânions analisados e também ao pH baixo do eletrólito de corrida, que no capilar não revestido gera um EOF catódico baixo permitindo a separação dos ânions no modo contra-eletrosmótico sem comprometimento do tempo de separação. Entretanto, foi observada uma diferença marcante nos perfis dos eletroferogramas obtidos nos dois tipos de capilares. O eletroferogramas do capilar revestido apresentaram uma estabilidade da linha de base muito melhor que no capilar não revestido. Isso reflete diretamente na repetitividade do método. O CV do tempo de migração e da área de pico para nitrato e tiocianato no capilar revestido foi menor que 0,85% e 1,0%, respectivamente. Enquanto isso, o CV do capilar não revestido foi menor que 1,7% e 3,5%, respectivamente. Assim, foi possível evidenciar uma melhor característica analítica para o método quando o capilar revestido é usado. Por fim, o revestimento com QTS reticulada atua prevenindo contra a adsorção de proteínas presentes na matriz da amostra de saliva.

Com relação ao tempo instrumental de análise (TIA) gasto utilizando o procedimento de injeção múltiplo otimizado que inclui o tempo gasto nas etapas de condicionamento, injeção e permuta dos vial e separação, são necessários 2,81 min para cada análise, assim é possível realizar cerca de 21 análises h^{-1} . Deste total de tempo gasto por análise a maior parte é requerida na injeção e permuta dos vials representando cerca de 69% do TIA (Figura 2.17). A etapa de separação é a que menos consome tempo no procedimento, cerca de 13% do TIA. Assim, observou-se que boa parte do TIA gasto na execução da separação utilizando o método proposto no presente trabalho é dependida com a velocidade instrumental atrelada especialmente a permuta dos vial durante cada etapa do procedimento.

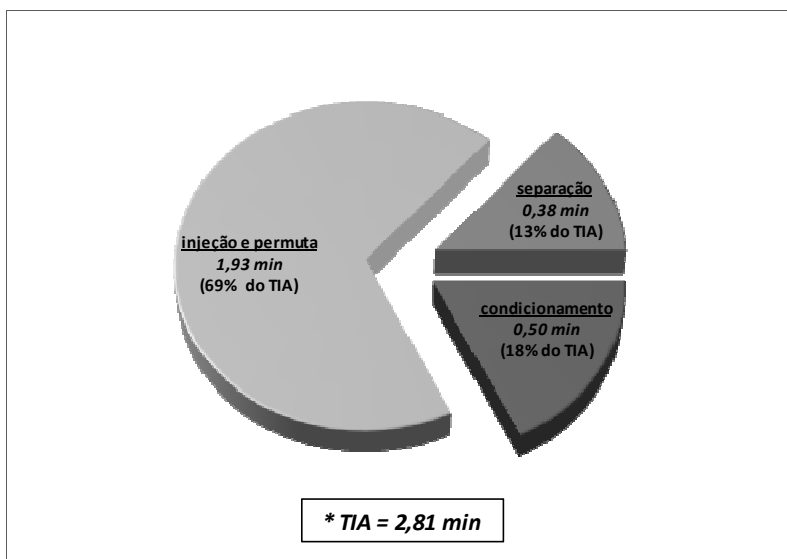


Figura 2.17 Gráfico representando as porcentagens de tempo gasto em cada etapa do método proposto em relação ao tempo instrumental de análise (TIA).

2.4.1.8 Avaliação do método proposto para correção do volume de saliva coletado

A avaliação da correção do volume de saliva pelo método proposto foi realizada usando um volume conhecido de saliva pipetada, volume de referência, o qual foi adicionado a um volume conhecido de solução acceptora contendo padrão interno. Um volume de 5 mL de saliva foi coletado e centrifugado a 6000 rpm por 15 min, deste foram removidas diferentes alíquotas para serem adicionadas a solução acceptora colocada em diferentes recipientes. A concentração do padrão interno bromato na solução acceptora foi de 25,6 mg L⁻¹ e o volume de solução acceptora foi 1000 µL. Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão de soluções preparadas em triplicata e determinadas em duplicata e estão apresentados na Figura 2.18.

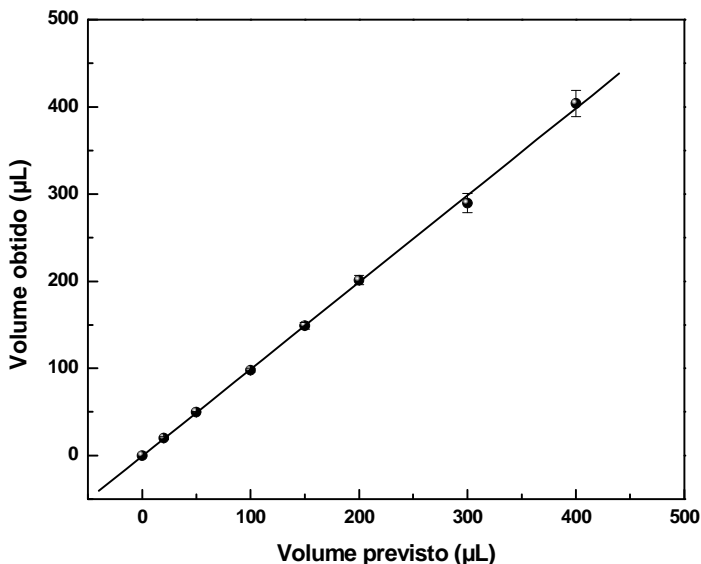


Figura 2.18 Avaliação do método proposto para correção do volume de amostra de saliva usando uma solução aceptora contendo padrão interno. Condições experimentais: ver seção de materiais e métodos.

Os valores de volume de saliva pipetados corresponderam aos valores de saliva determinados pelo método de correção de volume com um coeficiente de determinação 0,9994. O modelo linear mostrou ser significativo ($F = 9412$) para o volume obtido *versus* volume previsto e não apresentou falta de ajuste ($F_{calc} = 1,28$, $F_{critic} = 2,96$). O teste-*t* pareado mostrou que o volume calculado foi estatisticamente igual ao volume medido ($t_{calc} = 0,73$; $t_{critic} = 2,1$; NGL = 21; nível de confiança de 95%) com uma correlação de Pearson 0,998, o que demonstra uma boa correlação entre os valores. A diferença entre os volumes previstos e obtidos foi menor que 3,5% com CV dos volumes obtidos menor que

3,8%, mostrando que o método pode ser usado para corrigir o volume de saliva coletado com *swab*.

Para verificar se existe interferência provocada pelo material que compõe o *swab* utilizado na coleta da saliva foram realizadas medidas em duas soluções com a mesma concentração de nitrato e tiocianato a primeira sem a imersão do *swab* coletor da amostra e a segunda com a imersão do *swab* na solução durante uma hora. Os resultados demonstraram um CV de 3,4% e 0,65% para a área do nitrato e tiocianato, respectivamente, evidenciando que o material constituinte do *swab* é adequado para o método de coleta de amostra proposto sem provocar interferências.

2.4.2 Desempenho analítico do método

A avaliação analítica do método proposto para a determinação de nitrato e tiocianato em amostras de saliva foi realizada de acordo com os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e seletividade. Também foi avaliada a conformidade do sistema.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar seletivamente o sinal dos analitos de interesse na presença de componentes da matriz da amostra que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade permite avaliar o grau de interferência de espécies presentes na matriz da amostra que podem provocar o efeito de intensificar ou suprimir o sinal analítico dos analitos que se deseja analisar. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse, assegurando bons resultados para a linearidade, a exatidão e a precisão do método proposto (RIBANI *et al.*, 2004). A seletividade do método proposto para determinação de nitrato e tiocianato em amostras de saliva foi avaliada usando o método de adição de padrão e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Verificação da seletividade do método para a determinação de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva usando adição de padrão. Dados adquiridos em 200 nm.

Analito	Concentração (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)
	adicionada	recuperada	
nitrato	0,620	0,622	100,4
	6,20	6,03	97,3
	12,4	12,4	99,7
	24,8	25,1	101,1
	37,2	37,1	99,6
tiocianato	0,581	0,593	102,1
	5,81	5,69	98,0
	11,6	11,5	99,2
	23,2	23,5	101,2
	34,8	34,7	99,6

* Recuperação usando uma amostra de saliva diluída 10 vezes. Concentração dos analitos na amostra de saliva: 25,3 mg L⁻¹ nitrato e 12,7 mg L⁻¹ tiocianato. Resultados expressos como a média de cada ponto preparado em duplicata e determinado em duplicata para cada concentração. Inclinação das curvas de adição: nitrato $1,53 \pm 0,03$ ($R^2 = 0,999$) e tiocianato $1,03 \pm 0,02$ ($R^2 = 0,999$).

A comparação entre as inclinações da curva de calibração externa (nitrato $1,55 \pm 0,01$ L mg⁻¹ e tiocianato $1,04 \pm 0,01$ L mg⁻¹) e a curva de calibração por adição de padrão (nitrato $1,53 \pm 0,03$ L mg⁻¹ e tiocianato $1,03 \pm 0,02$ L mg⁻¹), revelou uma boa proximidade entre as inclinações tanto para nitrato quanto para tiocianato. O teste-*t* mostrou que as inclinações das retas são estatisticamente iguais para os dois analitos (nitrato $t_{calc} = 0,89$; tiocianato $t_{calc} = 0,63$; $t_{critic} = 4,3$ com nível de confiança de 95%). Também os valores de recuperação obtidos para cinco níveis de concentração adicionados de nitrato e tiocianato ficaram na faixa de 97-102%.

Os resultados obtidos de conformidade do sistema, de linearidade, limites de detecção e quantificação, e de precisão para o método proposto estão apresentados nas Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4,

respectivamente. Com relação à conformidade do sistema para o método otimizado foram obtidos bons resultados de eficiência de separação com número de pratos maiores que 15000 para os analitos, boa simetria dos picos e resolução adequada entre nitrato e tiocianato. A faixa de calibração para ambos analitos foi de cerca de 6,0 a 60,0 mg L⁻¹ com coeficiente de determinação maiores que 0,99. O modelo linear mostrou ser significativo para as curvas de calibração externa de nitrato e tiocianato ($F > 33000$ para nitrato e $F > 22000$ para tiocianato) e não apresentou falta de ajuste (nitrato $F_{calc} = 0,002$; tiocianato $F_{calc} = 0,003$; $F_{critic} = 2,96$, com nível de confiança de 95%). Os limites de detecção e quantificação obtidos pelo método foram adequados para a determinação de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva. Os valores de CV para as precisões instrumental, intra-ensaio e intermediária, obtidos para a área de pico e para o tempo de migração dos analitos usando uma solução padrão, foram menores que 5%. Da mesma forma, os resultados de precisão usando uma amostra de saliva apresentaram valores de CV tão baixos quanto aqueles obtidos para solução padrão.

Tabela 2.2 Resultados de parâmetros de conformidade do método otimizado para determinação de nitrato e tiocianato em saliva por CE usando o capilar revestido com QTS reticulada. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analito	
		nitrato	tiocianato
Número de pratos ($N\ m^{-1}$) ^(a)	3	15450	15004
Simetria de pico ^(b)	3	1,07	0,921
Fator de assimetria de pico ^(b)	3	0,95	1,16
Fator de cauda de pico ^(b)	3	0,98	1,04
Resolução (nitrato : tiocianato) ^(c)	3	1,2	

^(a) Número de pratos calculado de acordo com a equação $N = 16 (t_i / w_{hi})^2$, onde t_i é o tempo de migração do analito dado em min e w_{hi} é a largura de pico na base, nas mesmas unidades de t_i . Concentração de nitrato e tiocianato cerca de 25 mg L⁻¹.

^(b) Simetria de pico obtida do software *HP Chemstation*[®], rev A.06.01. Fator de assimetria calculado usando a distância a partir do centro do pico para a cauda do pico dividido pela distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 10 % da altura máxima do pico. Fator de rejeição foi calculado usando a distância da cauda frontal do pico para a cauda do pico dividido por duas vezes a distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 5 % da altura máxima do pico.

^(c) Resolução calculada usando a equação: $Rs = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, onde t é o tempo de migração do pico e w é a largura do pico na base. Concentração de nitrato e tiocianato cerca de 25 mg L⁻¹.

Tabela 2.3 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado para determinação de nitrato e tiocianato em saliva por CE usando o capilar revestido com QTS reticulada. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analito	
		nitrato	tiocianato
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^(a)	6	6,2 – 62	5,8 – 58
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^(a)		1,55	1,04
Desvio padrão inclinação ^(a)		0,01	0,01
Linearidade-intercepto ^(a)		0,38	0,33
Desvio padrão intercepto ^(a)		0,05	0,06
linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^(a)		0,999	0,999
Limite detecção, LD (mg L ⁻¹) ^(b)		0,11	0,19
Limite quantificação, LQ (mg L ⁻¹) ^(b)		0,32	0,58
F ^(c)		33188	22219

^(a) Cada ponto da curva preparado em duplicata e medido em duplicata. Curvas de calibração sem correção da área com padrão interno.

^(b) Limites de detecção e quantificação calculados de acordo com as equações: $LD = (3,3 \times s)/S$; $LQ = (10 \times s)/S$, onde *s* é o desvio padrão do coeficiente linear e *S* é a inclinação da curva analítica, respectivamente.

^(c) Nitrato e tiocianato $F_{critic} 4,49$; NGL = 17.

Tabela 2.4 Resultados de precisão do método otimizado para determinação de nitrato e tiocianato em saliva por CE usando o capilar revestido com QTS reticulada. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analito	
		nitrato	tiocianato
Precisão instrumental, CV (%) – área de pico	14	1,2 (1,1)	1,7 (0,91)
Precisão instrumental, CV (%) – tempo de migração	14	0,80 (0,76)	1,3 (0,81)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – área de pico	10	2,6 (3,7)	1,8 (2,1)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – tempo de migração	10	2,4 (1,4)	2,4 (1,4)
Precisão intermediária, CV (%) – area de pico	20	3,1	2,6
Precisão intermediária, CV (%) – tempo de migração	20	4,0	4,6

* Coeficientes de variação calculados com a equação: $CV = (P/\bar{u}) \times 100$, onde *P* é o desvio padrão absoluto e \bar{u} é a média aritmética da área do analito ou a média aritmética do tempo de migração. Valores de CV para precisão instrumental medidos na mesma solução, para precisão intra-ensaio foram 10 preparações com a mesma concentração e para precisão intermediária 10 preparações em um dia e mais 10 preparações em outro dia, usando solução padrão dos analitos 25 mg L⁻¹ ou amostra. Valores de CV entre parênteses são referentes a uma amostra de saliva diluída 10 vezes.

2.4.3 Análises de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva

A aplicação do método otimizado para coleta e determinação de nitrato e tiocianato foi realizada utilizando amostras de saliva de seis voluntários, cinco não fumantes e um fumante. Uma amostra de saliva de cada voluntário foi coletada e injetada em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 Resultados para a determinação de nitrato e tiocianato nas amostras de saliva coletadas de voluntários usando o método otimizado para coleta e determinação. Dados adquiridos em 200 nm.

Amostra	Concentração determinada (mg L^{-1})	
	nitrato	tiocianato
1	14,8 ($\pm 0,3$)	30,2 ($\pm 3,1$)
2	394,5 ($\pm 8,8$)	55,4 ($\pm 1,2$)
3	42,8 ($\pm 6,5$)	54,6 ($\pm 1,3$)
4	18,3 ($\pm 3,0$)	10,0 ($\pm 2,6$)
5	39,9 ($\pm 1,5$)	98,6 ($\pm 4,4$)
6	175,5 ($\pm 9,5$)	26,3 ($\pm 3,6$)

* Resultados expressos como a média com intervalo de confiança de 95% para $n = 3$.

Das amostras analisadas apenas uma apresentou um nível de concentração elevado de tiocianato, amostra essa do voluntário fumante (amostra 5). Esse dado está de acordo com os trabalhos relatados na literatura que mostram maiores níveis deste marcador em pessoas fumantes que não fumantes. O tiocianato detectado nas outras amostras, de não fumantes, em menores níveis que na amostra de um fumante, podem estar relacionadas com a ingestão de alguns vegetais como repolho, nabo, couve, brócolis, os quais contêm glucosinolatos que são uma classe de tioglicosídeos cuja função é defender a planta de organismos herbívoros pela geração de substâncias tóxicas incluindo nitrilas, isotiocianato, tiocianato, entre outras, como produto da hidrólise

enzimática destes glucosinolatos (BUROW *et al.*, 2007; GRUBB; ABEL, 2006). Outros alimentos como leite e queijo apresentam tiocianato em sua composição e sua ingestão também pode contribuir para os níveis de tiocianato detectados. O tiocianato ocorre naturalmente em leites, mas também pode ser adicionado nesse alimento, pois juntamente com a enzima lactoperoxidase e peróxido de hidrogênio forma um sistema que atua como um conservante do leite pela produção de hipotiocianato que é um forte agente antimicrobiano (BOULARES; MANKAI; HASSOUNA, 2011; FONTEH; GRANDISON; LEWIS, 2002). Em indivíduos que consomem esses alimentos o tiocianato pode ser encontrado em baixas concentrações tanto no soro humano, como na saliva e urina (GLATZ; NOVÁKOVÁ; ŠTĚRBOVÁ, 2001). Com relação às concentrações de nitrato determinadas, observou-se uma faixa relativamente larga de concentração entre as amostras, sendo o menor valor menor que 15 mg L^{-1} e o maior cerca de 400 mg L^{-1} . Os níveis detectados estão relacionados ao estresse oxidativo e nitrosativo como descrito na literatura. Entretanto, muitos alimentos contêm nitrato de potássio como conservante (HONIKEL, 2008), especialmente alimentos defumados, embutidos e enlatados. Como a saliva entra em contato com esses alimentos, pode haver um aumento significativo de concentração desse analito em pessoas que tenham ingerido alimentos dessa natureza. Além disso, outros fatores podem interferir na concentração de nitrato na saliva como as condições que a amostra foi coletada, por exemplo, antes ou depois da ingestão de água ou outra bebida que poderia provocar uma diluição da amostra. Das amostras analisadas no presente estudo o único detalhe conhecido é que a coleta da saliva dos voluntários foi realizada após horário de almoço. Assim, ao mesmo tempo em que a amostra de saliva é uma amostra que apresenta a grande vantagem de um método de coleta não invasivo, a análise dos resultados da determinação de analitos nesse tipo de amostra deve ser muito criteriosa, pois dependendo do analito podem ser observadas variações significativas nos níveis de concentração em função dos hábitos alimentares dos indivíduos.

2.4.4 Comparação do método proposto com outros métodos

Algumas das características do método proposto foram comparadas com outros métodos da literatura empregados para determinar ânions em saliva, especialmente nitrato e tiocianato. As principais informações de cada um destes métodos estão resumidas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 Comparação de algumas características do método proposto no presente trabalho para determinação de nitrato e tiocianato em amostras de saliva com outros métodos descritos na literatura.

Modificador	Tempo de condicionamento (min)	Tempo de separação (min)*	LD nitrato (mg L ⁻¹)	LD tiocianato (mg L ⁻¹)	Referência
sem modificador	3	6,2	-	0,041	(GLATZ; NOVÁKOVÁ; ŠTÉRBOVÁ, 2001)
polibreno	10,5	2,8	1,1	5,4	(TANAKA <i>et al.</i> , 2004)
hidróxido de sódio e dodecilsulfato de sódio	11	7	0,21	-	(GÁSPÁR; JUHÁSZ; BÁGYI, 2005)
hidroxipropil celulose	4	9	4,6x10 ⁻³	3,8x10 ⁻³	(XU <i>et al.</i> , 2008)
QTS reticulada	0,5	0,38	0,11	0,19	presente trabalho

* Tempo final de separação considerando o tempo de migração do último ânion de interesse (nitrato ou tiocianato) ou o padrão interno usado no método.

A análise comparativa mostrou que o método proposto usando QTS reticulada como modificador do EOF requereu menos tempo de condicionamento entre corridas e o tempo necessário para promover a separação também foi menor. Os valores de LD para nitrato e tiocianato foram tão bons quanto ou melhores que aqueles obtidos com os outros métodos. Além disso, o tempo de condicionamento e de separação

obtidos no método proposto foram os menores de todos os métodos listados. Outro ponto importante que confere uma vantagem ao método proposto, especialmente devido a boa frequência analítica obtida (21 corridas/h) é a estabilidade dos analitos na amostra. De acordo com um estudo realizado por TANAKA e colaboradores (TANAKA *et al.*, 2004), a concentração dos ânions presentes em uma amostra de saliva, incluindo nitrato e tiocianato, é estável a temperatura ambiente durante cerca de 4 h e sob refrigeração de 3 °C esta estabilidade poderia ser mantida por 48 h. Assim, com o emprego de um método rápido para coleta das amostras e determinação, muitas amostras podem ser analisadas sem a necessidade de refrigeração.

2.5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a CE é uma técnica de separação poderosa. A mesma foi aplicada no desenvolvimento de um novo método para reduzir o número de etapas no procedimento experimental, permitindo análises com mínimo tratamento da amostra. O revestimento do capilar com QTS reticulada apresenta características que previnem a adsorção de proteínas presentes nas amostras de saliva, possivelmente devido às cargas positivas do revestimento no pH baixo do eletrólito usado repulsem por repulsão eletrostática as proteínas que, neste pH, encontram-se também na forma protonada. Com isso, o tempo necessário de condicionamento entre corridas com o eletrólito para promover uma boa repetitividade dos tempos de migração dos analitos foi de apenas alguns segundos, o qual também contribuiu para o aumento da frequência analítica do método. Outra vantagem do revestimento é a possibilidade do seu uso com detector de massas, uma vez que o modificador não está presente no eletrólito de corrida, mas fixado nas paredes do capilar o que gera um espectro de massas mais limpo. O método proposto para coletar a amostra de saliva corrigindo o volume coletado tem potencial para ser aplicado na determinação de outras substâncias na saliva, pois este fluido biológico contém diferentes marcadores usados em diagnósticos e como indicadores de drogas de abuso. Além disso, essa estratégia para corrigir o volume de amostra coletada poderia ser também implementada e aplicada para outras amostras que são difíceis de pipetar devido sua viscosidade ou até mesmo para outros fluidos biológicos que são difíceis de coletar, assim como lágrimas ou suor.

REFERÊNCIAS

BERSTAD, D. A.; KNAPSTAD, B.; LAMVIK, M.; SKJØLSVIK, P. A.; TØRKLEP, K.; ØYE, H. A. Accurate measurements of the viscosity of water in the temperature range 19.5 – 25.5 °C. *Physica A*, v. 151, p. 246-280, 1988.

BOULARES, M.; MANKAI, M.; HASSOUNA, M. Effect of thiocyanate and hydrogen peroxide on the keeping quality of ovine, bovine and caprine raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 64, p. 52-56, 2011.

FONTEH, F. A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Variations of lactoperoxidase activity and thiocyanate content in cows' and goats' milk throughout lactation. *Journal of Dairy Research*, v. 69, p. 401-409, 2002.

BOONE, C. M.; WATERVAL, J. C. M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W. J. M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs—a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 20, p. 831-863, 1999.

BUROW, M; BERGNER, A.; GERSHENZON, J.; WITTSTOCK, U. Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*-identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant Molecular Biology*, v. 63, p. 49-61, 2007.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 191–219, 2008.

CHIAPPIN, S.; ANTONELLI, G.; GATTI, R.; DE PALO, E. F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, v. 383, p. 30-40, 2007.

CUI, Z.; XIANG, Y.; SI, J.; YANG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, T. Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 111–116, 2008.

GAŠ, B.; COUFAL, P.; JAROŠ, M.; MUZIKÁŘ, J.; JELÍNEK, I. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis. I. Mathematical and computational model. *Journal of Chromatography A*, v. 905, p. 269-279, 2001.

GÁSPÁR, A.; JUHÁSZ, P.; BÁGYI, K. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis and to a stability study of nitrite and nitrate in saliva. *Journal of Chromatography A*, v. 1065, p. 327-331, 2005.

GLATZ, Z.; NOVÁKOVÁ, S.; ŠTĚRBOVÁ, H. Analysis of thiocyanate in biological fluids by capillary zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 916, p. 273-277, 2001.

GRUBB, C. D.; ABEL, S. Glucosinolate metabolism and its control. *TRENDS in Plant Science*, v.11, p. 89-100, 2006.

HEFLIN, L.; WALSH, S.; BAGAJEWICZ, M. Design of medical diagnostics products: A case-study of a saliva diagnostics kit. *Computers and Chemical Engineering*, v.33, p. 1067-1076, 2009.

HONIKEL, K-O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, v. 78, p. 68-76, 2008.

JABEEN, R.; PAYNE, D.; WIKTOROWICZ, J.; MOHAMMAD, A.; PETERSEN, J. Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. *Electrophoresis*, v. 27, p. 2413-2438, 2006.

LANDERS, J. P. (Ed.) **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3rd ed. New York: CRC Press, 2008.

LOYD, D. K. Capillary electrophoresis analysis of biofluids with a focus on less commonly analyzed matrices. *Journal of Chromatography B*, v. 866, p. 154-166, 2008.

LUCY, C. A.; MACDONALD, A. M.; GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 81–105, 2008.

MICKE, G. A. *Otimização e simulação em Eletroforese Capilar*. 2004. 311 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol—Total analysis time reduction strategies. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7957-7961, 2009.

PEAKMASTER: software livre. Versão 5.3. Disponível em: <<http://web.natur.cuni.cz/gas/>> Acesso em: 05 mar. 2010.

PERRETT, D.; ROSS, G. A. Rapid determination of drugs in biofluids by capillary Electrophoresis Measurement of antipyrine in saliva for pharmacokinetic Studies. *Journal of Chromatography A*, v. 700, p. 179–186, 1995.

PYELL, U. (Ed.) **Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

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

SIMPSON JR., S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 504–541, 2008.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis. I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. *Journal of Chromatography A*, v. 960, p. 187-198, 2002.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; VČELÁKOVÁ, K.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. *Electrophoresis*, v. 24, p. 536-547, 2003.

TANAKA, Y.; NARUISHI, N.; FUKUYA, H.; SAKATA, J.; SAITO, K.; WAKIDA, S. Simultaneous determination of nitrite, nitrate, thiocyanate and uric acid in human saliva by capillary zone electrophoresis and its application to the study of daily variations. *Journal of Chromatography A*, v. 1051, p. 193–197, 2004.

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 1174-1180, 1996.

XU, Z.; DOI, T.; TIMERBAEV, A.R.; HIROKAWA, T. Sensitive determination of anions in saliva using capillary electrophoresis after transient isotachophoretic preconcentration. *Talanta*, v. 77, p. 278-281, 2008.

ZAUGG, S.; THORMANN, W. Enantioselective determination of drugs in body fluids by capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 875, p. 27-41, 2000.

CAPÍTULO 3 – DETERMINAÇÃO DE IODETO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ELETROFORESE CAPILAR EMPREGANDO CAPILAR MODIFICADO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

A CE é uma técnica analítica consolidada entre as técnicas de separação empregadas em análises químicas. Isso é resultado de uma série de fatores dentre eles: melhoria na tecnologia dos instrumentos de CE, avanços significativos no desenvolvimento de novas metodologias para análise de diversas moléculas em diferentes tipos de amostras e a vasta literatura que dá suporte ao entendimento e implementação da técnica (TAVARES *et al.*, 2003). Uma área de grande potencial para a aplicação da CE é na análise de produtos farmacêuticos. CE oferece uma atrativa alternativa a cromatografia líquida para análises de controle de qualidade de fármacos. Dentre os principais fatores que tornam a CE vantajosa pode-se destacar: alta eficiência de separação, pequeno tempo de análise, simplicidade na instrumentação, necessidade de pequena quantidade de amostra e baixo consumo de solventes (GEISER; RUDAZ; VEUTHEY, 2005). Com isso a CE tem adquirido importância para ser usada em diferentes aplicações farmacêuticas aumentando seu emprego em análises de rotina.

Uma característica interessante da CE é seu potencial para separar rapidamente diferentes analitos. A elevada eficiência de separação alcançada em CE permite o desenvolvimento de métodos rápidos com tempos de separação de alguns segundos. A CE desempenha um papel essencial no desenvolvimento de sistemas de análise de alta frequência analítica. A frequência analítica de separações eletroforéticas pode ser melhorada pelo uso de instrumentos com arranjo de capilares multiplexados, o qual permite simultaneamente a separação de analitos em muitas amostras, e pelo uso de capilares com menor tamanho possível (MATYSIK, 2010). O tamanho mínimo de capilar que pode ser usado é limitado pela configuração instrumental de CE usado, o qual varia de acordo com o fabricante (OPEKAR; COUFAL;

ŠTULÍK, 2009). O tempo instrumental de análise (TIA) gasto em uma análise por CE inclui o tempo necessário para o procedimento de lavagem do capilar, o tempo de injeção da amostra, o tempo de separação, e o tempo de permuta dos frascos. A diminuição no tempo ou eliminação de uma ou mais destas etapas diminui o TIA (MICKE *et al.*, 2009). Algumas estratégias para diminuir o TIA sem comprometer a eficiência de separação e a seletividade incluem: uso de campo elétrico elevado; separação no modo co-eletromótico; aumento do EOF por modificação da superfície interna de capilares de sílica com um agente específico ou por adição de um modificador no eletrólito de corrida; e emprego de procedimentos de injeção pela extremidade do capilar mais próxima do detector e também uso de injeções múltiplas. Cada estratégia realizada individualmente ou combinada pode resultar em uma diminuição do TIA e conseqüentemente aumentar a frequência analítica de um método (OPEKAR; COUFAL; ŠTULÍK, 2009; GEISER; RUDAZ; VEUTHEY, 2005). Em CE o modo de injeções múltiplo torna possível analisar duas ou mais amostras injetadas sequencialmente em uma única corrida. Na análise de fármacos, a metodologia de injeção múltipla têm sido usada para separação de anestésico local (lidocaína) (GEISER; RUDAZ; VEUTHEY, 2003; GEISER; RUDAZ; VEUTHEY, 2005); peptídeo sintético (buserelina) (LODÉN; AMINI, 2007); adrenoreceptor β_2 (salbutamol) (LODÉN *et al.*, 2008); hormônio (insulina) (STAUB *et al.*, 2010). Entretanto, antes do emprego de múltiplas injeções, uma amostra deve ser analisada usando o modo de injeção simples, para identificar possíveis interferentes e indicar se é possível usar o modo de injeção múltiplo (AMINI *et al.*, 2008). A vantagem das injeções múltiplas em métodos para análises moléculas em formulações farmacêuticas é que na maioria dos casos os componentes do fármaco são poucos e conhecidos.

Iodeto é usado frequentemente em produtos farmacêuticos, especialmente na forma de iodeto de potássio. Iodeto pode ser usado como agente expectorante que facilita a remoção de secreções da mucosa broncopulmonar; em pacientes com hipertireoidismo o iodeto rapidamente inibe a síntese de hormônios da tireóide; e em alguns países comprimidos de iodeto de potássio são vendidos em farmácias para proteção da tireóide em caso de emergência nuclear (NACAPRICHA *et al.*, 2004; FDA, 2010). Alguns métodos são empregados para a determinação de iodeto em diferentes concentrações e amostras como

cromatografia iônica (REBARY; PAUL; GHOSH, 2010; RONG; TAKEUCHI, 2004; HU *et al.*, 2002); CE (PALIULIONYTE; PADARAUSKAS, 2002); espectrofotometria usando injeção em fluxo reverso (XIE; ZHAO, 2004) e análise por injeção em fluxo usando a reação triiodeto-amido (NACAPRICHA *et al.*, 2004). Entretanto, muitos destes métodos tem a desvantagem de envolver reações químicas e/ou tempo de análises de alguns min, os quais frequentemente comprometem a frequência analítica.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver um método de separação rápido por CE usando injeções múltiplas sequenciais pela extremidade do capilar mais próxima do detector em um capilar revestido com SAQQ sem reticulação para determinar iodeto em formulações farmacêuticas.

3.2.2 Objetivos Específicos

- selecionar os componentes do eletrólito de corrida e padrão interno com o auxílio do *software PeakMaster*;
- otimizar a força iônica do eletrólito de corrida;
- modificar o EOF empregando SAQQ como modificador semi-permanente, sem formação de reticulação, a fim promover a separação do iodeto no modo co-eletrosmótico;
- otimizar a estratégia de injeção do método usando injeção simples e múltipla;
- empregar o *software PeakMaster* para simular as injeções múltiplas;
- verificar a possibilidade de injeção múltipla sequencial de amostras de xarope comercial;
- avaliar o desempenho do método determinando os parâmetros seletividade; limites de detecção e quantificação; precisão instrumental, intra-ensaio e intermediária; resolução e número de pratos; entre outros;
- empregar o método desenvolvido na análise de iodeto em amostras de xarope.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e soluções empregadas na síntese do SAQQ usado para revestir o capilar empregado neste método estão descritos no Capítulo 2. Brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB, do inglês “*Cetiltrimetilamonium bromide*”) $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi usado como modificador do capilar para comparação com SAQQ. Soluções estoque de ácido clorídrico (44 mmol L^{-1}) e Tris (80 mmol L^{-1}), reagentes adquiridos da Labsynth (Diadema, Brasil), foram utilizadas para preparar o eletrólito de corrida. Soluções padrão estoque (10 mmol L^{-1}) de iodeto de potássio (KI) e do padrão interno tiocianato de potássio (KSCN), foram preparadas por dissolução em água deionizada, todos adquiridos da Labsynth (Diadema, Brasil). As soluções de calibração de iodeto foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque. Água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi usada na preparação de todas as soluções.

3.3.2 Preparo das amostras e sistema de eletroforese capilar

Três amostras de medicamento na forma líquida contendo iodeto de potássio $100 \text{ mg} / 5 \text{ mL}$ produzidas por diferentes empresas foram adquiridos no mercado local. Antes das análises de CE as amostras foram diluídas 1:100 com água deionizada em balões volumétricos e em seguida diluídas novamente 1:10 com água e solução de tiocianato (padrão interno, concentração injetada 58 mg L^{-1}).

Todos os experimentos para otimizar a separação de iodeto foram conduzidos em um equipamento de CE (HP^{3D} CE, Agilent Technologies, Palo Alto, E. U. A.) equipado com detector de arranjo de diodos fixado em 220 nm , com dispositivo de controle de temperatura (temperatura mantida em $25 \text{ }^\circ\text{C}$) e um *software* para controle, aquisição e tratamento dos dados obtidos (*software HP ChemStation*[®], rev

A.06.01). O eletrólito de corrida usado na determinação de iodeto foi composto por Tris 20 mmol L⁻¹ e ácido clorídrico 11 mmol L⁻¹, em pH 8,0. Os padrões e amostras foram introduzidos no capilar na parte mais próxima do detector e injetados por pressão hidrodinâmica (50 mbar = 4997,0 Pa) de acordo com os seguintes passos: -50 mbar/3 s (padrão ou amostra); -50 mbar/7 s (eletrolito espaçador); -50 mbar/3 s (padrão ou amostra); -50 mbar/8 s (eletrolito espaçador); -50 mbar/3 s (padrão ou amostra); -50 mbar/8 s (eletrolito espaçador); -50 mbar/3 s (padrão ou amostra). A tensão de separação aplicada foi 30 kV com polaridade negativa na injeção. Em todos os experimentos foi usado um capilar de sílica fundida (Microtube, Araraquara, SP, Brasil) com 32 cm (8,5 cm comprimento efetivo × 50 μm DI × 375 μm DE). O capilar usado no desenvolvimento do método foi revestido com SAQQ somente lavando o capilar com solução polimérica conforme descrito no procedimento experimental do Capítulo 1. Para propósito de comparação o mesmo procedimento de revestimento foi empregado usando CTAB. As medidas de mobilidade do EOF foram feitas utilizando o método por pressão, descrito no Capítulo 1, com acetona como marcador neutro.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Otimização de parâmetros para desenvolver um método rápido para determinação de iodeto

3.4.1.1 Seleção dos componentes do eletrólito de corrida e padrão interno

O iodeto é uma espécie que absorve na região do ultravioleta (UV) e é também um ânion rápido ($\mu = -79,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que está totalmente ionizado na faixa de pH 1 a 14. Assim, a escolha do co-íon e contra-íon componentes do eletrólito não depende do pH devido a ionização do iodeto não ser influenciada por este parâmetro. O co-íon selecionado para compor o eletrólito de corrida foi o cloreto, um ânion que tem uma mobilidade ($\mu = -79,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) muito próxima da mobilidade do iodeto, assim prevenindo efeitos de assimetria de pico do analito como resultado da dispersão por eletromigração (EMD). Para o iodeto a EMD é igual a 0,06 com cloreto como co-íon (dados obtidos do *software PeakMaster*). Além disso, o co-íon escolhido não absorve no UV, permitindo seu uso sem interferências na detecção direta do iodeto. O contra-íon escolhido para o eletrólito foi o Tris. Esta molécula apresenta pKa por volta de 8, assim, o pH selecionado para a separação foi cerca de 8, pois com o pH do eletrólito próximo do pKa do Tris a capacidade tamponante é maximizada. Para melhor visualizar os parâmetros do sistema de separação com estes componentes no eletrólito e escolher as concentrações dos mesmos foi construído um gráfico de diferentes parâmetros mantendo a concentração de Tris fixa em 10 mmol L^{-1} e variando a concentração de ácido clorídrico. Os dados foram obtidos usando o *software PeakMaster* e os resultados estão apresentados na Figura 3.1.

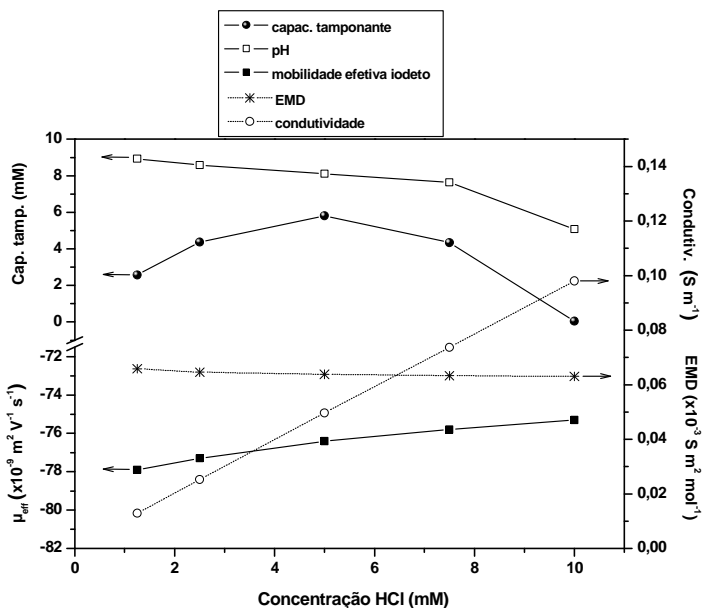


Figura 3.1 Dados da simulação das condições de separação de iodeto usando concentração fixa 10 mmol L^{-1} de Tris e variando a concentração de ácido clorídrico como co-íon. Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo.

É possível verificar que com o aumento da concentração de ácido clorídrico a EMD e a mobilidade efetiva do iodeto praticamente não se alteram, mantendo um valor de mobilidade adequado para uma separação rápida e um valor de EMD que confere uma boa simetria de pico para o analito. Quanto a condutividade apesar de aumentar linearmente com o aumento do ácido clorídrico, apresenta um valor baixo. Com relação a capacidade tamponante do eletrólito foi observado um máximo na proporção 1:2 (5 mmol L^{-1} ácido clorídrico: 10 mmol L^{-1} Tris), exatamente no pH 8,1. Assim, devido à maximização da capacidade tamponante esta foi a proporção escolhida dos componentes do eletrólito. Por fim, o padrão interno escolhido para ser usado no

método foi o tiocianato, uma espécie que absorve no UV como o iodeto e também tem um valor de mobilidade ($\mu = -68,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) próximo ao do analito de interesse.

3.4.1.2 Otimização da força iônica do eletrólito de corrida

Sabendo-se a proporção ideal entre os componentes do eletrólito, foi necessário otimizar a força iônica do mesmo mantendo essa proporção. A força iônica do eletrólito foi selecionada observando a variação da corrente obtida em função da tensão aplicada, as quais devem ter uma relação linear obedecendo a lei de Ohm. Para este estudo, foram usadas soluções de eletrólito contendo Tris e ácido clorídrico, em pH ~ 8 , com forças iônicas variando de 11 a 44 mmol L^{-1} e tensão variando de -5 a -30 kV. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.2. De todas as soluções avaliadas, a de menor força iônica mostrou o melhor coeficiente de determinação ($R^2 = 0,996$) para toda a faixa de tensão aplicada e também que o modelo linear é significativo ($F = 1028$), o que indica uma separação com mínimo efeito Joule. Então, a força iônica escolhida para o eletrólito de corrida foi 11 mmol L^{-1} (ácido clorídrico 11 mmol L^{-1} e Tris 20 mmol L^{-1}). Com essa força iônica foi possível selecionar a tensão de -30 kV para ser usada no método permitindo uma separação mais rápida.

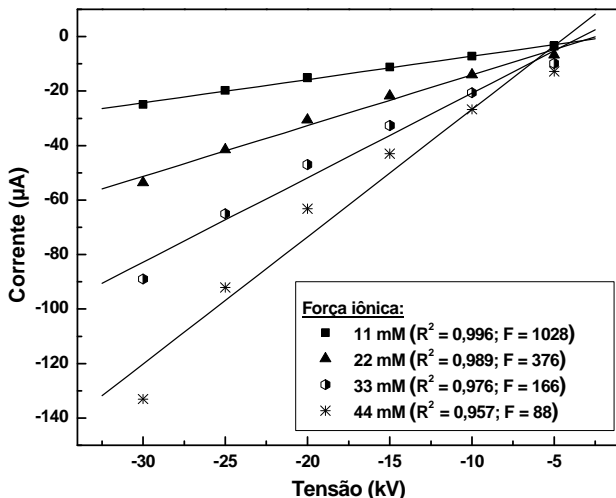


Figura 3.2 Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito composto de Tris e ácido clorídrico pH 8 em diferentes forças iônicas. Entre parêntesis os valores de coeficientes de determinação e teste F.

3.4.1.3 Modificação e caracterização do EOF

A fim de se separar ânions o mais rápido possível usando CE, é necessário modificar o EOF catódico, observado em um capilar de sílica onde os ânions migram no modo contra-eletrosmótico, para um EOF anódico promovendo a migração dos analitos aniônicos na mesma direção do EOF, isto é, no modo co-eletrosmótico. O SAQQ já foi empregado como modificador do EOF para transformá-lo em um EOF anódico, porém sendo usado como aditivo no eletrólito para separação de ânions. Neste estudo, o SAQQ foi usado para transformar o EOF catódico de um capilar de sílica em um EOF anódico simplesmente por lavagem do capilar com solução polimérica, sem ser adicionado no eletrólito. Como mencionado no Capítulo 1, a concentração de SAQQ

usada na solução de lavagem para promover a saturação da superfície do capilar com o polímero e gerar um EOF anódico foi de 0,2% (m/v). A estabilidade do EOF no capilar revestido com SAQQ foi comparada com um capilar revestido com CTAB (inversor de EOF comumente empregado em CE), usando o mesmo procedimento de modificação. A Figura 3.3 apresenta as variações do EOF como função do tempo de aplicação de tensão em capilares revestidos por lavagem com solução de SAQQ ou CTAB.

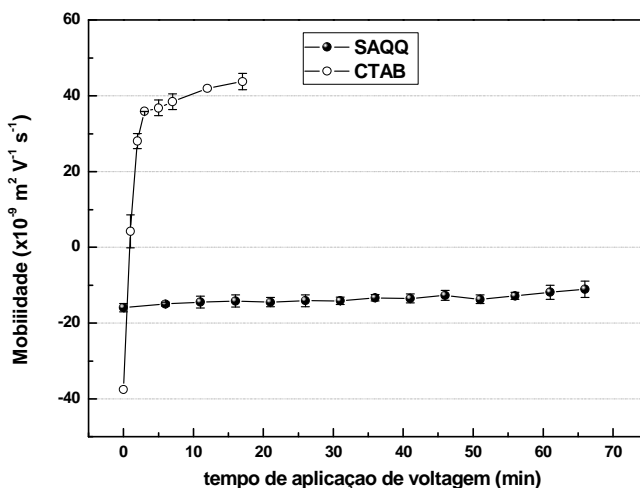


Figura 3.3 Influência do tempo de aplicação de tensão (-30kV) na estabilidade do EOF, usando como modificadores SAQQ e CTAB. Condições experimentais: eletrólito Tris 20 mmol L⁻¹ e ácido clorídrico 11 mmol L⁻¹, pH 8,1, força iônica 11 mmol L⁻¹; capilar 32 cm (L_{tot}), 50 μm (DI) e 23,5 cm (L_{det}); medidas de mobilidade do EOF usando acetona como marcador pelo método por pressão empregando tempo de migração 0,5 min e tensão -15kV. Valores de mobilidade expressos como a média e desvio padrão: SAQQ, $n = 3$ (um ciclo em um capilar e dois ciclos em outro capilar) e CTAB, $n = 2$ (dois ciclos em um capilar).

Foi possível observar que, após cerca de 1 min de aplicação de 30 kV, o capilar modificado com CTAB que apresentava EOF anódico passou a ter EOF catódico, indicando a remoção de uma quantidade significativa de CTAB da superfície do capilar. Enquanto isso, no capilar revestido com SAQQ o EOF permaneceu praticamente constante até cerca de 60 min de aplicação de tensão, mostrando que a modificação tem uma boa estabilidade. O CV dos valores de EOF medidos durante os primeiros 31 min de aplicação de tensão foi cerca de 4,6% e para 66 min de aplicação de tensão foi 9,0%. Assim, o revestimento semi-permanente com SAQQ por simples lavagem do capilar apresentou uma estabilidade muito maior que o revestimento com CTAB, mostrando que este modificador pode ser usado sem a necessidade de adição no eletrólito. O uso do CTAB como inversor do EOF somente seria possível como aditivo no eletrólito. Também o ruído da linha de base do eletroferograma é menor com o uso do SAQQ que com uso do CTAB. Deste modo, o SAQQ pode potencialmente ser usado como um reversor de EOF semi-permanente.

3.4.1.4 Otimização da estratégia de injeção

3.4.1.4.1 Simulações das injeções múltiplas

Os modos de injeção testados para serem empregados no método de separação e determinação de iodeto foram: injeção simples (um plugue de amostra) lavando o capilar com eletrólito entre corridas (Slava) e não lavando entre corridas (SSlava); e injeções múltiplas (mais de um plugue de amostra) lavando o capilar com eletrólito entre corridas (Mlava) e não lavando entre corridas (MSlava). Todas as injeções foram realizadas pelo caminho mais curto do capilar até o detector. Para o modo de injeção múltipla o número máximo de plugues possíveis de serem injetados foi calculado e a separação foi simulada usando o *software PeakMaster*. O cálculo do número de plugues possíveis de serem injetados (η_S) em uma injeção múltipla pode ser realizado com a seguinte equação (AMINI *et al.*, 2008):

$$\eta_S = \frac{t_{mig(SCN)}}{(\Delta t_{mig} + 12\sigma)} \quad (\text{Equação 3.1})$$

$$\sigma = \frac{w_{50\%}}{2,35} \quad (\text{Equação 3.2})$$

sendo, $t_{mig(SCN)}$ o tempo de migração do tiocianato, Δt_{mig} diferença no tempo de migração do tiocianato e iodeto, e σ o alargamento do pico, e $w_{50\%}$ a largura do pico a meia altura. Os valores de $t_{mig(SCN)}$, Δt_{mig} , $w_{50\%}$, foram obtidos do *software PeakMaster* simulando a separação de iodeto e tiocianato (condições da simulação ver Figura 3.5). O valor de $w_{50\%}$ para o tiocianato (pico mais largo, portanto é o limitante da resolução) obtido do eletroferograma simulado foi 0,24 s, e os tempos de migração do iodeto e do tiocianato foram 9,96 e 10,98 s, respectivamente. Esses valores foram usados para calcular um η_S de 4,89. Como o valor obtido não é um número inteiro seria prudente escolher o número quatro como máximo de plugues injetados, para não comprometer a resolução. A simulação também permite estimar o tempo de eletrólito espaçador para separar os picos dos plugues injetados. Para isso deve ser calculado o tempo de eletroforese parcial de separação entre dois pares de picos (t_{PE} – Figura 3.5), $t_{PE} = (\Delta t_{mig} + 12\sigma)$, o qual representa uma separação suficiente entre esses pares de picos vizinhos com uma boa resolução. Considerando o número de plugues injetados igual a 4 ($n = 4$), pode-se calcular ou prever o tempo de migração do tiocianato do plugue P3 (injetado antes do P4, o qual representa o par de picos de uma injeção simples simulada), da seguinte maneira:

$$t_{mig(SCN)(Pn-1)} = t_{mig(SCN)(Pn)} - t_{PE} \quad (\text{Equação 3.3})$$

onde, $t_{mig(SCN)(Pn-1)}$ é o tempo de migração do tiocianato do plugue P3, $t_{mig(SCN)(Pn)}$ é o tempo de migração do tiocianato do plugue P4. Assim o tempo de migração previsto para o tiocianato transferido (plugue P3) foi de 8,73 s. Com o $t_{mig(SCN)(Pn-1)}$ é possível calcular o tempo de introdução do plugue para que o tiocianato seja detectado exatamente nesse tempo previsto. Isso é possível utilizando as seguintes equações:

$$t_{mig(SCN)(Pn-1)} = \frac{L_{det} - L_{inj}}{\mu_{SCN} E} \quad (\text{Equação 3.4})$$

sendo que,

$$L_{inj} = \frac{\Delta P t_{int} r^2}{8 L_{tot} \eta} \quad (\text{Equação 3.5})$$

$$\mu_{SCN} = (\mu_{eo} + \mu_{eff}) \quad (\text{Equação 3.6})$$

substituindo as Equações 3.5 e 3.6 na Equação 3.4, tem-se:

$$t_{mig(SCN)(Pn-1)} = \frac{L_{det} - \left(\frac{\Delta P t_{int} r^2}{8 L_{tot} \eta} \right)}{(\mu_{eo} + \mu_{eff}) E} \quad (\text{Equação 3.7})$$

rearranjando,

$$t_{int} = \left(\frac{8 L_{tot} \eta}{\Delta P r^2} \right) [L_{det} - (t_{mig(SCN)(Pn-1)} E \{ \mu_{eo} + \mu_{eff} \})] \quad (\text{Equação 3.8})$$

onde $t_{migSCN(Pn-1)}$ e t_{int} são o tempo de migração do tiocianato do plugue transferido e tempo de introdução desse plugue, respectivamente, em segundos; L_{det} , L_{inj} e L_{tot} , o comprimento do capilar até o detector, comprimento da introdução do plugue injetado e comprimento total do capilar, respectivamente, em metro; μ_{SCN} , μ_{eo} e μ_{eff} , mobilidade aparente do tiocianato, mobilidade do fluxo eletrosmótico e mobilidade efetiva do tiocianato, respectivamente, em $m^2 V^{-1} s^{-1}$; E campo elétrico aplicado em $V m^{-1}$; ΔP pressão de injeção igual a $4996,2 N m^{-2}$ ($99,92 N m^{-2} = 1 mbar$); η a viscosidade da solução a $25 ^\circ C$ igual a $8,9 \times 10^{-4} N s m^{-2}$ (BERSTAD *et al.*, 1988). Assumindo valores para cada condição na Equação 3.8 (demais condições ver Figura 3.5), o valor calculado de t_{int} do plugue P3 foi de 13,98 s. Sabendo-se que o tempo de introdução é dado por:

$$t_{int} = \Sigma t_{inject} + \Sigma t_{espa} \quad (\text{Equação 3.9})$$

$$t_{int} = (t_{inject-P1} + t_{inject-P2} + t_{inject-P3} + t_{inject-P4}) + (t_{espa-P1/P2} + t_{espa-P2/P3} + t_{espa-P3/P4})$$

onde t_{inject} é o tempo de injeção do plugue e t_{espa} é o tempo de espaçador usado. Com isso, estimando-se um tempo de injeção de cada plugue de 3 s (tempo pequeno de injeção, porém suficiente para um bom sinal do

analito já que o iodeto está em uma elevada concentração nas amostras), o tempo de espaçador entre os dois plugues P3 e P4 deveria ser:

$$t_{espa-P3/P4} = t_{int} - (t_{inject-P3} + t_{inject-P4}) \quad (\text{Equação 3.10})$$

Usando a Equação acima, foi calculado um espaçador de 8 s. Esse mesmo valor de espaçador foi usado como tempo de espaçador entre os plugues nas simulações da injeção múltipla. Com o tempo de introdução de cada um dos plugues, $t_{int-P4} = 3$ s, $t_{int-P3} = 14$ s, $t_{int-P2} = 25$ s e $t_{int-P1} = 36$ s, é possível calcular o L_{det} para cada plugue transferido e usar esse valor no *software PeakMaster* para simular as separações dos quatro plugues injetados. $L_{det(Pn)} = L_{det} - L_{inj(Pn)}$ e sabendo-se que L_{inj} é dado pela Equação 3.5, nas mesmas condições estipuladas, logo: $L_{det(P4)} = 8,28$ cm, $L_{det(P3)} = 6,58$ cm, $L_{det(P2)} = 5,07$ cm e $L_{det(P1)} = 3,57$ cm. O esquema representando as injeções múltiplas (etapas de injeção e tamanhos dos plugues de amostra e espaçador) e os eletroferogramas simulado e experimental obtidos com este modo de injeção estão apresentados nas Figuras 3.4 e 3.5, respectivamente. A comparação entre o eletroferograma simulado e os eletroferogramas obtidos para um padrão e uma amostra mostrou uma boa proximidade dos eletroferogramas previsto e experimental. Apenas um pequeno ajuste no tempo do primeiro eletrólito espaçador usado foi necessário em relação ao valor calculado (calculado 8 s; experimental 7 s). Com os bons resultados de separação obtidos para a injeção múltipla foi possível incluir esse modo de injeção como opção para ser testada na otimização de uma estratégia de injeção para o desenvolvimento de um método rápido de análise.

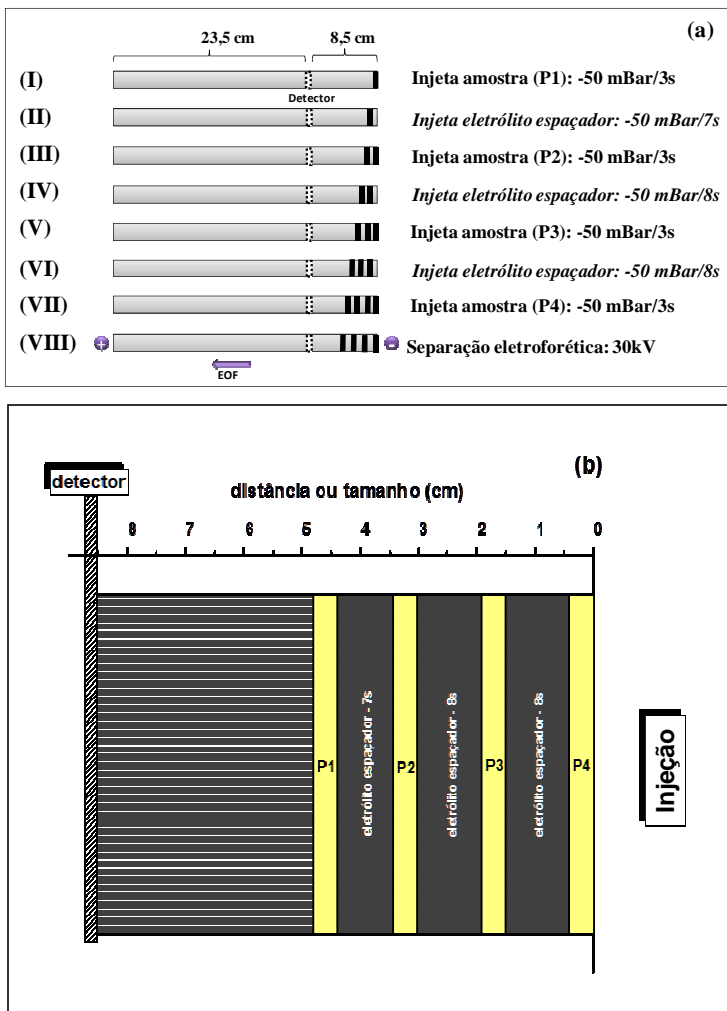


Figura 3.4 (a) Esquema representando o procedimento de injeção múltipla MSLava usado experimentalmente, e (b) tamanho dos plugues injetados e distância para o detector no método de injeção múltipla. Legenda: P1 – primeiro plugue injetado, P2 – segundo plugue injetado, P3 – terceiro plugue injetado, P4 – quarto plugue injetado.

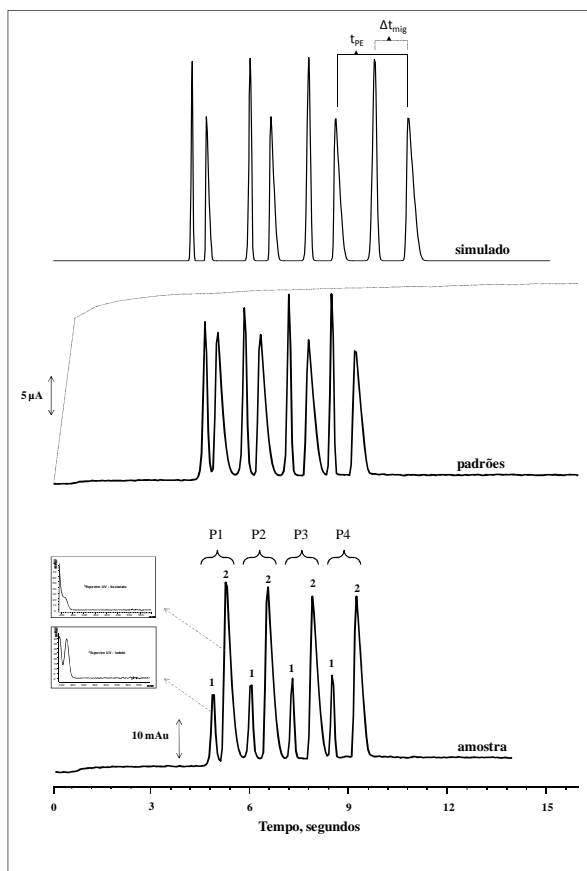


Figura 3.5 Electroferogramas resultantes do método de injeção múltipla MSLava: simulado (usando *software PeakMaster*); injeção de padrões (iodeto 63 mg L^{-1} e tiocianato 58 mg L^{-1}); injeção de amostra (iodeto cerca de 15 mg L^{-1} e tiocianato 58 mg L^{-1}). Condições experimentais: eletrólito Tris 20 mmol L^{-1} e ácido clorídrico 11 mmol L^{-1} ; pH 8,1; tensão 30 kV; L_{det} 8,5 cm, L_{tot} 32 cm x 50 μm (DI); e na simulação condições idênticas usando μ_{eo} $-16 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Legenda dos picos: 1- iodeto, 2- tiocianato; P1 – primeiro plugue injetado, P2 – segundo plugue injetado, P3 – terceiro plugue injetado, P4 – quarto plugue injetado.

3.4.1.4.2 Minimização do tempo instrumental de análise usando diferentes modos de injeção

Para avaliar a melhor estratégia de injeção com o objetivo de ter um máximo número de amostras analisadas por hora foi observado o tempo instrumental de análise (TIA) para cada modo de injeção testado (Slava e SSLava; Mlava e MSlava, injetando quatro plugues). Os valores do TIA obtidos para os diferentes modos de injeção testados, estão reunidos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Tempo instrumental de análise (TIA) pelos diferentes modos de injeção.

Modo	Número de plugue	TIA (min)	Tempo para cada amostra (min)	Número de amostras analisadas por hora
Slava ^(a)	1	1,68	1,68	35
Mlava ^(a,b)	4	3,89	0,972	61
SSLava	1	0,783	0,783	76
MSlava ^(b)	4	2,99	0,747	80

^(a) Resultados expressos como a média dos tempos medidos em triplicata e tempo de lavagem 0,42 min.

^(b) Tempos de eletrólito espaçador: 7 s; 8 s; 8 s.

A análise dos resultados revelaram que o maior número de amostras injetadas por hora foi observado com injeção MSlava, atingindo um valor de até 80 injeções h⁻¹. Também foram realizados ensaios alternando as posições dos frascos no porta amostras do equipamento para avaliar a influência desse fator no TIA. Para isto foram colocados 4 frascos em diferentes posições dos quatro setores do porta amostras do equipamento (posições: 08, 09, 10, 11, 20, 21, 30, 31, 40 e 41). Os resultados do TIA de seis combinações diferentes de posições medidas em triplicata revelaram que o coeficiente de variação

dos tempos medidos foi menor que 1,2% mostrando que o TIA independe das posições ocupadas pelos frascos no equipamento. Uma estimativa do tempo gasto com cada etapa da análise para a injeção MSlava revelou que a lavagem requer 23% (54 s) do TIA, a injeção 72% (168 s) e o tempo de separação necessário para a migração diferenciada dos oito picos (iodeto e PI) apenas 5% (12 s). Com isso é possível mostrar claramente que a maior parte do tempo gasto do TIA está atrelada a velocidade instrumental de permuta dos frascos durante a injeção e lavagem, e que uma maior diminuição do tempo gasto na separação eletroforética não implicaria em ganhos significativos no TIA, isto é, o efeito do tempo de separação eletroforética no TIA foi totalmente maximizado.

3.4.1.3 Injeção múltipla sequencial de uma amostra de xarope

Para avaliar a possibilidade de emprego da injeção múltipla sequencial através do método MSlava para uma amostra foi realizado um experimento injetando 20 vezes uma amostra de xarope diluída contendo padrão interno e os eletroferogramas sobrepostos obtidos estão apresentados na Figura 3.6. Na verificação do desempenho do método observou-se que foi necessário deixar a corrida um pouco mais de tempo, até cerca de 21 s de separação, para evitar que os picos do analito não migrassem sobre os picos do EOF, apesar de no comprimento de onda da detecção empregado a absorvidade desses picos ser muito baixa. Esse tempo a mais de corrida faz com que os picos do EOF se aproximem do detector, devido a mobilidade do EOF, e com a sequência de plugues injetadas na próxima análise esses picos são empurrados para depois do detector antes do início da aquisição da corrida sem interferir no método. Assim, com esse pequeno acréscimo no tempo de separação o número de amostras analisadas por hora ficou em 77, mantendo a elevada frequência analítica do método e indicando sua aplicabilidade.

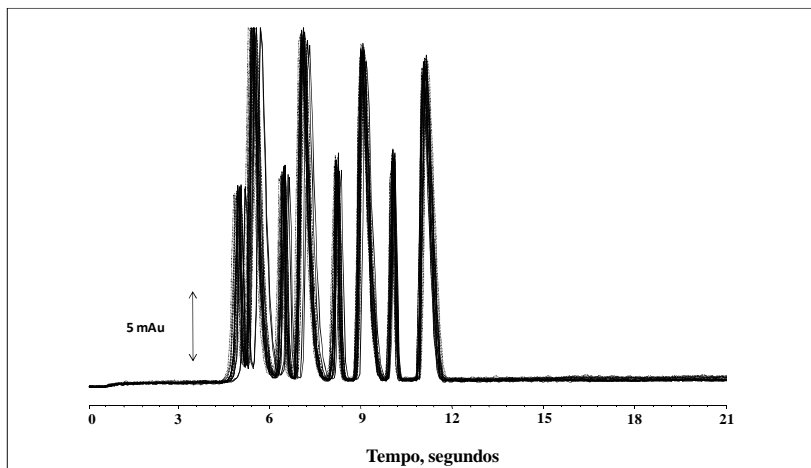


Figura 3.6 Eletroferogramas sobrepostos de uma amostra de xarope injetada 20 vezes usando o método MSlava otimizado. Condições experimentais: ver seção experimental.

3.4.2 Desempenho analítico do método

A avaliação do método proposto otimizado para a determinação de iodeto em formulações farmacêuticas foi realizada de acordo com as diretrizes do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) utilizando os parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e seletividade. Também foi avaliada a conformidade do sistema.

A avaliação da seletividade do método proposto foi realizada empregando o método de adição de padrão e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Verificação da seletividade do método para a determinação de iodeto em amostras de xarope usando adição de padrão. Dados adquiridos em 220 nm.

Parâmetro	n		Valor
Recuperação (%)	2	adicionado 12,7 mg L ⁻¹	102
Recuperação (%)	2	adicionado 25,4 mg L ⁻¹	99,6
Recuperação (%)	2	adicionado 38,1 mg L ⁻¹	99,5
Recuperação (%)	2	adicionado 50,8 mg L ⁻¹	100

* Experimentos de adição e recuperação realizados usando uma amostra de xarope diluída 1000 vezes. Resultados de duas preparações. $R^2 = 0,996$.

Para verificar a seletividade foram comparadas as inclinações da curva de adição de padrão ($0,0239 \pm 0,0014$) e da curva de calibração externa ($0,0252 \pm 0,0002$). O teste-*t* mostrou que as inclinações das retas são estatisticamente iguais ($t_{calc} = 1,3$ e $t_{critic} = 4,3$, com nível de confiança de 95%). A boa proximidade entre os coeficientes de determinação indica uma seletividade apropriada do método para análise de iodeto nas formulações farmacêuticas. Além disso, os resultados dos estudos de adição e recuperação realizados em quatro níveis de concentração mostraram uma boa concordância entre os valores individuais obtidos e os valores de referência (recuperações entre 99 e 102%), indicando que o método apresenta uma boa exatidão.

Os resultados obtidos de conformidade do sistema, de linearidade, limites de detecção e quantificação, e de precisão para o método proposto estão apresentados nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente. A eficiência de separação obtida para os quatro picos de iodeto dos plugues injetados (P1, P2, P3, P4) variou entre 15000 e 90000 pratos por metro e os picos apresentaram uma boa simetria. Também a resolução obtida entre os picos de iodeto e tiocianato foi suficiente para uma separação efetiva. A curva de calibração obtida apresentou uma boa linearidade (coeficiente de determinação $> 0,99$) em uma ampla faixa de concentração ($\sim 6,0 - 60,0$ mg L⁻¹), e limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente; calculados usando os parâmetros da curva de calibração) considerados adequados para a determinação de iodeto nas amostras. O modelo linear mostrou significância com $F > 6700$ e não apresentou falta de ajuste ($F_{calc} = 2,77$

e $F_{critic} = 4,96$, com nível de confiança de 95%). A precisão instrumental foi determinada usando uma única mistura de iodeto e tiocianato pelo modo MSlava, injetando a mesma amostra quatro vezes (plugues 1, 2, 3 e 4) para $n = 20$. O CV, tanto para a área corrigida dos picos como para o tempo de migração de cada um dos diferentes plugues, foi menor que 3,0%. Para as precisões intra-ensaio e intermediária determinadas foram observados maiores valores de CV nos tempos de migração (4,0 – 6,5%) que para a área corrigida de pico (< 4,0%). Entretanto, esses valores podem ser considerados adequados, especialmente levando em conta que o tempo de migração não depende somente da mobilidade efetiva do iodeto, mas também da precisão do sistema de pressão do equipamento que injeta os eletrólitos espaçadores para separar os plugues. A precisão intermediária foi avaliada de acordo com variações diárias (dois dias diferentes).

Tabela 3.3 Resultados de parâmetros de conformidade do método otimizado MSlava para a determinação de iodeto em amostras xarope por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	n	Valor
Número de pratos ($N\text{ m}^{-1}$) ^{(a)*}	3	15220 (P1); 23491 (P2); 46296 (P3); 90033 (P4)
Simetria de pico ^{(b)*}	3	0,771 (P1); 1,05 (P2); 0,584 (P3); 0,873 (P4)
Fator de assimetria de pico ^{(b)*}	3	1,12 (P1); 1,03 (P2); 0,905 (P3); 0,973 (P4)
Fator de cauda de pico ^{(b)*}	3	1,05 (P1); 1,02 (P2); 1,00 (P3); 0,997 (P4)
Resolução (iodeto: tiocianato) ^{(c)*}	3	0,850 (P1); 0,920 (P2); 1,10 (P3); 1,41 (P4)

(a) Número de pratos calculado de acordo com a equação $N = 16 (t_i / w_{hi})^2$, onde t_i é o tempo de migração do analito dado em min e w_{hi} é a largura de pico na base, nas mesmas unidades de t_i . Concentração de iodeto cerca de 25 mg L^{-1} .

(b) Simetria de pico obtida do *software HP Chemstation*[®], rev A.06.01. Fator de assimetria calculado usando a distância a partir do centro do pico para a cauda do pico dividido pela distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 10 % da altura máxima do pico. Fator de rejeição foi calculado usando a distância da cauda frontal do pico para a cauda do pico dividido por duas vezes a distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 5 % da altura máxima do pico.

(c) Resolução calculada usando a equação: $Rs = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, onde t é o tempo de migração do pico e w é a largura do pico na base. Concentração de iodeto cerca de 25 mg L^{-1} .

* P1, primeiro plugue injetado; P2, segundo plugue injetado; P3, terceiro plugue injetado; P4, quarto plugue injetado.

Tabela 3.4 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado MSLava para determinação de iodeto em amostras de xarope por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Valor
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^(a)	6	6,3 - 63
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^(a)		0,0252
Desvio padrão inclinação ^(a)		0,0002
Linearidade-intercepto ^(a)		0,0142
Desvio padrão intercepto ^(a)		0,0029
linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^(a)		0,999
Limite de detecção, LD (mg L ⁻¹) ^(b)		0,4
Limite de quantificação, LQ (mg L ⁻¹) ^(b)		1,2
F ^(c)		6728

^(a) Seis níveis de concentração, cada ponto da curva de calibração preparado em duplicata e medido em duplicata. Curvas de calibração com correção da área usando padrão interno.

^(b) Limites de detecção e quantificação calculados de acordo com as equações: $LD = (3,3 \times s)/S$; $LQ = (10 \times s)/S$, onde s é o desvio padrão do coeficiente linear e S é a inclinação da curva analítica, respectivamente.

^(c) $F_{crític} = 4,49$; $NGL = 17$.

Tabela 3.5 Resultados de precisão do método otimizado MSLava para determinação de iodeto em amostras de xarope por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	n	Valor
Precisão instrumental, CV (%) – área de pico	20	0,36 – 1,8 (0,60 – 0,87)
Precisão instrumental, CV (%) – tempo de migração	20	0,33 – 2,8 (0,41 – 2,1)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – área de pico	8	0,83 – 3,2 (1,3 – 2,1)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – tempo de migração	8	4,0 – 6,4 (2,3 – 6,6)
Precisão intermediária, CV (%) – área de pico	16	1,4 – 3,8 (3,0 – 3,3)
Precisão intermediária, CV (%) – tempo de migração	16	5,1 – 6,4 (3,6 – 6,3)

*Coeficientes de variação calculados com a equação: $CV = (P/\bar{u}) \times 100$, onde P é o desvio padrão absoluto e \bar{u} é a média aritmética da razão de área do analito pelo padrão interno ou a média aritmética do tempo de migração. Valores de CV para precisão instrumental medidos na mesma solução, para precisão intra-ensaio foram 8 preparações com a mesma concentração e para precisão intermediária 8 preparações em um dia e mais 8 preparações em outro dia, usando solução padrão de iodeto 25 mg L^{-1} ou uma amostra. Valores de CV entre parênteses são referentes a uma amostra de xarope diluída 1000 vezes. Faixa de CV referentes aos quatro picos de iodeto dos quatro plugues injetados (P1, P2, P3 e P4).

3.4.3 Análise de iodeto nas amostras de xarope

Os valores de concentração de iodeto determinados pelo método proposto por CE nas formulações farmacêuticas estão apresentados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Resultados da determinação de iodeto nas amostras de xarope usando o método otimizado por CE-UV.

Amostra	Concentração informada nominal (mg/5mL)	Concentração determinada (mg/5mL)	Diferença (%)
1	76,4	81,1 ± 2,7	6,1
2	76,4	81,3 ± 2,3	6,3
3	76,4	83,9 ± 2,1	9,7

* Dados obtidos em 220 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 3$ (cada amostra preparada em triplicata).

Os resultados revelaram que todas apresentaram um pequeno acréscimo de iodeto em relação ao valor informado, variando de 6,1 a 9,7%. Das três amostras analisadas apenas uma apresentava em sua composição benzoato de sódio, um componente da formulação usado como conservante. A presença do ânion benzoato na amostra pode interferir na separação de iodeto no método MSlava porque o benzoato apresenta uma mobilidade eletroforética de $33,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e nas condições de separação otimizadas migra alguns segundos depois do iodeto e tiocianato. Quando uma amostra contendo benzoato em sua composição foi injetada na posição P1 ou P2, o pico desse ânion comigrou com os picos das injeções posteriores (P3 e P4) interferindo na separação. Para contornar este problema, bastou injetar as amostras contendo benzoato nas posições P3 ou P4 e deixar a corrida até cerca de 20 s, com isso os picos do benzoato migraram depois do último pico do tiocianato do P4 (entre 13 e 16 s). Isso mostra que o método poderia ser usado para análises de controle de qualidade preferencialmente

injetando amostras com mesma composição, isto é, determinando a concentração de iodeto em amostras de lotes diferentes, mas do mesmo fabricante. Para amostras de xarope contendo composições diferentes daquelas analisadas no presente estudo deveria ser feita uma verificação da possibilidade de aplicar o método MSlava para atestar a ausência de picos interferentes ou se necessário adaptar o método proposto como foi feito no caso da amostra contendo benzoato na formulação.

3.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um método de separação rápido por CE usando injeções múltiplas sequenciais pela extremidade do capilar mais próxima do detector em um capilar revestido com SAQQ para determinar iodeto em formulações farmacêuticas. As simulações usando o *software PeakMaster* permitiram, além da seleção adequada dos componentes do eletrólito, prever com boa proximidade o eletroferograma experimental auxiliando na otimização dos tempos de eletrólito espaçador para o método de injeção múltipla. Na estratégia de desenvolvimento do método rápido para análise de iodeto o revestimento com SAQQ para gerar um EOF anódico mostrou ser simples e fácil de fazer, além de apresentar uma boa estabilidade. Também o modo de injeção MSlava otimizado contribuiu significativamente para a elevada frequência analítica obtida no método. Além disso, foi observado que a velocidade instrumental limitou a frequência analítica do método. Assim, uma melhora na tecnologia dos equipamentos de CE poderia contribuir para aumentar ainda mais a essa frequência analítica. A verificação analítica do método MSlava mostrou uma boa linearidade ($R^2 > 0,999$); limite de detecção de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$; precisão intermediária melhor que 3,8% (área de pico) e valores de recuperação variando de 99 a 102%. O método foi aplicado na quantificação de iodeto em três amostras de xarope, sendo que os valores determinados foram superiores aos valores informados pelos fabricantes. O rápido método proposto mostrou ter potencial para aplicações em análises de controle de qualidade de formulações farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

AMINI, A.; LODÉN, H.; PETTERSSON, C.; ARVIDSSON, T. Principles for different modes of multiple-injection CZE. *Electrophoresis*, v. 29, p. 3952–3958, 2008.

BERSTAD, D. A.; KNAPSTAD, B.; LAMVIK, M.; SKJØLSVIK, P. A.; TØRKLEP, K.; ØYE, H. A. Accurate measurements of the viscosity of water in the temperature range 19.5 – 25.5 °C. *Physica A*, v. 151, p. 246-280, 1988.

FDA. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001. Guidance Potassium Iodide as a Thyroid Blocking Agent in Radiation Emergencies. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM080542.pdf>> Acesso em: 20 nov. 2010.

GEISER, L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Decreasing analysis time in capillary electrophoresis: Validation and comparison of quantitative performances in several approaches. *Electrophoresis*, v. 26, p. 2293–2302, 2005.

GEISER, L.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Decreasing Validation of capillary electrophoresis – mass spectrometry methods for the analysis of a pharmaceutical formulation. *Electrophoresis*, v. 24, p. 3049–3056, 2003.

HU, W.; YANG, P.-J.; HASEBE, K.; HADDAD, P. R.; TANAKA, K. Rapid and direct determination of iodide in seawater by electrostatic ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 956, p. 103–107, 2002.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Disponível em <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/

ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
> Acesso em: 12 mar. 2011.

LODÉN, H.; AMINI, A. Quantification of buserelin in a pharmaceutical product by multiple-injection CZE. *Electrophoresis*, v. 28, p. 1548–1556, 2007.

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

MATYSIK, F.-M. Advances in fast electrophoretic separations based on short capillaries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 961–965, 2010.

MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O.; HELLER, M.; BARCELLOS, M.; PIOVEZAN, M.; CAON, T.; OLIVEIRA, M. A. L. Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol—Total analysis time reduction strategies. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7957-7961, 2009.

NACAPRICHA, D.; URAISIN, K.; RATANAWIMARNWONG, N.; GRUDPAN, K. Simple and selective method for determination of iodide in pharmaceutical products by flow injection analysis using the iodine–starch reaction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, p. 816–821, 2004.

OPEKAR, F.; COUFAL, P.; ŠTULÍK, K. Rapid Capillary Zone Electrophoresis Along Short Separation Pathways and Its Use in Some Hyphenated Systems: A Critical Review. *Chemical Reviews*, v. 109, p. 4487–4499, 2009.

PALIULIONYTE, V.; PADARAUSKAS, A. Single-run capillary electrophoretic speciation of iodide and iodine. *Analytica Chimica Acta*, v. 466, p. 133–139, 2002.

PEAKMASTER: *software* livre. Versão 5.3. Disponível em: <<http://web.natur.cuni.cz/gas/>> Acesso em: 05 mar. 2011.

REBARY, B.; PAUL, P.; GHOSH, P. K. Determination of iodide and iodate in edible salt by ion chromatography with integrated amperometric detection. *Food Chemistry*, v. 123, p. 529–534, 2010.

RONG, L.; TAKEUCHI, T. Determination of iodide in seawater and edible salt by microcolumn liquid chromatography with poly(ethylene glycol) stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v. 1042, p. 131–135, 2004.

STAUB, A.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L.; SCHAPPLER, J. Multiple injection technique for the determination and quantitation of insulin formulations by capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 8041–8047, 2010.

TAVARES, M.F.M.; JAGER, A.V.; SILVA, C.L.; MORAES, E.P.; PEREIRA, E.A.; DE LIMA, E.C.; FONSECA, F.N.; TONIN, F.G.; MICKE, G.A.; SANTOS, M.R.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; DE MORAES, M.L.L.; VAN KAMPEN, M.H.; FUJIYA, N.M. Applications of Capillary Electrophoresis to the Analysis of Compounds of Clinical, Forensic, Cosmetological, Environmental, Nutritional and Pharmaceutical Importance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, p. 281-290, 2003.

XIE, Z.; ZHAO, J. Reverse flow injection spectrophotometric determination of iodate and iodide in table salt. *Talanta*, v. 63, p. 339–343, 2004.

CAPÍTULO 4 – MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE BETAINA E METIONINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR ELETROFORESE CAPILAR EMPREGANDO CAPILAR MODIFICADO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA RETICULADO E κ -CARRAGENA

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

Aminoácidos são moléculas que estão envolvidas em uma gama de atividades biológicas em grande parte dos organismos vivos, incluindo processos metabólicos normais no homem, e estão especialmente relacionados ao metabolismo de proteínas (MÉTAYER; *et al.*, 2008; FUCHS *et al.*, 2005). Os aminoácidos estão presentes em diversos tipos de amostras incluindo alimentos e fluidos biológicos e também são amplamente usados como ingredientes de suplementos alimentares e produtos farmacêuticos (FRIEDMAN; 1999; SCHUSTER; 1988; GIOIA *et al.*, 2007). Nesse último tipo de amostra muitas técnicas são empregadas para análise de aminoácidos principalmente cromatografia líquida (BRFICKNER; WESTHAUSER; GODEL, 1995; GATTI *et al.*, 2004; GOTTI *et al.*, 2006; GIOIA *et al.*, 2006; ZACHARIS; THEODORIDIS; VOULGAROPOULOS, 2006; GIOIA *et al.*, 2007; KOSTARNOI *et al.*, 2008) e eletroforese capilar (CAVAZZA *et al.*, 2000; YEH; JIANG; HIS, 2004; CHENG *et al.*, 2005; HO; WU, 2006; ALTRIA; MARSH; SÄNGER-VAN DE GRIEND, 2006; IADAROLA *et al.*, 2008), com diversos tipos de detectores como fotométrico, massas e fluorescência. Muitos destes métodos foram desenvolvidos para determinação de diversos aminoácidos nas amostras e, na maioria dos casos, necessitam de elevado tempo de separação dos analitos. Além disso, alguns empregam procedimentos de derivatização dos analitos para posterior análise com o intuito de aumentar a detectabilidade. Apesar de em alguns casos estes procedimentos de preparo das amostras serem necessários, normalmente envolvem reagentes caros e requerem determinado tempo de reação, assim acabam por aumentar o custo e o tempo gasto em cada análise.

Entretanto, dependendo dos aminoácidos presentes na amostra e, principalmente, da sua concentração, essa etapa poderia ser eliminada e substituída por uma simples diluição da amostra. Um exemplo é na análise de hepatoprotutores que contém apenas os aminoácidos metionina e betaina, os quais são ativadores do sistema hepático (BARAK; BECKENHAUER; TUMA, 1996; LEVER; SLOW, 2010). Nestas amostras normalmente as concentrações dos analitos é elevada, sendo desnecessário limites de detecção extremamente baixos. Assim, a CE com detecção fotométrica na região do ultravioleta representa uma boa opção como técnica analítica para separação e determinação destes compostos, especialmente devido à presença do grupo funcional carbonila na estrutura química dos aminoácidos capaz de absorver radiação eletromagnética em comprimentos de onda próximos a 185 nm permitindo a sua detecção direta (ALTRIA; MARSH; SÄNGER-VAN DE GRIEND, 2006). Além disso, com esta técnica existe a possibilidade de desenvolvimento de métodos rápidos com pouco ou nenhum tratamento das amostras o que facilita o processo analítico. Isso contribui para análises de controle de qualidade onde normalmente um número elevado de amostras precisa ser analisado. A betaína é um aminoácido composto por um grupo amino quaternário e um ácido carboxílico, apresentando comportamento zwitteriônico dependendo do pH da solução em que se encontra (LI; HILL; JONES, 2010). O pKa do grupo carboxílico é cerca de 1,8, assim em pH acima de 2,8 a molécula fica neutra, devido o surgimento da carga negativa no grupo carboxílico e a presença da carga positiva permanente do grupo amino quaternário. Por isso, é preciso ter um pH baixo o suficiente para protonar parcialmente o grupo ácido e promover o surgimento de uma carga resultante positiva do grupo amino quaternário fazendo com que a molécula adquira mobilidade suficiente para migrar diferencialmente do tempo de migração do EOF. A mobilidade do EOF em um capilar de sílica não revestido é fortemente dependente do pH do eletrólito, sendo que em pH elevados ($\text{pH} > 8$) são observados valores de EOF muito maiores que em pH baixos ($\text{pH} < 4$) onde o EOF apresenta intensidade muito baixa ou próxima de zero (KIRBY; HASSELBRINK JR, 2004). Assim, no desenvolvimento de um método de separação destas moléculas a condição de pH baixo requerida para que apresentem carga positiva não contribui para um elevado valor do EOF (EOF com baixa intensidade em pH ácido), o que resultaria em uma separação mais

rápida. Nesse caso é interessante que o EOF seja elevado em pH baixo. Uma maneira de obter essa condição especial para o EOF poderia ser com a utilização de capilares modificados. Diferentes métodos de modificação da superfície de capilares, e, portanto de alteração do EOF, vem sendo cada vez mais estudados, especialmente modificações não covalentes (LUCY; MACDONALD; GULCEV, 2008). A maioria tem como propósito modificar a superfície do capilar com a finalidade de minimizar interações indesejáveis de analitos ou componentes da matriz das amostras com a superfície de sílica. Entretanto, essas modificações também podem ser realizadas para contribuir com o desenvolvimento de metodologias de separações rápidas, com tempos menores que um minuto. Recentemente um capilar modificado com QTS reticulada foi empregado no desenvolvimento de um método para separação de nitrato e tiocianato em saliva humana (VITALI; FÁVERE; MICKÉ, 2011). O propósito do tratamento do capilar foi prevenir a adsorção de proteínas e promover uma rápida separação dos analitos. Em outro trabalho a modificação do capilar foi realizada com sal de quitosana quaternizada objetivando a determinação de iodeto em formulações farmacêuticas no modo co-eletrosmótico resultando em separações de apenas alguns segundos (VITALI *et al.*, 2011). As características destas modificações com polímeros catiônicos que alteram as propriedades da parede interna de um capilar de sílica e principalmente a simplicidade de preparo destas modificações abrem a possibilidade para o desenvolvimento de novos revestimentos com utilização também de polímeros aniônicos. Com estes novos revestimentos diferentes perfis de EOF podem ser obtidos e aplicados no desenvolvimento de métodos de separação por CE para análise de moléculas que requeiram condições especiais, trazendo vantagens como aquelas citadas das modificações descritas anteriormente.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é desenvolver um método rápido de separação para analisar betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE. Para isso será utilizando um novo capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena.

4.2.2 Objetivos Específicos

- selecionar as condições de separação do método para determinação de betaina e metionina, assim como, componentes do eletrólito de corrida, padrão interno, tensão de separação, tempo de injeção, usando o capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena;
- comparar a separação de betaina e metionina usando o método otimizado em um capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena e um capilar não revestido;
- verificar a possibilidade de aumento da frequência analítica do método por injeção sequencial e determinar o tempo instrumental de análise para o método otimizado;
- avaliar o método proposto para quantificação de betaina e metionina em amostras de hepatoprotetor determinando os parâmetros: seletividade; limites de detecção e quantificação; precisão instrumental, intra-ensaio e intermediária; resolução e número de pratos; entre outros;
- empregar o método desenvolvido na análise de betaina e metionina em amostras de hepatoprotetor e comparar os resultados com análises por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas em “*Tandem*” (LC-MS/MS, do inglês “*Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*”).

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e soluções empregadas no revestimento do capilar com SAQQ reticulado e κ -carragena estão descritos no Capítulo 2. Ácido fosfórico e Tris adquiridos da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), e etanol absoluto (99,9%) adquirido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), foram usados para preparar o eletrólito de corrida. Cloridrato de betaina (99%), L-metionina (98%) e cloridrato de L-histidina (padrão interno – PI; 98%) foram adquiridos da Sigma (São Paulo, SP, Brasil). Soluções padrão estoque de betaina (10000 mg L^{-1}), metionina (2500 mg L^{-1}) e histidina (2500 mg L^{-1}), foram preparadas com água deionizada. As soluções de calibração de betaina e metionina foram preparadas por diluição das soluções estoque. Água deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), com resistividade de $18,2 \text{ M } \Omega \text{ cm}$, foi usada para preparar todas as soluções.

Para o método comparativo usando LC-MS/MS acetonitrila grau HPLC adquirida da J.T.Baker (México) e água deionizada foram usadas para compor a fase móvel. Soluções padrão estoque de betaina (10 mg L^{-1}) e metionina (10 mg L^{-1}), foram preparadas em água deionizada. As soluções de calibração de betaina e metionina foram preparadas por diluição das soluções estoque com água deionizada e diluídas 1:1 com acetonitrila antes da injeção no LC-MS/MS.

4.3.2 Preparo das amostras e sistema de eletroforese capilar

Dez amostras de hepatoprotetor na forma de frascos, oriundas de diferentes marcas e diferentes lotes, foram compradas em farmácias do mercado local. Antes das análises por CE as amostras foram preparadas por duas diluições: primeiro as amostras foram diluídas em uma razão 1:25 com água deionizada em balões volumétricos, a depois diluídas 1:1 com solução contendo histidina 100 mg L^{-1} (PI) e etanol 60% (v/v) (solução injetada com concentração final de PI 50 mg L^{-1} e

etanol 30%). As amostras foram preparadas em duplicata e injetadas em duplicata.

Para otimizar a separação de betaina e metionina, todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies modelo CE 7100 (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas para quantificação de betaina e metionina foram realizadas em 195 nm, com temperatura controlada de 25°C usando um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato proveniente da empresa Microtube (Araraquara, Brasil) com 32 cm de comprimento total (8,5 cm até o detector) x 50 µm DI x 365 µm DE. O capilar usado no desenvolvimento do método foi revestido com SAQQ reticulado e κ-carragena conforme descrito anteriormente (ver parte experimental do Capítulo 2). O eletrólito de corrida usado para determinar as concentrações de betaina e metionina nas amostras foi composto de Tris 10 mmol L⁻¹, etanol 10% (v/v) e pH ajustado para 2,1 com ácido fosfórico. Os padrões e as amostras foram introduzidos na parte mais curta do capilar até o detector e injetados por pressão hidrodinâmica negativa de 50 mbar durante 3 s. A tensão de separação aplicada foi de 28 kV com polaridade positiva na injeção. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados utilizando o *software Chemstation*[®].

4.3.3 Método comparativo usando LC-MS/MS

As amostras de hepatoprotector foram preparadas usando diluições sucessivas com água deionizada e antes das análises por LC-MS/MS foram diluídas 1:1 com acetonitrila (amostras injetadas com diluição final de 60.000 vezes). As amostras foram preparadas em duplicata e injetadas em duplicata. O método usando LC-MS/MS foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 Series da marca Agilent Technologies (Germany). As separações foram feitas utilizando uma coluna SeQuant™ ZIC®-HILIC (150 mm de comprimento; 2,1 mm de diâmetro interno; 3,5 µm de tamanho de partícula) da marca Merck (Darmstadt, Germany). As separações de betaina e metionina foram feitas no modo isocrático usando uma fase móvel composta por 70% de água e 30% de acetonitrila. A vazão da fase móvel foi de 100 µL min⁻¹. O volume de injeção das amostras e padrões foi 2 µL. A temperatura da coluna foi fixada em 30 °C. O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadrupolo e íon trap linear, modelo Q Trap 3200 da Applied Biosystems (Concord, Canada). O *software Analyst* versão 1.5.1 foi usado para controlar o LC-MS/MS e fazer o tratamento dos dados obtidos nas análises. Os experimentos foram realizados usando a fonte TurboIonSpray™ (electrospray-ESI) no modo íon positivo. A agulha do capilar foi mantida a 5500 V. Alguns dos parâmetros do espectrômetro de massas: curtain gas, 10 psi; temperatura, 350 °C; gas 1, 45 psi; gas 2, 45 psi; gás da dissociação induzida por colisão (CAD, do inglês “*Collisionally Activated Dissociation*”), médio. Outros parâmetros para o cone e energia da célula de colisão estão listados na Tabela 4.1. A betaina e metionina foram monitoradas e quantificadas usando monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês “*Multiple Reaction Monitoring*”). A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de solução aquosa contendo os dois analitos de interesse.

Tabela 4.1 Parâmetros do espectrômetro de massas.

Parâmetro	Analitos	
	betaina	metionina
íon precursor (m/z)	118,086	150,115
íon quantitativo	59,0	104,1
DP*	36	21
EP*	4,0	5,5
CEP*	10	10
CE*	23	13
CXP*	4	4

* DP- Declustering Potential; EP- Entrance Potential; CEP- Collision Cell Entrance Potential; CE- Collision Energy; CXP- Collision Cell Exit Potential.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.4.1 Desenvolvimento do método para separação de betaina e metionina

4.4.1.1 Seleção dos componentes do eletrólito de corrida e padrão interno

O desenvolvimento de um método rápido com detecção direta por CE depende de diferentes fatores. Um destes fatores é a escolha dos componentes do eletrólito que deve ser conduzida levando em consideração as curvas de mobilidade dos analitos de interesse e suas características estruturais que irão influenciar na detectabilidade. As curvas de mobilidade da betaina e metionina estão apresentadas na Figura 4.1.

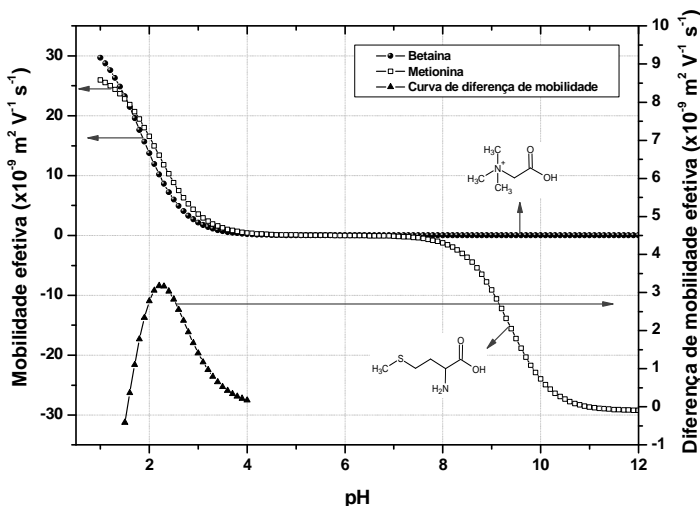


Figura 4.1 Curvas de mobilidade efetiva da betaina e metionina, e curva da diferença de mobilidade efetiva entre as duas moléculas, feitas utilizando o simulador Simul (MICKÉ, 2004). Dados: betaina $pK_a = 1,83$ e $\mu = 34,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (mobilidade determinada por pressão usando $10 \text{ kV}/0,75 \text{ min}$, eletrólito ácido fosfórico 22 mmol L^{-1} , força iônica 10 mmol L^{-1} , $\text{pH } 2,0$); metionina $pK_{a1} = 2,17$ e $\mu = 27,7 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $pK_{a2} = 9,34$ e $\mu = -29,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (dados obtidos do software *PeakMaster*).

É possível perceber que a diferença de mobilidade entre os dois analitos é pequena e ambos apresentam mobilidade positiva apenas em pH bem baixos ($\text{pH} < 3$). De acordo com a curva de diferença de mobilidade entre os analitos, o pH adequado para a separação deveria ser de 2,0 a 2,5, pois é nessa faixa que se verifica o máximo de diferença de mobilidade. Entretanto, em pH mais próximos de 2,5 a mobilidade dos analitos é muito baixa ($< 10 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e isso faz com que os picos dos analitos migrem muito próximos do pico do EOF, podendo ocorrer problemas de resolução, especialmente da betaina que tem a mobilidade mais baixa. Isso ocorre, pois em pH tão baixos outras moléculas presentes nas formulações que absorvem radiação no UV, como os conservantes metilparabeno e propilparabeno, migram como

espécies neutras exatamente no tempo do EOF fazendo com que o pico do EOF apresente uma grande área com uma baixa eficiência. Sendo assim, para prevenir possíveis problemas de resolução foi escolhido o pH do eletrólito como sendo 2,1, no qual se observam valores de mobilidade elevados para as espécies com uma boa diferença entre essas mobilidades. Nesse pH tão baixo um ácido que pode ser o contra-íon selecionado para compor o eletrólito por apresentar um de seus pKa com valor de cerca de 2,16, e portanto conferir capacidade tamponante para o eletrólito, é o ácido fosfórico. A seleção do co-íon componente do eletrólito para a separação e detecção direta da betaina e metionina foi realizada buscando uma molécula que não absorva radiação UV no mesmo comprimento de onda dos analitos para não interferir na detecção. Assim, o co-íon escolhido foi o Tris, pois não apresenta em sua estrutura grupos carbonila, grupos esses que permitem a detecção direta dos analitos, especialmente da betaina em 195 nm. O padrão interno adequado selecionado para ser empregado no método sem comprometer o tempo de separação dos analitos foi a histidina. Selecionados os componentes do eletrólito e padrão interno foi realizada uma corrida experimental com um eletrólito composto por 10 mmol L⁻¹ de Tris e pH ajustado para 2,1 com ácido fosfórico. A concentração de Tris foi essa para ter uma quantidade mínima de co-íon no eletrólito e não ser preciso uma concentração muito elevada de ácido fosfórico a fim de atingir o pH desejado, para a força iônica do eletrólito não ser muito alta. Assim, esse eletrólito apresentou uma condutividade menor que 0,4 S m⁻¹, força iônica cerca de 18 mmol L⁻¹ e capacidade tamponante próxima a 40 mmol L⁻¹. Quando essa condição de separação foi testada no capilar revestido com SAQQ reticulado e κ-carragena injetando uma amostra foi verificado no eletroferograma a co-migração dos analitos. Isso ocorreu devido a diferença de mobilidade entre os analitos ser pequena, além do elevado valor de mobilidade do EOF que não contribuiu para uma separação efetiva desse analitos. Uma alternativa para resolver o problema foi realizar um ajuste para reduzir o EOF do capilar modificado. Essa redução do EOF foi feita com adição de etanol no eletrólito. Também foi adicionado etanol na amostra para ajustar a condutividade do plugue assegurando a eficiência de separação dos analitos.

4.4.1.2 Influência do solvente orgânico, tensão e tempo de injeção na separação

O efeito da porcentagem de etanol adicionado na amostra e no eletrólito de corrida para melhorar a separação da betaina e metionina no capilar modificado em um menor tempo possível foi realizado. Na Figura 4.2 está apresentada a resolução (betaina e metionina) e a relação de tempo de separação (valores de $1/\text{tempo de migração da betaina}$) para as diferentes condições testadas e na Figura 4.3 estão alguns eletroferogramas referentes a estas condições.

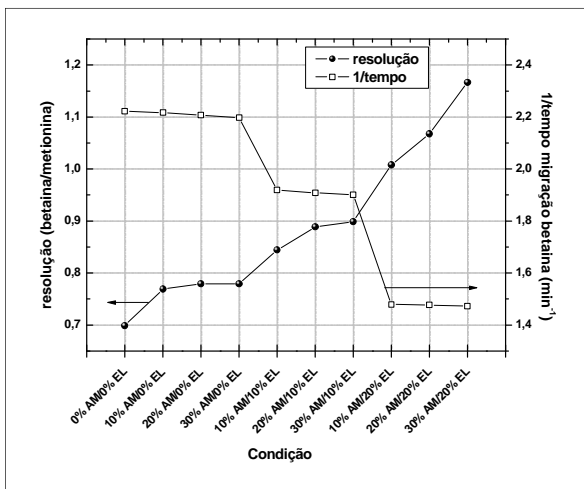


Figura 4.2 Otimização da concentração de etanol (em porcentagem) na amostra e no eletrólito de corrida (resultados de resolução e 1/tempo de migração da betaina). Condições de separação: capilar 32 cm (L_{tot}) \times 50 μ m (DI) revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena; eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹, diferentes porcentagens de etanol e pH ajustado para 2,1 com ácido fosfórico; tensão 28 kV; injeção 50 mbar/3s na extremidade mas curta do capilar até o detector; tempo de lavagem com eletrólito entre corridas 3 min. Os dados foram adquiridos em 195 nm. Amostra injetada diluída 50 vezes com concentração informada de metionina 10 mg/ml e betaina 50 mg/ml. Legenda: AM – amostra; EL – eletrólito de corrida.

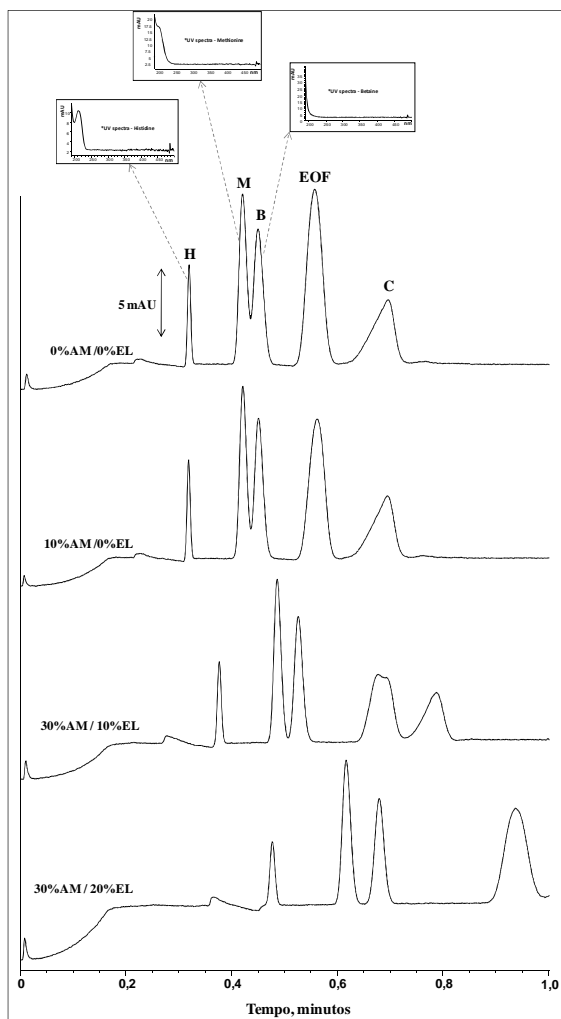


Figura 4.3 Alguns eletroferogramas da otimização da concentração de etanol adicionado na amostra e no eletrólito de corrida. Condições de separação: ver Figura 4.2. Legenda: AM – amostra; EL – eletrólito; H-histidina (padrão interno); M-metionina; B-betaina; EOF-fluxo eletrosmótico; C-citrato.

É possível verificar que sem o uso do etanol a resolução da separação realmente fica comprometida (cerca de 0,70), apesar dessa condição de separação ser uma das mais rápidas (maior valor de 1/tempo de migração da betaina) como mostra o eletroferograma da separação. Com a adição de diferentes porcentagens de etanol somente na amostra (10, 20 e 30%) ocorre uma melhora sutil na resolução (~ 0,77), entretanto não o suficiente para promover a separação da betaina e metionina. Nas condições onde foram adicionados 10% de etanol no eletrólito e variou-se a porcentagem na amostra foi observada uma resolução mínima de separação (0,90) com uma boa relação de tempo para uma análise rápida na condição com 30% de etanol na amostra. Com o uso de 20% de etanol no eletrólito foram verificados os melhores valores de resolução (> 1,0) com um máximo em 30% de etanol adicionado na amostra, porém nessas condições ocorreu uma piora na relação de tempo de análise. Diante dos resultados foi possível observar que de forma geral houve um efeito de melhoria na resolução dos analitos com o uso de etanol na amostra e no eletrólito, sendo esse efeito mais pronunciado quando o etanol foi adicionado no eletrólito, pois provocou uma diminuição do EOF do capilar revestido. Esta variação da mobilidade do EOF está relacionada principalmente com a alteração simultânea de duas propriedades físico-químicas do eletrólito de corrida: a viscosidade e a constante dielétrica (SCHWER; KENNDLER, 1991). Com o aumento da concentração de etanol no eletrólito a viscosidade aumenta, enquanto que a constante dielétrica diminui. A relação destes dois parâmetros com a mobilidade do EOF pode ser descrita pela equação de Smoluchowsky (TAVARES; 1996), a qual está apresentada a seguir:

$$\mu_{eo} = - \frac{\varepsilon \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (\text{Equação 4.1})$$

onde ε e ε_0 representam a constante dielétrica e a permissividade do vácuo (em $C^2 N^{-1} m^{-2}$), respectivamente; μ_{eo} representa a mobilidade do EOF ($m^2 V^{-1} s^{-1}$); η viscosidade da solução próxima à parede do capilar (em Pa s) e ζ representa o potencial zeta (V). Pela equação de Smoluchowsky a mobilidade é diretamente proporcional a constante dielétrica e inversamente proporcional a viscosidade. Assim, o uso de etanol no eletrólito de corrida provoca uma diminuição na mobilidade

do EOF que permite ajustar este parâmetro eletroforético como desejado. Por fim, a condição escolhida tendo um compromisso entre uma resolução mínima de separação e uma relação de tempo boa para uma análise rápida foi uso de etanol 30% na amostra e 10% no eletrólito.

Outro parâmetro de separação importante que deve ser avaliado é a tensão aplicada no método. Para desenvolver um método rápido de separação deve ser utilizada a maior tensão possível com a mínima existência do efeito Joule. A minimização desse efeito é verificada pela lei de Ohm, na qual a corrente gerada deve apresentar uma relação linear com a tensão aplicada em um mesmo eletrólito. A corrente obtida para diferentes valores de tensão aplicadas no eletrólito otimizado variou linearmente até 30 kV ($R^2 = 0,995$; Figura 4.4). Entretanto, quando a curva foi construída até a tensão de 28 kV o coeficiente de determinação aumentou para 0,998 e o modelo linear mostrou ser significativo ($F = 2548$), indicando uma melhor relação linear que na curva até 30 kV. Assim, a tensão selecionada para ser usada no método foi 28 kV.

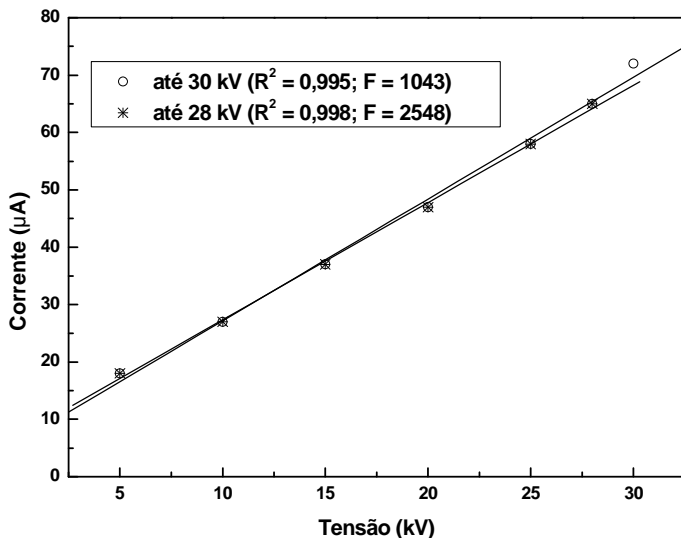


Figura 4.4 Variação da corrente em função da tensão aplicada no eletrólito otimizado. Entre parêntesis os valores de coeficiente de determinação e teste F.

Com relação ao tempo de injeção no método proposto foi selecionado o menor tempo possível mantendo uma boa reprodutibilidade de injeção, pois com a utilização de tempos mais elevados ocorre um desfavorecimento da resolução em função do alargamento dos picos dos analitos que já estão com uma resolução mínima. Assim, o tempo de 3s de injeção usando 50 mbar de pressão negativa foi escolhido para ser usado no método.

4.4.1.3 Comparação da separação de betaina e metionina em um capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena e um capilar não revestido

A separação de betaina e metionina de uma amostra de hepatoprotetor usando o método otimizado foi feita em um capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena e comparada com um capilar não revestido. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.5. Foi possível observar que apesar da separação no capilar modificado ter apresentado uma resolução menor, a eficiência de separação média (betaina e metionina) no capilar revestido (cerca de 20000 pratos por metro) foi muito maior que no capilar não revestido (eficiência menor que 7000 pratos por metro). Também o tempo de separação dos analitos foi quase quatro vezes menor no capilar modificado (betaina $t_{\text{migr}} \sim 0,51$ min) quando comparado com o capilar não revestido (betaina $t_{\text{migr}} \sim 2,0$ min), salientando a vantagem do método rápido de separação desenvolvido. Outra comparação injetando a mesma amostra em um capilar não revestido, porém sem adição de etanol na amostra e no eletrólito (Figura 4.5 - c), mostrou que apesar de uma pequena melhora na resolução entre os analitos ocorre uma piora ainda maior na eficiência média dos picos (eficiência menor que 3500 pratos por metro) e um aumento significativo no tempo de separação (betaina $t_{\text{migr}} \sim 2,5$ min). O EOF baixo em um pH próximo a 2,1 no capilar não revestido além de fazer aumentar o tempo de separação dos analitos, também contribui para um maior tempo de permanência dos analitos dentro do capilar e isso colabora para um aumento na dispersão dos analitos prejudicando a eficiência de separação. Também foi observado que mesmo em um capilar não modificado o uso de etanol na amostra e no eletrólito contribuiu para uma melhora na eficiência dos picos e para uma diminuição no tempo de separação. Isso pode ser atribuído ao ajuste da viscosidade e da constante dielétrica do meio pelo uso do solvente orgânico, mostrando a importância do seu uso no método proposto (SCHWER; KENNDLER, 1991).

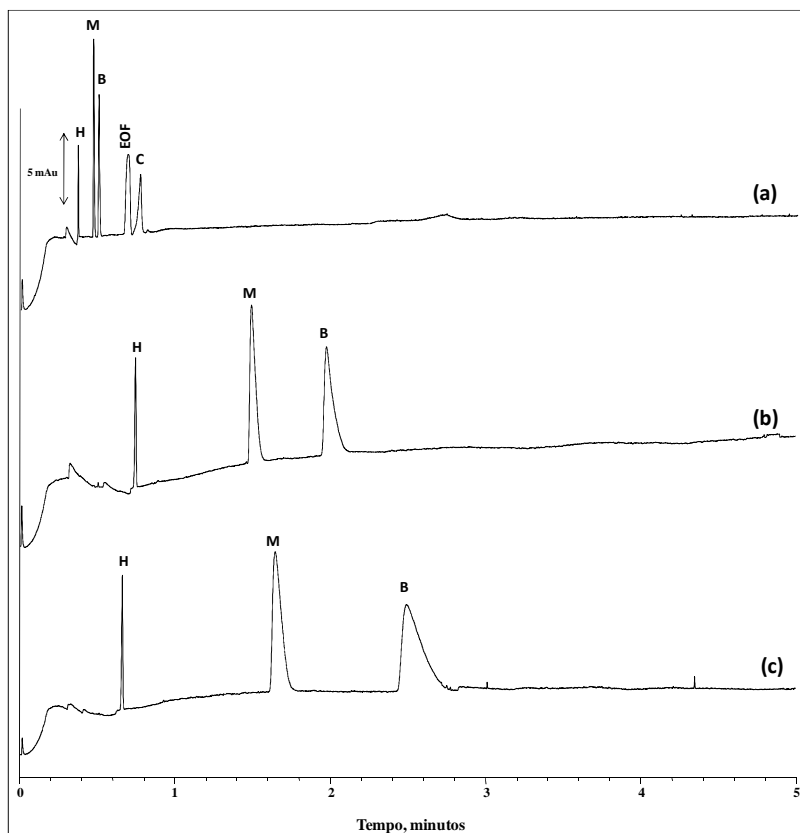


Figura 4.5 Eletroferogramas de uma mesma amostra diluída 50 vezes e injetada em um capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena e em um capilar não revestido. (a) Amostra diluída conforme procedimento otimizado e injetada no capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena usando 30% de etanol na amostra e 10% no eletrólito; (b) mesmas condições de (a) injetando amostra em um capilar não modificado; (c) mesmas condições de (a), porém não usando etanol nem na diluição da amostra e nem no eletrólito, e injetando amostra em um capilar não modificado. Condições experimentais: ver seção de materiais e métodos.

4.4.1.4 Verificação da possibilidade de injeção sequencial e tempo instrumental de análise do método otimizado

Na análise de fármacos, dependendo do método, é possível realizar separações sem a etapa de lavagem do capilar entre as corridas, devido geralmente serem amostras com matrizes não muito complexas e com os componentes majoritários conhecidos. Dos componentes principais de uma amostra de hepatoprotetor apenas o citrato (originário do citrato de colina, um dos componentes de hepatoprotetores) e a sacarina, poderiam interferir no modo de injeção sequencial devido migrarem depois do pico do EOF na condição do método proposto (ânions que migram contra-eletrosmótico). O citrato absorve radiação UV em 195 nm por apresentar grupos carboxílicos e a sacarina por apresentar um anel aromático em sua estrutura, por isso ambos poderiam ser detectados no método. Entretanto, a realização de uma corrida longa mostrou que apenas o pico do citrato pode ser detectado, migrando logo depois do pico do EOF. A ausência do pico da sacarina ocorre devido ao nível de concentração desse componente contido no fármaco não ser detectável pelo método com a diluição empregada para a análise das amostras. Para verificar se o modo de injeção sequencial pode ser empregado uma mesma amostra foi injetada diversas vezes usando esse modo de injeção e os eletroferogramas obtidos para estas corridas estão apresentados na Figura 4.6. Como pode ser observado nos 31 eletroferogramas sobrepostos, não existe nenhum pico além dos picos da betaina, metionina, histidina, EOF e citrato.

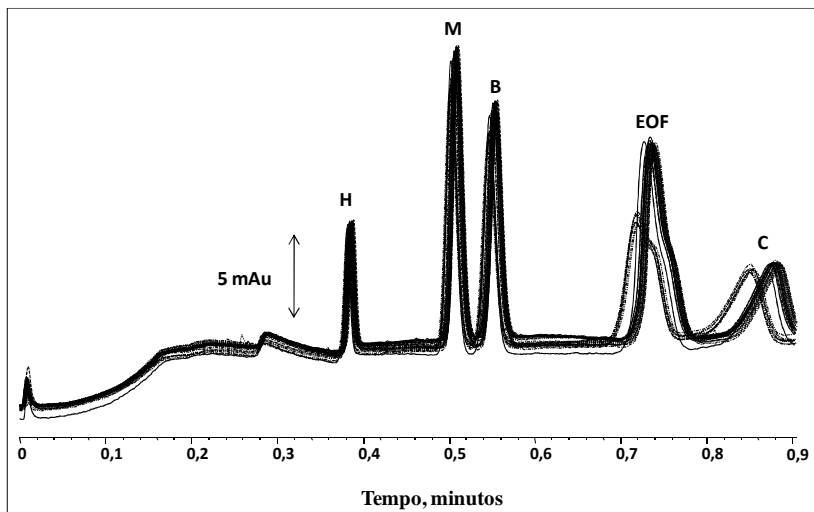


Figura 4.6 Eletroferogramas sobrepostos de 31 corridas de uma amostra de hepatoprotetor usando o método otimizado injetando seqüencial. Legendas dos picos: H-histidina (padrão interno), M-metionina, B-betaina, EOF-fluxo eletrosmótico, C-citrato. Condições experimentais: capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena, 32 cm x 50 μ m D.I, injeção 50 mbar/3 s pelo caminho mais curto do capilar até o detector ($L_{det} = 8,5$ cm) usando 30% de etanol na amostra e 10% no eletrólito, tensão de 28 kV, aquisição dos dados em 195 nm.

Considerando apenas o tamanho dos plugues das 31 injeções sequenciais (desconsiderando a migração deles por aplicação de tensão), injetando 50 mbar por 3 s em um capilar de 32 cm (L_{tot}) x 50 μ m (DI) pelo caminho mais curto do capilar até o detector ($L_{det} = 8,5$ cm), alguns dos plugues injetados por primeiro (cerca de 10 plugues; cada plugue com comprimento de 0,411 cm) na seqüência já teriam passado pelo detector, pois para o número total de injeções realizado foram gastos 93 s de injeção que correspondem a 12,74 cm de amostra injetada (Figura 4.7). Somando-se a isso, ao longo de todas as corridas foram aplicados 31 min de 28 kV de tensão. Assim, com essa quantidade de amostras injetadas e o tempo de aplicação de tensão, se existisse algum pico que interferisse no método de injeção seqüencial proposto o mesmo teria

aparecido em algum momento entre os picos observados nos eletroferogramas sobrepostos. Como nenhum pico aparece, isso confirma que a injeção sequencial pode ser usada no presente método. Essa característica contribui significativamente para um aumento da frequência analítica.

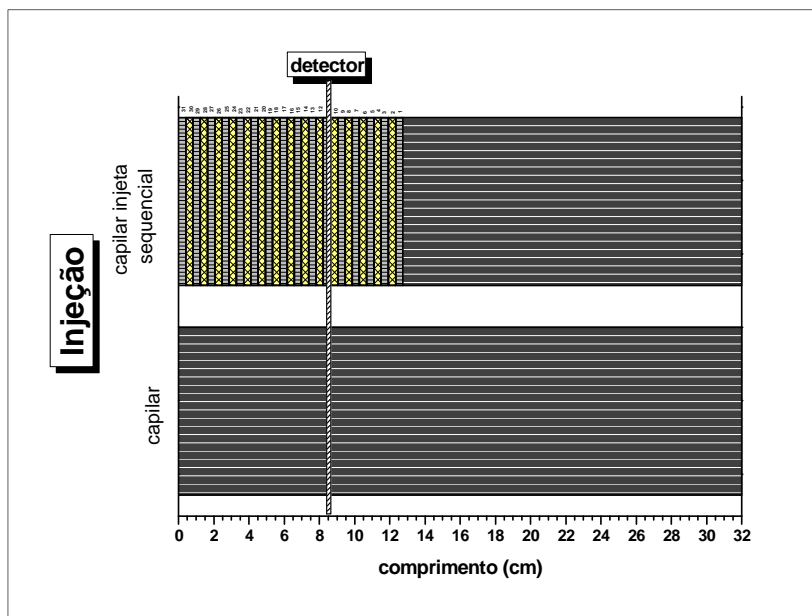


Figura 4.7 Representação do comprimento dos plugues de 31 injeções sequenciais usando o método otimizado.

Com relação ao tempo instrumental de análise (TIA) gasto pelo método otimizado usando o modo sequencial (Figura 4.8 - a), este foi de 1,533 min, sendo 0,533 min para injeção e permuta dos frascos e 1 min para a separação. Nesse método, foi verificado que a maior parte do TIA é gasto na etapa da separação, cerca de 65%. Considerando o tempo gasto para cada análise, é possível realizar cerca de 39 corridas h^{-1} . Comparando este resultado com o mesmo método utilizando a etapa de lavagem do capilar entre corridas (1 bar por 20 s, equivalente a 1,7 volumes de capilar), o TIA foi de 2,3 min sendo possível neste caso

realizar 26 corridas h^{-1} (Figura 4.8 – b). Neste último método, o tempo do TIA gasto durante a injeção e permuta dos frascos equivale ao tempo de separação, sendo estes responsáveis por mais de 80% do TIA. Assim, a injeção sequencial confere um aumento de 13 análises h^{-1} em relação ao método empregando lavagem entre as corridas.

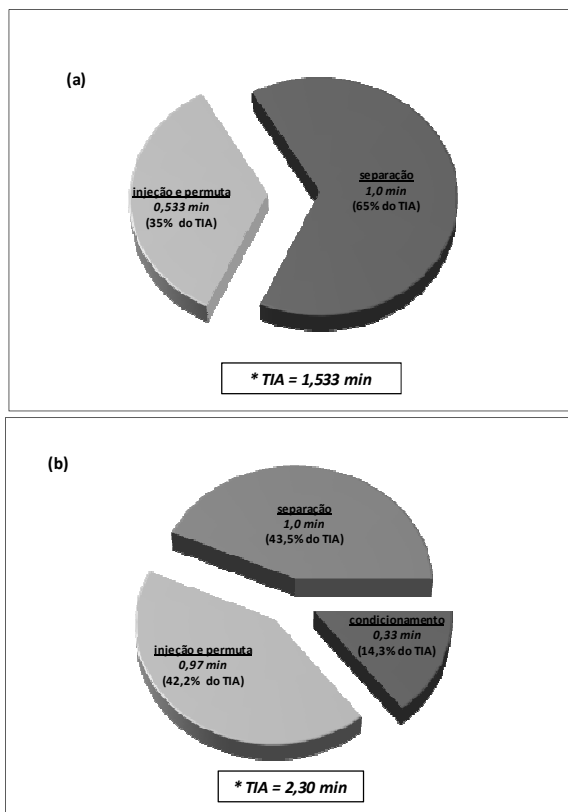


Figura 4.8 Gráficos representando as porcentagens de tempo gasto em cada etapa do método proposto em relação ao tempo instrumental de análise usando o método otimizado com injeção sequencial (a) e com a etapa de lavagem entre corridas (b).

4.4.2 Desempenho analítico do método

A avaliação do método proposto otimizado para a determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas foi realizada de acordo com as diretrizes do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) utilizando os parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e seletividade. Também foi avaliada a conformidade do sistema.

A seletividade do método proposto foi avaliada empregando o método de adição de padrão e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Verificação da seletividade do método para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas usando adição de padrão.

Análito	Concentração (mg L ⁻¹)		Recuperação (%)
	adicionada	recuperada	
betaina	100	98,0	98,0
	200	198	99,3
	300	302	101
	400	431	108
	500	498	99,7
metionina	50	48,7	97,3
	100	99,7	99,7
	150	151	101
	200	203	102
	250	248	98,4

* Recuperação usando uma amostra de hepatoprotetor diluída 50 vezes. Concentração de betaina e metionina na amostra, 10.346 mg L⁻¹ e 9.794 mg L⁻¹, respectivamente. Resultados expressos como a média de medidas em duplicata de duas preparações. Inclinação das curvas de adição: betaina 0,00463 ± 0,00042 (R² = 0,999) e metionina 0,02006 ± 0,00106 (R² = 0,999).

As inclinações das curvas de adição de padrão (betaina $0,00463 \pm 0,00042$ e metionina $0,02006 \pm 0,00106$) e das curvas de calibração externa (betaina $0,00424 \pm 0,00017$ e metionina $0,02078 \pm 0,00088$) foram comparadas. A aplicação do *teste-t* mostrou que as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão, tanto para betaina quanto para metionina, são estatisticamente iguais (betaina $t_{calc} = 1,22$, metionina $t_{calc} = 0,74$, $t_{crítico} = 4,3$, com nível de confiança de 95%). A proximidade observada entre as inclinações das curvas indica que o método é adequadamente seletivo para a análise de betaina e metionina nas amostras de hepatoprotetor. Além disso, os resultados de recuperação para cinco níveis de concentração variaram de 97 a 108%, sugerindo que o método apresenta exatidão aceitável.

Os resultados obtidos de conformidade do sistema, de linearidade, limites de detecção e quantificação, e de precisão para o método proposto estão apresentados nas Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente. A eficiência de separação obtida para betaina e metionina foi maior que 20000 pratos por metro e os picos apresentaram uma boa simetria. Também, a resolução obtida entre os analitos foi adequada para a separação. As curvas de calibração obtidas para betaina e metionina apresentaram uma boa linearidade (coeficiente de determinação $> 0,99$) em uma ampla faixa de concentração, especialmente para betaina em que a faixa variou em duas ordens de grandeza. O modelo linear mostrou ser significativo para as curvas de calibração externa de betaina e metionina ($F > 149000$ para betaina e $F > 28000$ para metionina) e não apresentou falta de ajuste (betaina $F_{calc} = 0,007$, metionina $F_{calc} = 0,070$, $F_{crítico} = 2,37$; com nível de confiança de 95%). Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente) determinados usando os parâmetros da curva de calibração, foram considerados adequados para a determinação dos dois aminoácidos nas amostras. As precisões do método foram determinadas usando solução padrão e amostra. Os resultados de precisão instrumental e intra-ensaio obtidos para a área de pico e para o tempo de migração apresentaram valores de CV menores que 2,5%. Da mesma forma as precisões intermediárias apresentaram baixos valores de CV ($< 3,5\%$) para os tempos de migração e para a área de pico.

Tabela 4.3 Resultados de parâmetros de conformidade do método para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE usando o capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro		Analitos	
		betaina	metionina
Número de pratos ($N\ m^{-1}$) ^(a)	8	20294	24321
Simetria de pico ^(b)	3	0,85	0,76
Fator de assimetria de pico ^(b)	3	1,16	1,17
Fator de cauda de pico ^(b)	3	1,11	1,12
Resolução (betaina:metionina) ^(c)	8	0,93	

^(a) Número de pratos calculado de acordo com a equação $N = 16 (t_i / w_{hi})^2$, onde t_i é o tempo de migração do analito dado em min e w_{hi} é a largura de pico na base, nas mesmas unidades de t_i . Concentração de betaina e metionina cerca de 700 e 350 mg L⁻¹, respectivamente.

^(b) Simetria de pico obtida do *software Chemstation*[®]. Fator de assimetria calculado usando a distância a partir do centro do pico para a cauda do pico dividido pela distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 10 % da altura máxima do pico. Fator de rejeição foi calculado usando a distância da cauda frontal do pico para a cauda do pico dividido por duas vezes a distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 5 % da altura máxima do pico.

^(c) Resolução calculada usando a equação: $Rs = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, onde t é o tempo de migração do pico e w é a largura do pico na base. Concentração de betaina e metionina cerca de 700 e 350 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 4.4 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE usando o capilar revestido com SAQQ reticulado e κ-carragena. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analitos	
		betaina	metionina
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^(a)	11	50 – 1500	25 – 750
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^(a)		0,00424	0,02078
Desvio padrão inclinação ^(a)		0,00017	0,00088
Linearidade-intercepto ^(a)		0,0320	0,1987
Desvio padrão intercepto ^(a)		0,0042	0,0047
linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^(a)		0,9998	0,9992
Limite detecção, LD (mg L ⁻¹) ^(b)		3,26	0,740
Limite quantificação, LQ (mg L ⁻¹) ^(b)		9,87	2,25
F ^(c)		149822	28223

^(a) Cada ponto da curva de calibração preparado em duplicata e medido em duplicata. Curvas de calibração com correção da área do padrão interno.

^(b) Limites de detecção e quantificação calculados de acordo com as equações: $LD = (3,3 \times s)/S$; $LQ = (10 \times s)/S$, onde *s* é o desvio padrão do coeficiente linear e *S* é a inclinação da curva analítica, respectivamente.

^(c) Betaina e metionina $F_{critic} = 4,16$; NGL = 32.

Tabela 4.5 Resultados de precisão do método otimizado para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas por CE usando o capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analitos	
		betaina	metionina
Precisão instrumental, CV (%) – área de pico	20	0,95 (2,0)	0,65 (1,2)
Precisão instrumental, CV (%) – tempo de migração	20	0,86 (1,1)	0,88 (1,0)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – área de pico	8	1,2 (2,3)	1,1 (1,3)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – tempo de migração	8	1,1 (1,2)	1,1 (1,1)
Precisão intermediária, CV (%) – área de pico	12	1,8 (2,4)	1,7 (1,8)
Precisão intermediária, CV (%) – tempo de migração	12	1,5 (3,2)	1,4 (3,1)

* Coeficientes de variação calculados com a equação: $CV = (P/\bar{u}) \times 100$, onde P é o desvio padrão absoluto e \bar{u} é a média aritmética da razão de área do analito pelo padrão interno ou a média aritmética do tempo de migração. Valores de CV para precisão instrumental medidos na mesma solução, para precisão intra-ensaio foram 8 preparações com a mesma concentração e para precisão intermediária 8 preparações em um dia e mais 4 preparações em outro dia, usando solução padrão dos analitos betaina 700 mg L^{-1} e metionina 350 mg L^{-1} , ou amostra. Valores de CV entre parênteses são referentes a uma amostra de hepatoprotetor diluída 50 vezes.

4.4.3 Análise de betaina e metionina nas amostras de hepatoprotetor

A análise das amostras foi feita empregando o método otimizado por CE-UV e pelo método comparativo com LC-MS/MS. Os resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação do método comparativo LC-MS/MS estão apresentados na Tabela 4.6 e os cromatogramas típicos obtidos pelo método estão apresentados na Figura 4.9.

Tabela 4.6 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação obtidos pelo método comparativo LC-MS/MS para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	n	Analitos	
		betaina	metionina
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^(a)	8	0,10 – 1,0	0,10 – 1,0
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^(a)		1,51x10 ⁶	2,56x10 ⁶
linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^(a)		0,999	0,999
Limite detecção, LD (mg L ⁻¹) ^(b)		0,01	0,02
Limite quantificação, LQ (mg L ⁻¹) ^(b)		0,03	0,07

^(a) Cada ponto da curva de calibração medido em duplicata.

^(b) Limites de detecção e quantificação calculados de acordo com as equações: $LD = (3,3 \times s)/S$; $LQ = (10 \times s)/S$, onde s é o desvio padrão do coeficiente linear e S é a inclinação da curva analítica, respectivamente.

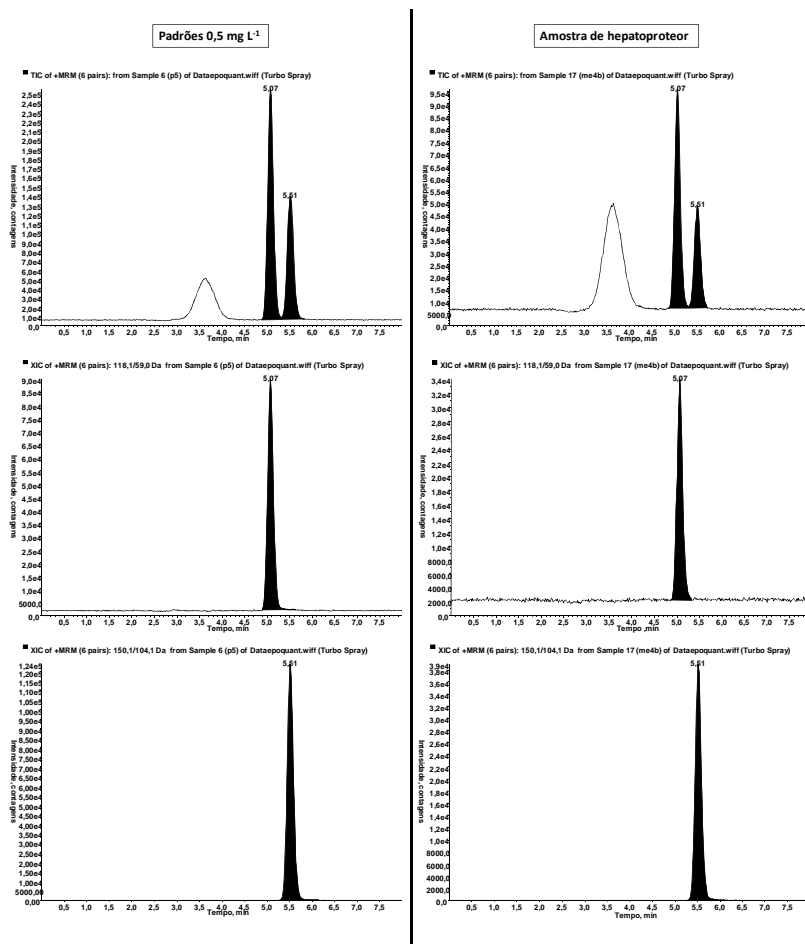


Figura 4.9 Cromatogramas de uma mistura de padrões e de uma amostra de hepatoprotetor obtidos pelo método comparativo usando LC-MS/MS. Localização dos picos: betaína - tempo de retenção 5,07 min; metionina - tempo de retenção 5,51 min. Pico não integrado representa a colina presente na amostra de hepatoprotetor, porém não analisada.

Os resultados obtidos de quantificação de betaína e metionina nas amostras de hepatoprotetores por CE-UV e LC-MS/MS estão apresentados na Tabela 4.7. O tratamento estatístico usando *test-t* pareado para as determinações de betaina e metionina nas amostras pelos dois métodos mostrou que os resultados são estatisticamente iguais com nível de confiança de 95%, pois $t_{calc} < t_{crític}$ (betaina $t_{calc} = 2,29$, $t_{crític} = 2,37$, NGL = 7; metionina $t_{calc} = 1,07$, $t_{crític} = 2,26$, NGL = 9). Os resultados de quantificação de metionina nas amostras ficaram um pouco abaixo, porém muito próximos, do valor informado pelo fabricante. Quanto aos valores de betaina determinados, estes concordaram com os valores informados somente para as amostras que apresentavam menores teores de betaina. Para as amostras com teor de betaina mais elevado o valor determinado não correspondeu ao valor informado ficando abaixo deste.

Tabela 4.7 Resultados da determinação de betaina e metionina nas amostras de hepatoprotetor usando o método otimizado por CE-UV e o método comparativo LC-MS/MS. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos.

Amostra	betaina (mg mL ⁻¹)			metionina (mg mL ⁻¹)		
	CE-UV ^b	LC-MS/MS ^c	informado nominal	CE-UV ^b	LC-MS/MS ^c	informado nominal
A1 ^a	-	-	-	9,13 ± 0,05	8,92 ± 0,63	10,0
A2 ^a	-	-	-	9,45 ± 0,09	9,54 ± 0,47	10,0
B1 ^a	9,82 ± 0,35	9,42 ± 0,21	10,0	9,22 ± 0,24	9,19 ± 0,76	10,0
B2 ^a	9,74 ± 0,16	9,49 ± 0,22	10,0	9,20 ± 0,10	8,91 ± 0,78	10,0
B3 ^a	9,66 ± 0,53	9,51 ± 0,30	10,0	9,07 ± 0,34	8,85 ± 0,32	10,0
B4 ^a	9,30 ± 0,96	9,37 ± 0,28	10,0	9,05 ± 0,68	8,90 ± 0,41	10,0
C1 ^a	39,9 ± 0,74	43,7 ± 0,86	50,0	8,96 ± 0,11	9,36 ± 0,67	10,0
C2 ^a	40,4 ± 0,30	44,9 ± 1,43	50,0	9,11 ± 0,06	9,75 ± 0,55	10,0
C3 ^a	39,8 ± 0,63	43,8 ± 1,48	50,0	8,99 ± 0,14	9,67 ± 0,48	10,0
C4 ^a	40,1 ± 0,61	42,5 ± 0,81	50,0	8,94 ± 0,21	9,27 ± 0,52	10,0

^(a) A-C, representa diferentes marcas, e 1-4 diferentes lotes.

^(b) Dados obtidos em 195 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$.

^(c) Dados obtidos em 118,086/59,0 para betaina e 150,115/104,1 para metionina.

4.5 CONCLUSÕES

O método desenvolvido apresentou um bom desempenho para determinação de betaina e metionina em formulações farmacêuticas usando CE com detecção direta no UV. As concentrações de betaina e metionina determinadas nas amostras por CE-UV concordaram com os valores obtidos pelo método comparativo usando LC-MS/MS. O novo capilar modificado empregado no método por CE foi decisivo para a obtenção de uma separação rápida dos analitos usando o modo de injeção sequencial das amostras. O novo perfil de EOF obtido pela modificação do capilar com SAQQ reticulado e κ -carragena apresentando EOF elevado em pH baixo, mostrou ter potencial para aplicação em outros métodos por CE, especialmente devido a simplicidade e estabilidade da modificação. Além disso, o revestimento permitiu utilizar um solvente orgânico no eletrólito de corrida para promover um ajuste do EOF sem a destruição da camada polimérica, a fim de obter uma resolução mínima dos analitos no menor tempo de separação possível. Outras moléculas com características estruturais semelhantes as da betaina, poderiam ser analisadas por CE também empregando métodos rápidos como o desenvolvido no presente trabalho. Dentre estas moléculas podemos citar alguns antibióticos β -lactâmicos da terceira e da quarta geração desenvolvidos nos últimos anos, como cefepime, cefozopran, cefpirome, cefquinone, ceftazidime. Também outras moléculas como a carnitina, presente em diversas amostras entre elas suplementos alimentares para atletas, poderiam ser analisadas pelo método proposto.

REFERÊNCIAS

- ALTRIA, K.; MARSH, A.; SÄNGER-VAN DE GRIEND, C. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis*, v. 27, p. 2263–2282, 2006.
- BARAK, A. J.; BECKENHAUER, H. C.; TUMA, D. J. Betaine, Ethanol, and the Liver: A Review. *Alcohol*, v. 13, p. 395-398, 1996.
- BRFICKNER, H.; WESTHAUSER, T.; GODEL, H. Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and N-isobutyryl-L-cysteine. Applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *Journal of Chromatography A*, v. 711, p. 201-215, 1995.
- CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; LAURIA, A.; NICOLETTI, I.; STANCANELLI, R. Rapid Analysis of Essential and Branched-Chain Amino Acids in Nutraceutical Products by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3324–3329, 2000.
- CHENG, Y.; FAN, L.; CHEN, H.; CHEN, X.; HU, Z. Method for on-line derivatization and separation of aspartic acid enantiomer in pharmaceuticals application by the coupling of flow injection with micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1072, p. 259–265, 2005.
- FRIEDMAN, M. Chemistry, Nutrition, and Microbiology of D-Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3457–3479, 1999.
- FUCHS, S. A.; BERGER, R.; KLOMP, L. W. J.; KONING, T. J. D-Amino acids in the central nervous system in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 85, p. 168–180, 2005.

GATTI, R.; GIOIA, M. G.; ANDREATTA, P.; PENTASSUGLIA, G. HPLC-fluorescence determination of amino acids in pharmaceuticals after pre-column derivatization with phanquinone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 35, p. 339–348, 2004.

GIOIA, M. G.; ANDREATTA, P.; BOSCHETTI, S.; GATTI, R. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 45, p. 456–464, 2007.

GIOIA, M. G.; ANDREATTA, P.; BOSCHETTI, S.; GATTI, R. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 45, p. 456–464, 2007.

GIOIA, M. G.; CACCIARI, B.; LEONI, A.; GATTI, R. 2,7-Dimethyl-3,8-dinitrodipyrzolo [1,5-a:1', 5'-d] pyrazine-4,9-dione: A new labelling reagent for liquid chromatographic analysis of amino acids. *Analytica Chimica Acta*, v. 579, p. 152–157, 2006.

GOTTI, R.; GIOIA, M. G.; GATTI, R.; CAVRINI, V. Phanquinone as a suitable derivatization reagent in micellar electrokinetic chromatography and HPLC analysis of amino acids. *Journal of Separation Science*, v. 29, p. 1259 – 1267, 2006.

GU, Y. S.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of pH and carrageenan type on properties of b-lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 83–91, 2005.

HO, Y-H.; WU, H-L. Micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the separation and quantitation of multiple amino acids as naphthoxy derivatives in pharmaceutical formulations. *Electrophoresis*, v. 27, p. 2300–2309, 2006.

IADAROLA, P.; FERRARI, F.; FUMAGALLI, M.; VIGLIO, S. Determination of amino acids by micellar EKC: Recent advances in

method development and novel applications to different matrices. *Electrophoresis*, v. 29, p. 224–236, 2008.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Disponível em <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf> Acesso em: 12 mar. 2011.

KIRBY, B. J.; HASSELBRINK JR, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, v. 25, p. 187–202, 2004.

KOSTARNOI, A. V.; GOLUBITSKII, G. B.; BASOVA, E. M.; BUDKO, E. V.; IVANOV, V. M. High-Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Multicomponent Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 63, p. 566–580, 2008.

LEVER, M.; SLOW, S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry*, v. 43, p. 732–744, 2010.

LI, C.; HILL, R. W.; JONES, A. D. Determination of betaine metabolites and dimethylsulfoniopropionate in coral tissues using liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry and stable isotope-labeled internal standards. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 1809–1816, 2010.

LUCY, C. A.; MACDONALD, A. M.; GULCEV, M. D. Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 81–105, 2008.

MÉTAYER, S.; SEILIEZ, I.; COLLIN, A.; DUCHÊNE, S.; MERCIER, Y.; GERAERT, P-A; TESSERAUD, S. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 19, p. 207–215, 2008.

MICKE, G. A. *Otimização e simulação em Eletroforese Capilar*. 2004. 311 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

PEAKMASTER: *software* livre. Versão 5.3. Disponível em: <<http://web.natur.cuni.cz/gas/>> Acesso em: 05 mar. 2011.

QIN, C.; XIAO, Q.; LI, H.; FANG, M.; LIU, Y.; CHEN, X.; LI, Q. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, p. 121-126, 2004.

SCHUSTER, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 431, p. 271-284, 1988.

SCHWER, C.; KENNDLER, E. Electrophoresis in Fused-Silica Capillaries: The Influence of Organic Solvents on the Electroosmotic Velocity and the ζ Potential. *Analytical Chemistry*, v. 63, p. 1801-1807, 1991.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, v. 19, p. 173-181, 1996.

VITALI, L.; FÁVERE, V. T.; MICKE, G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 2327-2333, 2011.

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

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 1174-1180, 1996.

YEH, C.-F.; JIANG, S.-J.; HIS, T.-S. Determination of sulfur-containing amino acids by capillary electrophoresis dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 502, p. 57-63, 2004.

ZACHARIS, C. K.; THEODORIDIS, G. A.; VOULGAROPOULOS, A. N. Coupling of sequential injection with liquid chromatography for the automated derivatization and on-line determination of amino acids. *Talanta*, v. 69, 841-847, 2006.

CAPÍTULO 5 – CAPILAR REVESTIDO COM SAL DE QUITOSANA QUATERNIZADA RETICULADO E κ -CARRAGENA USADO NO DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO PARA DETERMINAÇÃO DE CREATININA, HISTIDINA, ÁCIDO HIPÚRICO E ÁCIDO MANDÉLICO EM AMOSTRAS DE URINA POR ELETROFORESE CAPILAR

5.1 REVISÃO DA LITERATURA

Diversos processos químicos ocorrem no organismo de seres vivos e esses processos compreendem reações de metabolização onde são geradas moléculas chamadas de metabólitos. A análise do conjunto completo de metabólitos que se pode encontrar em uma amostra biológica de um organismo vivo é denominado de metaboloma (KIEFER; PORTAIS; VORHOLT, 2008). Existem os metabólitos de origem endógena, divididos em metabólitos primários que são substâncias relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e reprodução de organismos vivos, como aminoácidos por exemplo; e os metabólitos secundários que são substâncias específicas com distribuição restrita e apresentam uma determinada função biológica específica, como os hormônios nos mamíferos. Também existem os metabólitos de origem exógena, que representam a biotransformação de moléculas por modificação química estrutural de uma molécula original e/ou por ação enzimática, com isso surgindo o conceito denominado xenometaboloma. Esse conceito é uma descrição do perfil de metabólitos xenobióticos (metabólitos de compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico) de um indivíduo exposto a poluentes ambientais, drogas ou moléculas exógenas oriundas da alimentação (ROUX *et al.*, 2011). A absorção de substâncias químicas ambientais por um ser humano ocorre por três principais vias, absorção dérmica, inalação e ingestão. A carga corporal é determinada pelas propriedades físicas e químicas da substância, tempo de exposição e características fisiológicas do indivíduo. Essas substâncias podem ser excretadas sem transformação, metabolizada e excretada, armazenada e excretada

lentamente ou submetida a uma combinação de todos estes processos (ESTEBAN; CASTAÑO, 2009). Assim, estes metabólitos também chamados de biomarcadores são indicadores internos de alterações moleculares que podem aparecer em um organismo como resultado de uma doença ou exposição a um agente tóxico. Esses biomarcadores devem ser identificados e medidos quantitativamente em um fluido biológico preferencialmente coletado de maneira não invasiva, e no caso de um biomarcador de exposição indicar a ocorrência e a extensão da exposição.

Dentre os fluidos biológicos gerados pelo ser humano que são empregados em análises de biomarcadores pode-se destacar a urina. Algumas das vantagens do uso da urina incluem a obtenção de grandes quantidades de amostra por um método não invasivo de amostragem e facilidade em realizar diversas coletas, menor necessidade de pré-tratamento que no plasma sanguíneo devido a amostra ser menos complexa e ter menor conteúdo de proteínas. Essas vantagens tem assegurado o amplo uso da urina como uma ferramenta para diagnóstico na clínica prática (RYAN *et al.*, 2011). A urina é uma das matrizes mais comuns para biomonitoração humana, particularmente para substâncias químicas solúveis em água. Dois tipos de amostras de urina podem ser coletadas, amostras pontuais ou amostras de 24-h. A coleta de amostras pontuais é mais fácil e usada com mais frequência, porém tem a desvantagem da variação de volume e de concentração, sendo necessário ajustá-los. O método mais comum de realizar este ajuste é usando a concentração de creatinina presente na urina coletada (ESTEBAN; CASTAÑO, 2009).

Inúmeros metabólitos são excretados pelos humanos na urina, dentre eles a creatinina e a histidina. A creatinina é um metabólito que está presente em diversos fluidos biológicos e sua excreção na urina representa o ponto final de transferência de energia endógena de adenosina trifosfato armazenado nos músculos esquelético e cardíaco. Na ausência de doença renal a creatinina urinária normalmente é excretada em quantidades relativamente constantes. Entretanto essas quantidades variam de pessoa para pessoa e são altamente dependentes da idade, sexo, massa corpórea de cada indivíduo, entre outros fatores. Os níveis de creatinina são usados clinicamente para o diagnóstico de problemas renais, da tireóide, e também disfunção muscular (RYAN *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2007). A histidina é um aminoácido que está

amplamente presente nos tecidos nervoso e muscular. Esse aminoácido constitui o centro ativo de muitas enzimas e proteínas, e controla a transmissão de elementos metálicos em processos biológicos, além de estar envolvida na síntese e na quebra de proteínas no organismo. Os níveis de histidina encontrados na urina podem sofrer alteração devido a alimentação especialmente em dietas ricas em proteínas (ZINELLU *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; NAN *et al.*, 1999; BLOCK; WESTHOFF; STEELE, 1967). Outros biomarcadores relacionados a exposição ocupacional encontrados na urina são o ácido hipúrico e ácido mandélico, originados da exposição ao tolueno e estireno, respectivamente. Esses compostos orgânicos têm sido amplamente usados nas indústrias de plásticos, borrachas, tintas, adesivos, colas, resinas, materiais isolantes e farmacêutica. Também são encontrados no petróleo e muitos derivados. Os efeitos adversos à saúde como resultado da exposição a altas concentrações destes compostos incluem problemas respiratórios crônicos, alterações no sistema nervoso central, irritação nas mucosas e na pele, e anomalias cromossômicas podendo desencadear diversas síndromes genéticas (OHASHI *et al.*, 2006). No caso de contaminação com estes compostos orgânicos, presentes no ambiente de trabalho, a maior via de absorção é a respiratória. O monitoramento destes biomarcadores em trabalhadores expostos a produtos químicos tóxicos em seu local de trabalho fornece informações sobre a saúde deste trabalhador possibilitando evitar danos a saúde a longo prazo. Também, permite a melhor compreensão de como uma doença associada a exposição se origina e evolui, com isso sendo possível prevenir a doença ou intervir no início do processo evitando danos fisiopatológicos irreversíveis (BULCÃO *et al.*, 2008; PENNER *et al.*, 2010). Entretanto, o uso destes biomarcadores para diagnóstico deve ser muito cuidadoso, pois outras substâncias ingeridas ou inaladas que não o agente tóxico de interesse podem ser metabolizadas na mesma molécula usada como indicador biológico interferindo na quantidade detectada do biomarcador, o que altera o resultado da análise. Outros fatores relacionados ao hábito das pessoas como a ingestão de bebidas alcoólicas e o uso de cigarro também podem promover alterações nos níveis de biomarcadores monitorados. No caso do álcool, as enzimas presentes no organismo que participam da metabolização destes agentes tóxicos podem ser afetadas devido a inibição da ação enzimática promovendo alterações nos níveis de biomarcadores monitorados. Já em

peças fumantes, devem ser esperadas quantidades maiores de alguns marcadores que em não fumantes, uma vez que o cigarro contém inúmeras substâncias, dentre elas o tolueno, o qual gera um incremento no sinal do ácido hipúrico detectado (ČERNÝ *et al.*, 1990; ALESSIO; APOSTOLI; CRIPPA, 1995). Outra alteração dos níveis de ácido hipúrico se deve ao consumo de alimentos ou bebidas contendo benzoato, muito usado como conservante (refrigerantes, margarina, condimentos, entre outros), ou polifenóis, presentes em muitas plantas e frutas (camomila, chá verde, café, chimarrão, uva), que são metabolizados nesse biomarcador (PENNER *et al.*, 2010; OGAWA *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2006). Também é conhecido que diferenças significativas nos níveis de ácido hipúrico podem ser indicativos de doenças, como por exemplo, diabetes ou problemas renais em crianças (PENNER *et al.*, 2010).

As técnicas de análise empregadas na determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em urina incluem cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica e espectrometria de massas (FUJII *et al.*, 1999; MANINI; ANDREOLI; MUTTI, 2006; PENNER *et al.*, 2010; LAFFON; LEMA; MENDEZ, 2001; BULÇÃO *et al.*, 2008; ANTUNES; PATUZZI; LINDEN, 2008); cromatografia iônica com detecção de condutividade (ZHAO *et al.*, 2011); cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama e espectrometria de massas (SILVA *et al.*, 2002; OHASHI *et al.*, 2006; SAITO; TAKEICHI, 2002); cromatografia eletrocinética capilar micelar e eletroforese capilar de zona com detecção espectrofotométrica (ZUPPI *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2007; ZINELLU *et al.*, 2010; FUJII *et al.*, 1999; TUMA; SAMCOVÁ; BALÍNOVÁ, 2005; ZHOU *et al.*, 2010). Nos métodos dos artigos citados nenhum mostra a separação simultânea de todos os analitos de interesse. Além disso, a maioria apresenta tempos de separação de alguns min variando de 5 a 15 min. Também, em muitos dos métodos citados, especialmente os métodos cromatográficos, são envolvidos procedimentos complexos de preparo das amostras por centrifugação, derivatização, filtração, entre outros, o que diminuem a frequência analítica. Na análise de fluídos biológicos normalmente são processadas inúmeras amostras e, com isso, surge a necessidade de métodos rápidos para determinação dos analitos de interesse de preferência com procedimentos simples de preparo de amostra, o que

contribui para diminuir o custo das análises. A CE é uma técnica analítica versátil e poderosa que possibilita o desenvolvimento de métodos com essas características. Dentre suas vantagens pode-se destacar: alta eficiência de separação; uso de pequenos volumes de amostra; simplicidade instrumental; inúmeras possibilidades de alterações das condições de separação como o uso de modificadores do EOF para diminuir o tempo de separação dos analitos e prevenir contra interações indesejáveis na superfície do capilar com compostos da matriz da amostra; simplicidade de preparo das amostras (SIMPSON; QUIRINO; TERABE, 2008). Essas vantagens tornam a técnica uma ferramenta importante no desenvolvimento de métodos para minimizar o tempo de separação dos analitos e simplificar o procedimento de preparo das amostras.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é desenvolver um método rápido de separação para determinar creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina utilizando CE em um capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. Também, verificar a quantidade de ácido hipúrico urinário gerado durante a ingestão de diferentes bebidas contendo precursores metabolizados nessa molécula e avaliar o seu nível de influência no exame que emprega o ácido hipúrico como biomarcador da exposição ao tolueno.

5.2.2 Objetivos Específicos

- selecionar as condições de separação do método para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico por CE, assim como, componentes do eletrólito de corrida, padrão interno, tensão de separação, tempo de injeção e tipo de revestimento do capilar, utilizando o auxílio do *software PeakMaster* para otimizar alguns destes parâmetros;
- avaliar o desempenho do método durante várias injeções de uma amostra de urina em um capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena observando-se o tempo de migração dos analitos, e também determinar o tempo instrumental de análise;
- avaliar o método proposto para quantificação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina determinando os parâmetros: seletividade; limites de detecção e quantificação; precisão instrumental, intra-ensaio e intermediária; resolução e número de pratos; entre outros;
- aplicar o método desenvolvido na determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina para verificar a taxa de eliminação de ácido hipúrico pelo

organismo durante a ingestão de diferentes bebidas contendo precursores do ácido hipúrico que podem influenciar na interpretação do exame relativo ao uso dessa molécula como biomarcadora da exposição ao tolueno.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes e soluções empregadas no revestimento do capilar com SAQQ reticulado e κ -carragena estão descritos no Capítulo 1. Tris adquirido da Labsynth (Diadema, SP, Brasil) e ácido 2-hidroxiisobutírico (HIBA) adquirido da Aldrich (Milwaukee, WI, USA), ambos com grau analítico, foram usados para preparar o eletrólito de corrida. Creatinina e ácido 3,5-dihidroxibenzóico (padrão interno – PI) foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Ácido hipúrico, ácido mandélico e L-histidina foram adquiridos da Sigma (São Paulo, SP, Brasil). Soluções padrão estoque de cada analito 1000 mg L^{-1} foram preparadas com água deionizada. As soluções de calibração de creatinina, L-histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico foram preparadas por diluição das soluções estoque em uma faixa de concentração de 12 a 125 mg L^{-1} . Água deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), com resistividade de $18,2 \text{ M } \Omega \text{ cm}$, foi usada para preparar todas as soluções.

5.3.2 Sistema de eletroforese capilar

Para otimizar a separação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico, todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent Technologies modelo CE 7100 (Palo Alto, CA, E. U. A.), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas para quantificação dos quatro analitos foram realizadas em 200 nm, com temperatura controlada de 25°C usando um capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliacrilato proveniente da empresa Microtube (Araraquara, Brasil) com 32 cm de comprimento total (8,5 cm até o detector) x $50 \text{ } \mu\text{m DI}$ x $365 \text{ } \mu\text{m DE}$. O capilar usado no desenvolvimento do método foi revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena conforme descrito anteriormente (ver parte experimental do Capítulo 2). O eletrólito de corrida usado

para determinar as concentrações de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico nas amostras de urina foi composto de Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹, em pH 3,65. Os padrões e as amostras foram introduzidos na parte mais curta do capilar até o detector e injetados por pressão hidrodinâmica negativa de 50 mbar durante 3 s. A tensão de separação aplicada foi de 30 kV com polaridade positiva na injeção. O capilar foi lavado 0,5 min com eletrólito entre as corridas. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados utilizando o *software Chemstation*[®].

5.3.3 Amostras de urina

O emprego do método proposto na análise de amostras de urina foi realizado por meio de um estudo para verificar os efeitos de interferência nos níveis de ácido hipúrico na urina em função da ingestão de diferentes bebidas contendo substâncias que como tolueno são convertidas em ácido hipúrico. Para isso, foram coletadas amostras de urina de um voluntário antes, durante e depois da ingestão de diferentes bebidas comumente consumidas. Foram realizados dois experimentos distintos: um ingerindo doses de cada bebida testada ao longo de um dia e o outro ingerindo uma dose elevada da bebida no menor tempo possível cessando a ingestão após essa dose elevada. As bebidas foram ingeridas em dias diferentes tendo um dia de intervalo entre cada uma (nesse dia não foi ingerido nenhuma bebida além de água mineral). As bebidas usadas nos experimentos foram chimarrão, café, chá e refrigerante. A quantidade de cada bebida ingerida ao longo de um dia foi: 1 L de chimarrão em cerca de 80 g de erva mate divididos em 20 doses de 50 mL; 0,8 L de café divididos em 4 doses com cada dose contendo 2 colheres de chá cheias de café instantâneo em 200 mL de água; 0,8 L de chá verde divididos em 4 doses cada uma contendo 1 saquinho de chá em 200 mL de água; 1 L de refrigerante (I), sem benzoato, dividido em 5 doses cada uma contendo 200 mL; 1 L de refrigerante (II), com benzoato, dividido em 5 doses cada uma contendo 200 mL; 1 L de refrigerante (III), com benzoato, dividido em 5 doses cada uma contendo 200 mL. Quanto aos experimentos tomando uma quantidade de bebida no menor tempo possível foi ingerido: 1L de

refrigerante (II) tomado entre 09:00 e 10:30 h; 0,4 L de café dividido em 2 doses com cada dose contendo 2 colheres de chá cheias de café instantâneo em 200 mL de água de tomado entre 09:00 e 10:30 h. As amostras de urina foram coletadas ao longo do dia sendo imediatamente armazenadas em geladeira a temperatura de 4 °C até as análises. Antes das determinações das concentrações dos analitos por CE as amostras foram deixadas a temperatura ambiente até atingirem o equilíbrio de temperatura, agitadas em vortex por 20 s e centrifugadas a 10000 rpm por 60 s. Posteriormente, as amostras foram diluídas em uma razão 1:20 com água deionizada, depois diluídas 1:1 com solução contendo ácido 3,5-dihidroxibenzoico 20 mg L⁻¹ (PI) (amostras de urina injetadas diluídas 40 vezes com concentração final de PI 10 mg L⁻¹) e reservadas para serem analisadas. As amostras foram preparadas em duplicata e injetadas em duplicata.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.4.1 Parâmetros para um método rápido para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico por CE

5.4.1.1 Escolha dos componentes do eletrólito de corrida e padrão interno

Todos os analitos de interesse apresentam em sua estrutura química grupos cromóforos (Figura 5.1) permitindo o desenvolvimento de um método com detecção direta no UV.

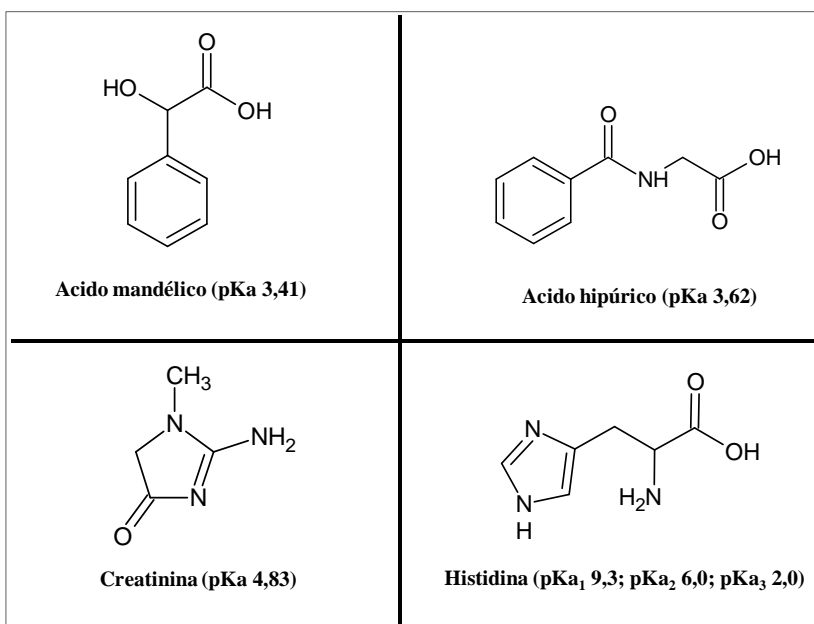


Figura 5.1 Estrutura química dos analitos de interesse a serem determinados no método por CE.

Além destas características estruturais pode-se destacar que dependendo do pH do eletrólito os ácidos hipúrico e mandélico migram como ânions diante da aplicação de um campo elétrico, enquanto a creatinina migra com carga positiva e a histidina pode migrar como ânion ou como cátion dependendo do pH do eletrólito. Assim, a proposta é desenvolver um método para separar simultaneamente moléculas catiônicas e aniônicas. Para isso, é importante verificar o perfil de mobilidade de cada um dos analitos através das curvas de mobilidade efetiva em função do pH que estão apresentadas na Figura 5.2.

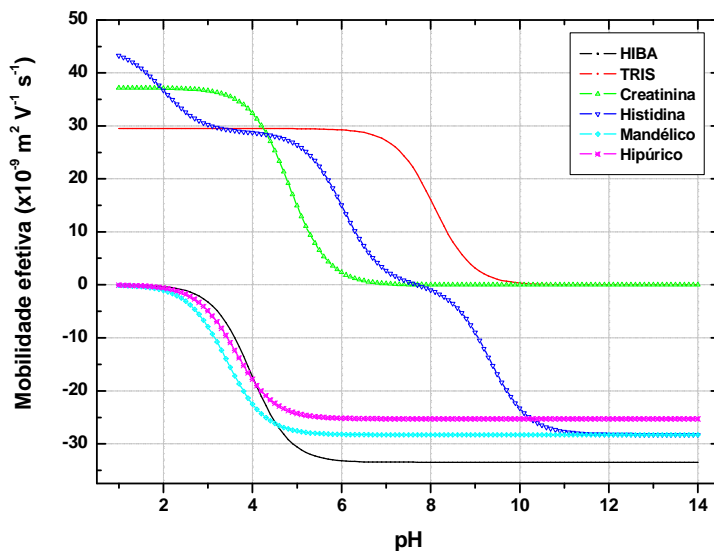


Figura 5.2 Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH dos analitos creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico, e dos componentes do eletrólito de corrida selecionados, feitas utilizando o simulador Simul (MICKE, 2004)

É possível observar que os ácidos hipúrico e mandélico apresentam mobilidade diferente de zero a partir de pH cerca de 2,5, enquanto que a creatinina tem mobilidade maior que zero até pH 6, tornando-se uma molécula neutra a partir deste. Por isso, a faixa de pH possível de ser usada a fim de todos os analitos estarem ionizados, inclusive a histidina, possibilitando a separação é de 2,5 a 6. Nessa faixa de pH, uma molécula que pode ser o co-íon dos ácidos hipúrico e mandélico e ao mesmo tempo o contra-íon da creatinina e histidina é o HIBA, por apresentar mobilidade próxima dos dois ácidos (Figura 5.2), o que contribui para uma boa simetria desses picos, e além disso por não apresentar grupos cromóforos não interferindo na detecção. Já o co-íon para a creatinina e histidina, que é também o contra-íon dos ácidos hipúrico e mandélico, pode ser o Tris, uma molécula que contribui para a formação do eletrólito de corrida conferindo características para uma separação adequada da creatinina e histidina da mesma forma que o HIBA contribui para a separação dos dois outros analitos. Por fim, o padrão interno a ser selecionado para o método é o ácido 3,5-dihidroxibenzóico, uma molécula que não está presente nas amostras de urina e, assim como os analitos, absorve no UV.

5.4.1.2 Avaliação das condições de separação usando o *software PeakMaster* e uso de capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena no desenvolvimento do método rápido de separação

Para verificar os parâmetros do sistema de separação com Tris e HIBA e escolher as concentrações dos mesmos, foi construído um gráfico de diferentes parâmetros mantendo a concentração de Tris fixa em 10 mmol L^{-1} e variando a concentração de HIBA. Os dados foram obtidos usando o *software PeakMaster* e os resultados estão apresentados na Figura 5.3.

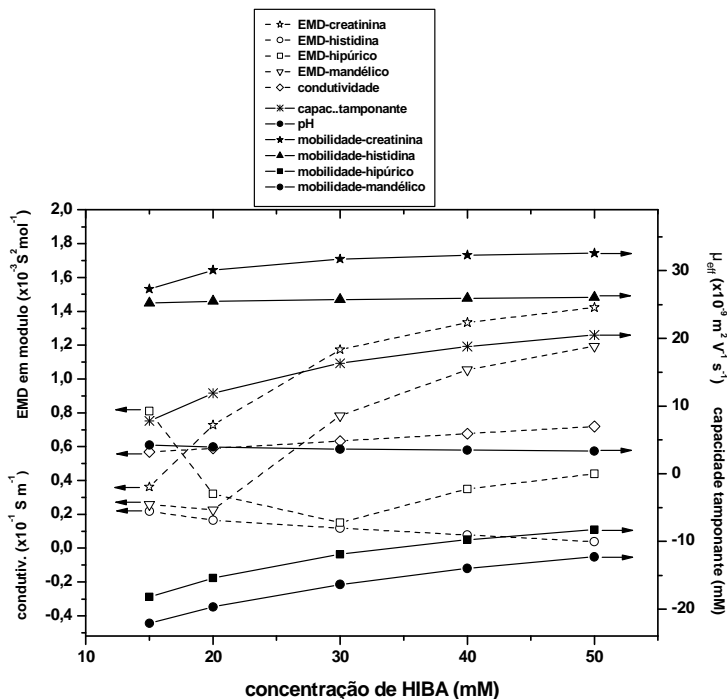


Figura 5.3 Dados da simulação das condições de separação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico usando concentração fixa 10 mmol L^{-1} de Tris e variando a concentração de HIBA. Dispersão por eletromigração (EMD) expressa em módulo.

É possível observar que com concentração muito baixa de HIBA os valores de mobilidade da creatinina e histidina ficam muito próximos podendo comprometer a separação destes analitos, além da capacidade tamponante ficar abaixo de um valor mínimo de 10 mmol L^{-1} . Em concentrações elevadas de HIBA a dispersão por eletromigração é mais pronunciada para o ácido mandélico e creatinina. Assim, a fim de ter um compromisso com todos estes parâmetros foi escolhida a concentração de HIBA 30 mmol L^{-1} resultando em um eletrólito com pH

3,6. Nessa concentração, a diferença de mobilidade entre a creatinina e histidina é suficiente para a separação; as mobilidades dos ácidos hipúrico e mandélico são reduzidas o que contribui para uma rápida separação dos dois no modo contra-eletrosmótico; a capacidade tamponante é cerca de 16 mmol L^{-1} ; e os valores de EMD e condutividade são adequados para a separação.

A separação simultânea dos analitos de interesse em um capilar não revestido só seria possível em um pH que a mobilidade do EOF fosse maior que a mobilidade dos ácidos hipúrico e mandélico, uma vez que os dois são separados no modo contra-eletrosmótico. Assim, fica configurado que a separação é fortemente dependente do pH do eletrólito, pois em pH baixo onde a mobilidade do EOF é menor que a mobilidade do ácido hipúrico e mandélico esses dois não são detectados. O aumento do pH aumenta o EOF para permitir a condução dos ácidos até o detector, porém aumenta também a mobilidade dos ácidos hipúrico e mandélico e diminui a da creatinina até valores muito baixos fazendo esse analito migrar muito próximo do pico do EOF o que em uma amostra complexa pode ser problemático, pois pode comprometer a separação. Além disso, nos pH por volta de 6 o EOF está em uma região de instabilidade e isso também poderia comprometer a repetitividade do método, e dependendo do grau de variação não permitir a detecção simultânea dos analitos. Por isso, no pH selecionado para a separação dos analitos (3,6) o capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena se constitui como uma boa alternativa, apresentando EOF elevado praticamente constante ($\sim 30 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; perfil de mobilidade descrito no Capítulo 1) na faixa de pH baixo podendo ser empregado no método. Essa modificação contribui para o desenvolvimento de um método rápido de separação dos analitos de interesse, somando a mobilidade do EOF com as mobilidades da creatinina e histidina, e conduzindo os ácidos hipúrico e mandélico até o detector.

5.4.1.3 Efeito Joule, força iônica e tensão de separação

A verificação da existência do efeito Joule pelo desvio da lei de Ohm no eletrólito do método proposto usando Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹ foi realizada e os resultados estão apresentados na Figura 5.4.

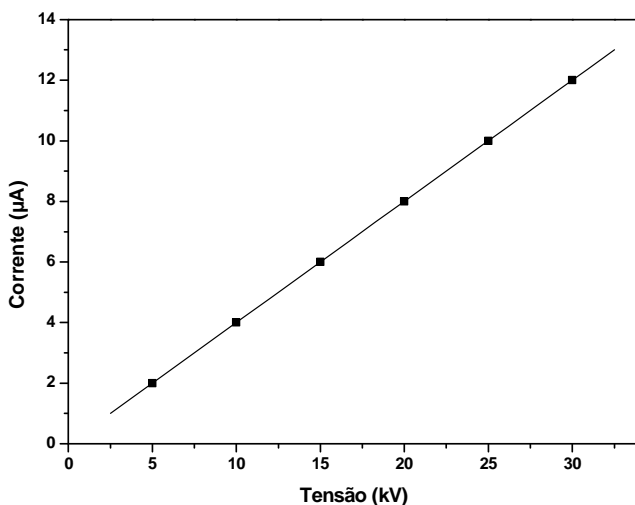


Figura 5.4 Variação da corrente em função da aplicação de tensão para o eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹, pH 3,63, força iônica 10 mmol L⁻¹, realizada em um capilar de 32 cm (L_{tot}) x 50 µm (DI).

A variação da corrente obtida mostrou uma relação linear com a tensão aplicada com coeficiente de determinação 0,9999 e um elevado valor de F mostrando a significância do modelo linear ($F = 59643$), revelando a mínima existência do efeito Joule até a tensão máxima de 30 kV. Quanto à possibilidade de utilização de uma força iônica maior

que 10 mmol L^{-1} , por exemplo, 20 mmol L^{-1} , não seria vantajosa pois a capacidade tamponante do eletrólito com 10 mmol L^{-1} de força iônica já é suficiente (cerca de 16 mmol L^{-1}). Além disso, com o aumento da força iônica ocorre uma diminuição do EOF, devido a compressão da dupla camada elétrica. Com isso o tempo de separação dos analitos aumenta, especialmente dos ácidos hipúrico e mandélico (últimos picos a migrar no modo contra-eletrosmótico), o que prejudica uma separação rápida. Também o perfil dos picos obtidos no eletrólito 10 mmol L^{-1} ficou melhor que no de 20 mmol L^{-1} apresentando uma eficiência de separação maior (eficiência média para 10 mmol L^{-1} de força iônica: $25357 \text{ pratos m}^{-1}$; e eficiência média para 20 mmol L^{-1} de força iônica: $18383 \text{ pratos m}^{-1}$). Com relação a tensão de separação para ser empregada no método foi escolhido 30 kV , pois como a intenção é desenvolver um método rápido a tensão selecionada foi a máxima permitida pelo equipamento.

5.4.1.4 Eletroferograma simulado e experimental e tempo de injeção no método proposto

Após todas as otimizações no método proposto foi realizada a simulação da separação dos analitos usando o *software PeakMaster* e comparado com um eletroferograma obtido experimentalmente, os quais estão apresentados na Figura 5.5.

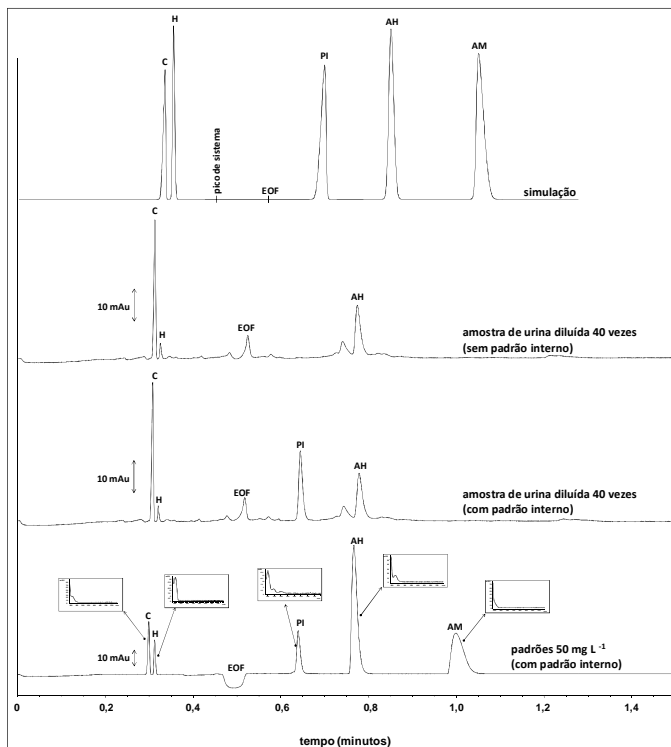


Figura 5.5 Eletroferograma simulado usando o *software PeakMaster*; eletroferogramas de uma amostra de urina diluída 40 vezes com e sem padrão interno; e eletroferograma de uma solução padrão. Condições experimentais: eletrólito composto por Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹; pH 3,64; capilar de sílica fundida de 32 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 50 μ m (DI) revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena; lavagem entre corridas com eletrólito 0,5 min; injeção 50 mbar/3 s pelo caminho mais curto do capilar até do detector; separação 30 kV; temperatura 25 °C; detecção em 200 nm. Outras condições da simulação: EOF 32 $\times 10^{-9}$ m² V⁻¹ s⁻¹, tensão efetiva calculada para cada analito. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico; mobilidade $-24,1 \times 10^{-9}$ m² V⁻¹ s⁻¹, calculada pelo método de WILLIAMS e VIGH; 1996, e correção da força iônica); EOF-fluxo eletrosmótico.

Na simulação foi utilizada a equação abaixo para corrigir a tensão aplicada em cada analito, uma vez que no equipamento utilizado existe uma rampa de aplicação de tensão.

$$V_{\text{eff}} = (1 - ((t_{\text{ramp}} / (2 t_{\text{obs}})))) V_{\text{apl}} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde t_{ramp} é o tempo da rampa de tensão estimado em 9,6 s; t_{obs} é o tempo de migração observado em s; V_{apl} é a tensão aplicada em volts; e V_{eff} é a tensão efetiva em volts (valor usado na simulação). Os dados obtidos foram transferidos para o *software Origin*[®] no qual foi construído o eletroferograma simulado. Foi observada uma boa proximidade entre o eletroferograma simulado e obtido experimentalmente. Além disso, também o perfil do eletroferograma de uma amostra de urina foi semelhante ao de uma mistura de padrões. Foi possível verificar que, no tempo de migração do padrão interno, não existe nenhum pico presente no eletroferograma da amostra de urina o que permite seu uso para esta função no método.

Para verificar o efeito do tempo de injeção no sinal dos analitos de interesse foi construído um gráfico de altura de pico em função do tempo de injeção e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.6.

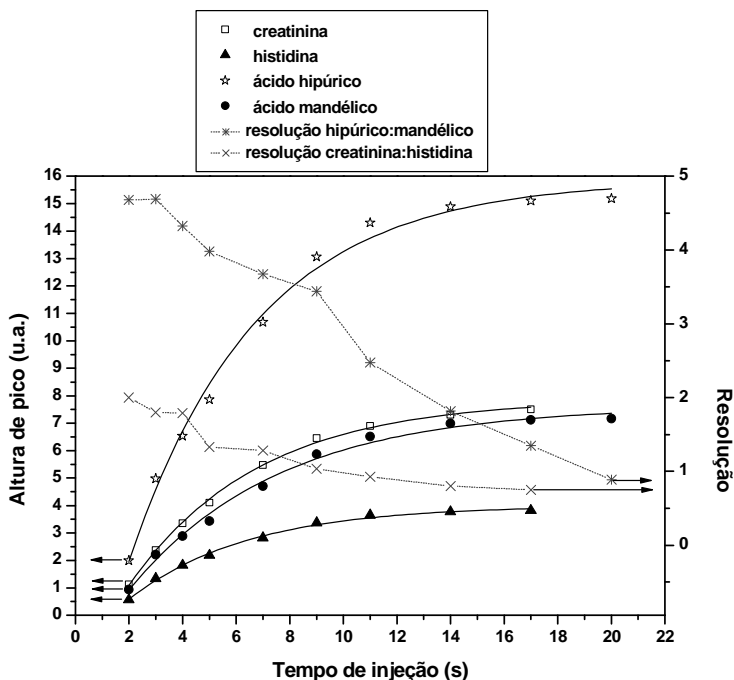


Figura 5.6 Altura do pico para creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico; e resolução creatinina:histidina e ácido hipúrico:ácido mandélico em função do tempo de injeção; usando o capilar modificado com SAQQ reticulado e κ -carragena. Eletrólito Tris 10 mmol L^{-1} e HIBA 30 mmol L^{-1} , pH 3,63, força iônica 10 mmol L^{-1} . Condições de injeção: -50 mbar/x s (solução padrão); tensão 30 kV; tempo de condicionamento entre corridas com eletrólito 0,5 min; concentração dos padrões creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico todos $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. Capilar de sílica fundida de 32 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e $50 \mu\text{m}$ (DI) e detecção em 200 nm.

É possível observar que em todos os casos a altura do pico aumenta com o aumento do tempo de injeção até um máximo em cerca de 11 s, embora a resolução entre os picos decaia significativamente com o aumento do tempo de injeção. Levando em conta que em um método rápido de separação deve-se obter a maior resolução possível da separação foi selecionado o tempo de injeção de 3 s usando pressão hidrodinâmica de 50 mbar, pois com esta configuração foi mantida uma boa resolução entre os picos de ambos os pares (creatinina:histidina; ácido mandélico:ácido hipúrico). Outro fator que colabora com a escolha deste tempo é que o pico do EOF aumenta significativamente com o aumento do tempo de injeção podendo interferir na análise devido a sua aproximação dos picos da creatinina e histidina. Além disso, a magnitude do sinal dos analitos pode ser controlada usando uma diluição apropriada da amostra, dependendo da quantidade de cada analito. Outra vantagem desse tempo de injeção é a possibilidade de obter uma faixa de calibração maior que com tempos elevados mantendo uma resolução mínima, pois com elevados tempos de injeção quanto maior a concentração dos analitos maior a probabilidade de comigração, o que limita a faixa de calibração. Também, com o tempo de 3 s, o volume de amostra injetada no capilar é pequeno e isso previne interações indesejáveis da superfície do capilar com as proteínas da amostra auxiliando na estabilidade do EOF ao longo das corridas.

5.4.1.5 Injeção de amostra de urina diversas vezes para verificar desempenho do método e tempo instrumental de análise

A fim de avaliar o desempenho do método proposto utilizando capilar modificado com SAQQ e κ -carragena foram realizadas 98 corridas no mesmo sistema de separação (corridas uma seguida da outra; no mesmo capilar, mesmo revestimento e eletrólito) incluindo uma amostra de urina diluída 40 vezes, outra amostra de urina diluída 50 vezes e uma solução padrão dos analitos 50 mg L^{-1} , todas diluídas em água deionizada e injetadas. Os eletroferogramas sobrepostos obtidos para a amostra de urina diluída 40 vezes, outra amostra diluída 50 vezes e a comparação de alguns dos eletroferogramas das 98 corridas realizadas com amostra e padrões estão apresentados nas Figura 5.7, 5.8

e 5.9, respectivamente. Foi possível verificar uma pequena variação nos tempos de migração dos picos ao longo das corridas mostrando uma boa adequação do método para análise das amostras de urina. Outra informação importante foi o bom comportamento da modificação da superfície do capilar com SAQQ reticulado e κ -carragena mantendo o EOF estável durante as corridas, indicando que as proteínas presentes na amostra de urina não interferem na mobilidade do EOF.

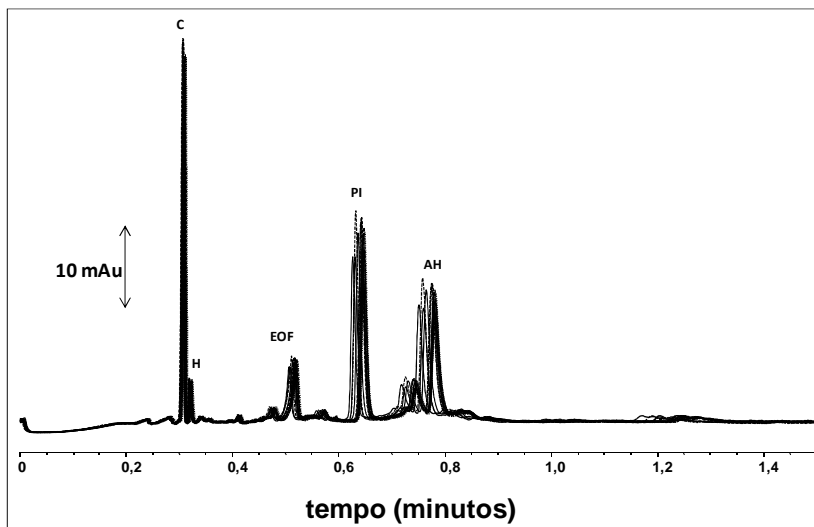


Figura 5.7 Eletroferogramas sobrepostos de 40 corridas de uma amostra de urina diluída 40 vezes. Condições experimentais: eletrólito Tris 10 mmol L⁻¹ e HIBA 30 mmol L⁻¹, pH 3,63, capilar de sílica fundida de 32 cm (L_{tot}), 8,5 cm (L_{det}), e 50 μ m (DI) revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena, lavagem entre corridas com eletrólito 0,5 min, injeção 50 mbar/3 s pelo caminho mais curto do capilar até do detector, separação 30 kV, temperatura 25 °C, detecção em 200 nm. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico).

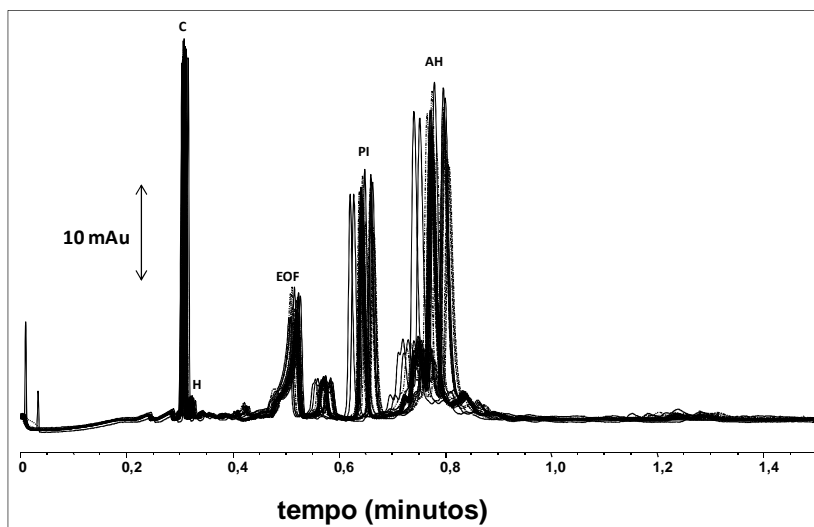


Figura 5.8 Eletroferogramas sobrepostos de 40 corridas de outra amostra de urina diluída 50 vezes. Condições experimentais: ver Figura 5.7. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzóico).

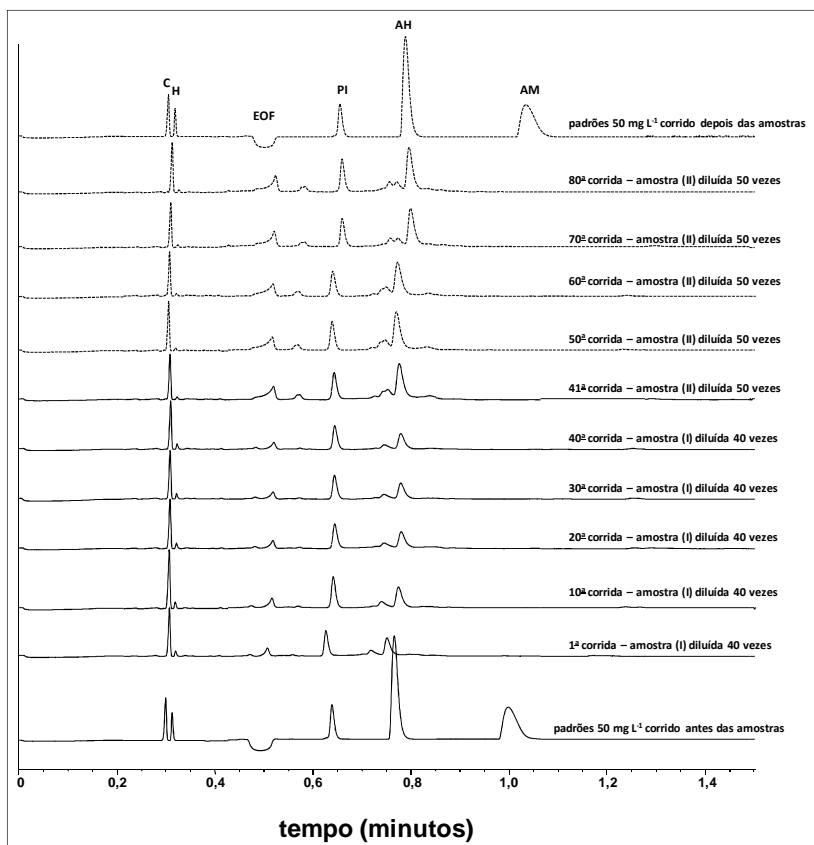


Figura 5.9 Eletoferogramas comparando algumas das 98 corridas realizadas com duas amostras de urina diluídas e padrões dos analitos usando o método otimizado. Condições experimentais: ver Figura 5.7. Legenda dos picos: C – creatinina; H – histidina; AH – ácido hipúrico; AM – ácido mandélico; PI – padrão interno (ácido 3,5-dihidroxibenzoico).

Quanto ao tempo instrumental de análise (TIA) foram gastos 2,95 min (Figura 5.10). Do TIA a maior parte foi utilizada na separação, cerca de 51%, e o menor dispêndio de tempo ocorreu na etapa de condicionamento do capilar entre corridas, 17%. Com o TIA obtido pelo método otimizado é possível realizar cerca de 20 corridas h^{-1} .

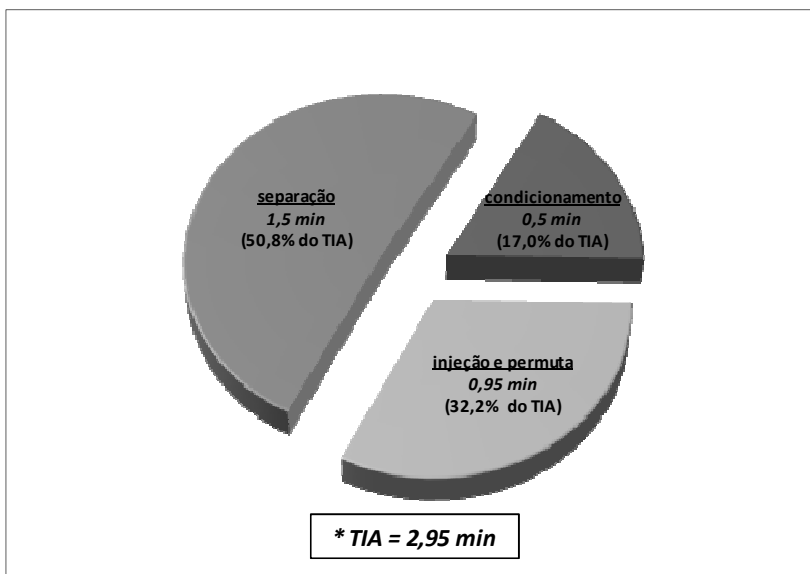


Figura 5.10 Gráfico representando as porcentagens de tempo gasto em cada etapa do método proposto em relação ao tempo instrumental de análise usando o método otimizado.

5.4.2 Desempenho analítico do método

A avaliação do método proposto otimizado para a determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em urina foi realizada utilizando os parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e seletividade (RIBANI *et al.*, 2004). Também foi avaliada a conformidade do sistema.

A seletividade do método proposto para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em urina foi avaliada empregando o método de adição de padrão e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.1. As inclinações da curva de adição de padrão (creatinina 0,0113, histidina 0,0064, ácido hipúrico 0,0918 e ácido mandélico 0,0650) e da curva de calibração externa (creatinina 0,0107, histidina 0,0062, ácido hipúrico 0,0859 e ácido mandélico 0,0609) foram comparadas. A aplicação do *teste-t* mostrou que as inclinações das curvas de calibração externa e de adição de padrão em todos os casos são estatisticamente iguais (creatinina $t_{calc} = 0,47$, histidina $t_{calc} = 0,23$, ácido hipúrico $t_{calc} = 1,65$, ácido mandélico $t_{calc} = 1,13$, $t_{critic} = 4,3$, com nível de confiança de 95%). A proximidade observada entre as inclinações das curvas indicam que o método apresenta seletividade adequada para a análise destes analitos nas amostras de urina. Foi possível verificar também que os resultados de recuperação para seis níveis de concentração mostraram uma boa concordância (98-106% de recuperação) com os valores de referência, sugerindo que o método apresenta exatidão aceitável.

Tabela 5.1 Verificação da seletividade do método para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina usando adição de padrão. Dados adquiridos em 200 nm.

Concentração adicionada, mg L ⁻¹	Concentração recuperada, mg L ⁻¹ (recuperação, %)*			
	creatinina	histidina	ácido hipúrico	ácido mandélico
12,5	13,25 (106)	13,05 (104)	12,79 (102)	12,76 (102)
18,75	19,10 (102)	19,23 (103)	19,23 (103)	19,27 (103)
25	24,53 (98,1)	24,84 (99,4)	24,95 (99,8)	24,99 (99,9)
31,25	31,37 (100)	31,20 (99,8)	31,16 (99,7)	31,15 (99,7)
37,5	36,80 (98,1)	37,33 (99,5)	37,35 (99,6)	37,42 (99,8)
43,75	43,73 (99,9)	43,80 (100)	43,68 (99,8)	43,60 (99,7)

* Resultados de duas medidas em duas replicatas ($n = 4$). Recuperação usando uma amostra de urina diluída 40 vezes. Inclinações: creatinina $0,0113 \pm 0,0015$, histidina $0,0064 \pm 0,0012$, ácido hipúrico $0,0918 \pm 0,0047$ e ácido mandélico $0,0650 \pm 0,0050$. Coeficientes de determinação $> 0,999$. Concentração de creatinina na amostra 3020 mg L^{-1} , histidina 594 mg L^{-1} , ácido hipúrico 434 mg L^{-1} , e ácido mandélico não detectado.

Os resultados obtidos de conformidade do sistema, de linearidade, limites de detecção e quantificação, e de precisão para o método proposto estão apresentados nas Tabelas 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente. A eficiência de separação obtida para os analitos foi maior que 23600 pratos por metro e os picos apresentaram uma boa simetria. Também a resolução obtida entre os analitos foi adequada para a separação. As curvas de calibração obtidas para creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico apresentaram uma boa linearidade (coeficiente de determinação $> 0,99$) em uma ampla faixa de concentração. O modelo linear mostrou ser significativo para as curvas de calibração externa dos analitos estudados (F variando entre 16500 e 22000) e não apresentou falta de ajuste (creatinina $F_{calc} = 0,0005$, histidina $F_{calc} = 0,0006$, ácido hipúrico $F_{calc} = 0,0006$, ácido mandélico $F_{calc} = 0,0007$, $F_{critic} = 3,29$; com nível de confiança de 95%). Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente) determinados usando os parâmetros da curva de calibração, foram considerados adequados para a determinação dos analitos de interesse nas amostras de urina, com valores de LD variando de 0,21 a 1,3 mg L⁻¹. As precisões do método foram determinadas usando solução padrão e amostra. Os resultados de precisão instrumental, intra-ensaio e intermediária obtidos para a área de pico e para o tempo de migração apresentaram valores de CV menores que 2,8%, com exceção da histidina que apresentou CV menor que 5%. Apesar de um pouco mais elevados os valores de precisão para a histidina, especialmente no caso da precisão de área de pico na amostra, ainda assim pode ser considerado um valor aceitável diante da complexidade da amostra. Além disso, o sinal de área da histidina foi o menor para os três picos detectados na urina (valor de área de pico menor que 1), o que também pode ter contribuído para um CV mais elevado.

Tabela 5.2 Resultados de parâmetros de conformidade do método otimizado para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analitos			
		creatinina	histidina	ácido hipúrico	ácido mandélico
Número de pratos (N m ⁻¹) ^(a)	3	108410	155724	30107	23604
Simetria de pico ^(b)	3	1,37	0,836	0,626	0,540
Fator de assimetria de pico ^(b)	3	0,674	1,32	1,80	2,25
Fator de cauda de pico ^(b)	3	0,820	1,17	1,48	1,75
Resolução ^(c)	3	1,13 (cre:his)		3,11 (hip:mad)	

^(a) Número de pratos calculado de acordo com a equação $N = 16 (t_i / w_{hi})^2$, onde t_i é o tempo de migração do analito dado em min e w_{hi} é a largura de pico na base, nas mesmas unidades de t_i . Concentração dos analitos 50 mg L⁻¹.

^(b) Simetria de pico obtida do *software Chemstation*[®]. Fator de assimetria calculado usando a distância a partir do centro do pico para a cauda do pico dividido pela distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 10 % da altura máxima do pico. Fator de rejeição foi calculado usando a distância da cauda frontal do pico para a cauda do pico dividido por duas vezes a distância do centro do pico para a cauda frontal, com todas as medidas feitas a 5 % da altura máxima do pico.

^(c) Resolução calculada usando a equação: $Rs = 2 (t_n - t_{n-1}) / (w_n + w_{n-1})$, onde t é o tempo de migração do pico e w é a largura do pico na base. Concentração dos analitos 50 mg L⁻¹.

Tabela 5.3 Resultados de linearidade, limites de detecção e quantificação, e teste estatístico para verificar a significância do modelo linear do método otimizado para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	<i>n</i>	Analitos			
		creatinina	histidina	ácido hipúrico	ácido mandélico
Linearidade-faixa de calibração (mg L ⁻¹) ^(a)	9	12 - 125	12 - 125	12 - 125	12 - 125
Linearidade-inclinação (L mg ⁻¹) ^(a)		0,0107	0,0062	0,0859	0,0609
Desvio padrão inclinação ^(a)		0,0010	0,0003	0,0019	0,0011
Linearidade-intercepto ^(a)		0,0258	0,0159	0,2084	0,0879
Desvio padrão intercepto ^(a)		0,0012	0,0025	0,0056	0,0116
linearidade-coeficiente determinação (R ²) ^(a)		0,999	0,999	0,999	0,999
Limite detecção, LD (mg L ⁻¹) ^(b)		0,371	1,32	0,215	0,628
Limite quantificação, LQ (mg L ⁻¹) ^(b)		1,12	3,99	0,650	1,90
F ^(c)		22066	18046	18704	16512

^(a) Cada ponto da curva de calibração preparado em duplicata e medido em duplicata. Curvas de calibração com correção da área usando padrão interno.

^(b) Limites de detecção e quantificação calculados de acordo com as equações: $LD = (3,3 \times s)/S$; $LQ = (10 \times s)/S$, onde *s* é o desvio padrão do coeficiente linear e *S* é a inclinação da curva analítica, respectivamente.

^(c) Creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico $F_{crític} = 4,49$, NGL = 17.

Tabela 5.4 Resultados de precisão do método otimizado para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina por CE. Condições experimentais: ver seção experimental.

Parâmetro	n	Analitos			
		creatinina	histidina	ácido hipúrico	ácido mandélico
Precisão instrumental, CV (%) – área de pico	20	0,32 (0,67)	0,35 (2,8)	0,37 (1,4)	0,47 (ND*)
Precisão instrumental, CV (%) – tempo de migração	20	0,74 (0,56)	0,77 (0,60)	0,68 (0,74)	0,85 (ND*)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – área de pico	8	1,5 (2,0)	1,6 (4,0)	1,3 (2,4)	1,4 (ND*)
Precisão intra-ensaio, CV (%) – tempo de migração	8	0,86 (1,0)	0,88 (1,0)	0,79 (0,81)	0,92 (ND*)
Precisão intermediária, CV (%) – área de pico	12	1,4 (1,9)	1,4 (5,1)	1,2 (2,8)	1,3 (ND*)
Precisão intermediária, CV (%) – tempo de migração	12	0,74 (0,98)	0,77 (0,94)	0,85 (0,92)	1,1 (ND*)

* Coeficientes de variação calculados com a equação: $CV = (P/\bar{u}) \times 100$, onde P é o desvio padrão absoluto e \bar{u} é a média aritmética da razão de área do analito pelo padrão interno ou a média aritmética do tempo de migração. Valores de CV para precisão instrumental medidos na mesma solução, para precisão intra-ensaio foram 8 preparações com a mesma concentração e para precisão intermediária 8 preparações em um dia e mais 4 preparações em outro dia, usando solução padrão 50 mg L^{-1} dos analitos ou uma amostra. Valores de CV entre parênteses são referentes a uma amostra de urina diluída 60 vezes. *ND – não detectado.

5.4.3 Aplicação do método otimizado na análise de amostras de urina e avaliação do efeito de diferentes bebidas ingeridas no sinal do ácido hipúrico

Na análise de ácido hipúrico como biomarcador a exposição ao tolueno os laboratórios recomendam a coleta da urina ao final da jornada de trabalho e isso abre uma margem para possíveis alterações desse marcador em função de hábitos alimentares podendo gerar resultados não condizentes com a exposição ao tolueno. Essa afirmação decorre do conhecimento que algumas moléculas presentes em certos alimentos são metabolizadas em ácido hipúrico resultando em um aumento desse biomarcador na urina. Os laboratórios indicam como interferentes nessa análise dietas ricas em alimentos que contenham principalmente ácido benzóico, uma substância largamente empregada como conservante, especialmente em refrigerantes (HOMARCO, 2011). A ingestão de outras bebidas como o café também altera os níveis de ácido hipúrico devido a presença de ácidos fenólicos como o ácido clorogênico nessa bebida que é convertido em ácido hipúrico (OGAWA *et al.*, 2011). Assim, foi realizado um experimento para verificar a quantidade e a velocidade de geração de ácido hipúrico na urina durante a ingestão de diferentes bebidas procedendo-se de duas maneiras: ingestão gradativa de doses pequenas da bebida ao longo de um dia e ingestão de um volume elevado da bebida no menor tempo possível. A intensão deste ensaio foi avaliar o grau de interferência no resultado do ácido hipúrico durante a ingestão de cada bebida. A caracterização das diferentes bebidas ingeridas com relação às concentrações de ácido clorogênico e ácido benzóico, substâncias que são metabolizadas em ácido hipúrico, está apresentada na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Concentrações de precursores do ácido hipúrico nas diferentes bebidas ingeridas. Resultados expressos como a média e intervalo de confiança de 95% (amostras preparadas em duplicata e injetadas em duplicata).

bebida	ácido clorogênico (mg L ⁻¹) ^(g)	ácido benzóico (mg L ⁻¹) ^(h)
café ^(a)	432 ± 56	-
chá ^(b)	< LD	-
chimarrão ^(c)	1246 ± 81	-
refrigerante I ^(d)	-	< LD
refrigerante II ^(e)	-	192 ± 7
refrigerante III ^(f)	-	290 ± 2

^(a) Café em pó solúvel instantâneo; concentração dos precursores determinada em uma dose de 200 mL de água contendo 2 colheres de chá cheias de café (~ 4,3 g).

^(b) Chá verde em saquinho contendo folhas e talos de *Camellia sinensis*; concentrações determinadas em 200 mL de água contendo 1 saquinho de chá de 16 g.

^(c) Chimarrão preparado com erva *Ilex paraguariensis*; ~ 80 g de erva mate acomodada em uma cuia e volume de água de 100 mL, concentrações determinadas no primeiro volume de bebida em contato com a erva.

^(g) Ácido clorogênico determinado usando eletroforese capilar em um capilar de 32 cm x 50 µm, eletrólito composto de tetraborato de sódio 10 mmol L⁻¹ em pH 9,3, detecção em 350 nm, injeção 50 mbar/10 s (L_{det} 23,5 cm), tensão 25kV, LD 2,4 mg L⁻¹ e LQ 8,0 mg L⁻¹.

^(h) Ácido benzóico determinado usando eletroforese capilar em um capilar de 32 cm x 50 µm, eletrólito composto de TRIS 25 mmol L⁻¹ e HIBA 12,5 mmol L⁻¹ em pH 8,1, detecção em 200 nm, injeção 50 mbar/3 s (L_{det} 8,5 cm), tensão 30 kV, LD 3,2 mg L⁻¹ e LQ 11 mg L⁻¹.

Os resultados de concentração de creatinina, histidina e ácido hipúrico determinados nas amostras de urina durante a ingestão de água, café, chá e refrigerante estão apresentados nas Figuras 5.11, 5.12, e 5.13, respectivamente. Para o ácido mandélico os níveis de concentração presentes em todas as amostras foram menores que o LD do método. Os valores de concentração obtidos foram maiores para a creatinina, seguido da histidina e ácido hipúrico, embora tenham sido observadas grandes variações entre os níveis de concentração dos três analitos na amostra. Apesar disso, é visível uma certa relação entre os perfis dos

níveis de creatinina e histidina nas amostras ao longo do tempo, embora os valores de concentração sejam muito distintos.

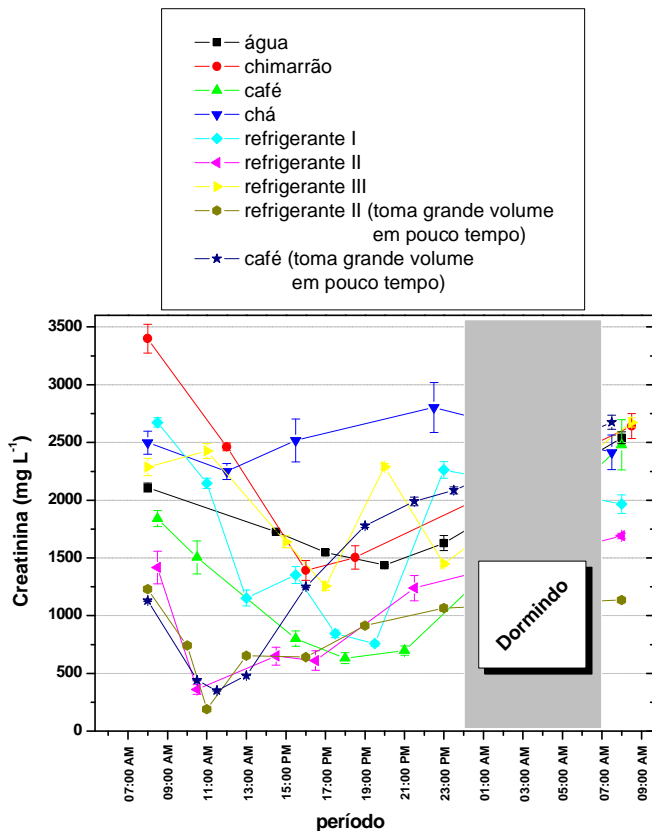


Figura 5.11 Resultados da determinação de creatinina usando o método otimizado por CE-UV em amostras de urina coletadas durante a ingestão de diferentes bebidas. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos. Dados obtidos em 200 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$.

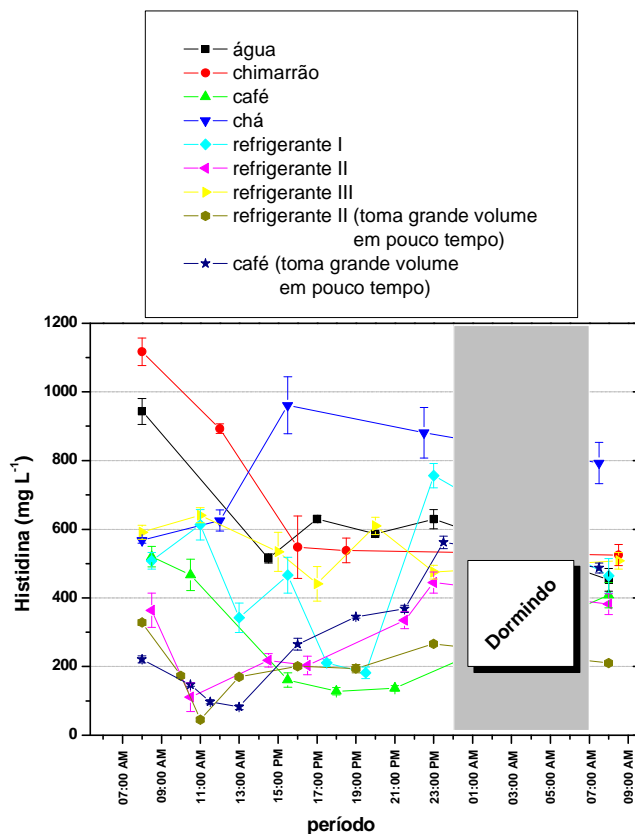


Figura 5.12 Resultados da determinação de histidina usando o método otimizado por CE-UV em amostras de urina coletadas durante a ingestão de diferentes bebidas. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos. Dados obtidos em 200 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$.

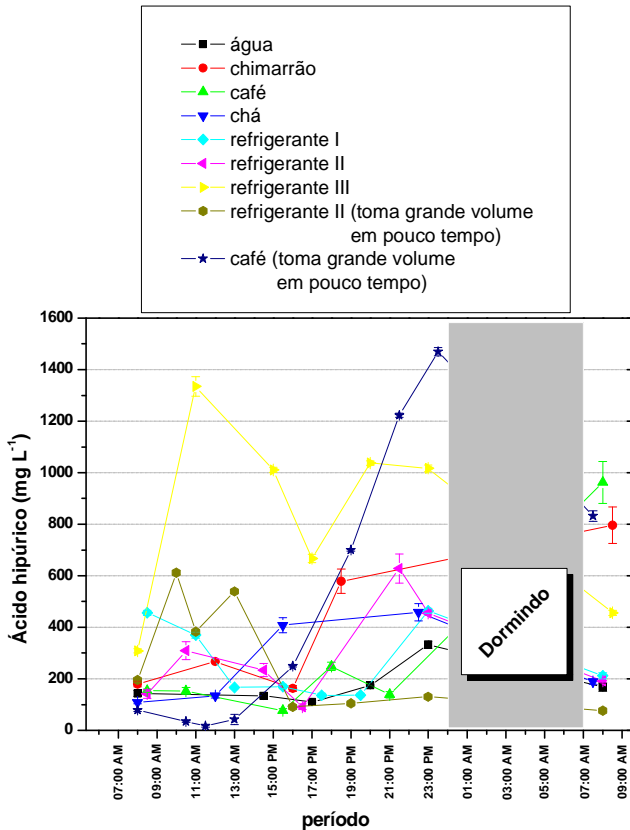


Figura 5.13 Resultados da determinação de ácido hipúrico usando o método otimizado por CE-UV em amostras de urina coletadas durante a ingestão de diferentes bebidas. Condições experimentais: ver seção materiais e métodos. Dados obtidos em 200 nm, e resultados expressos como a média com limite de confiança de 95% para $n = 4$.

Para avaliar os níveis de ácido hipúrico na urina durante a ingestão das diferentes bebidas foi construído um gráfico de concentração de ácido hipúrico pela concentração de creatinina em função do tempo. O gráfico obtido está apresentado na Figura 5.14. Essa é a maneira correta de expressar a concentração de ácido hipúrico no exame para verificar a exposição ao tolueno, pois a creatinina atua como um corretor do volume de urina expelida (ARNDT, 2009).

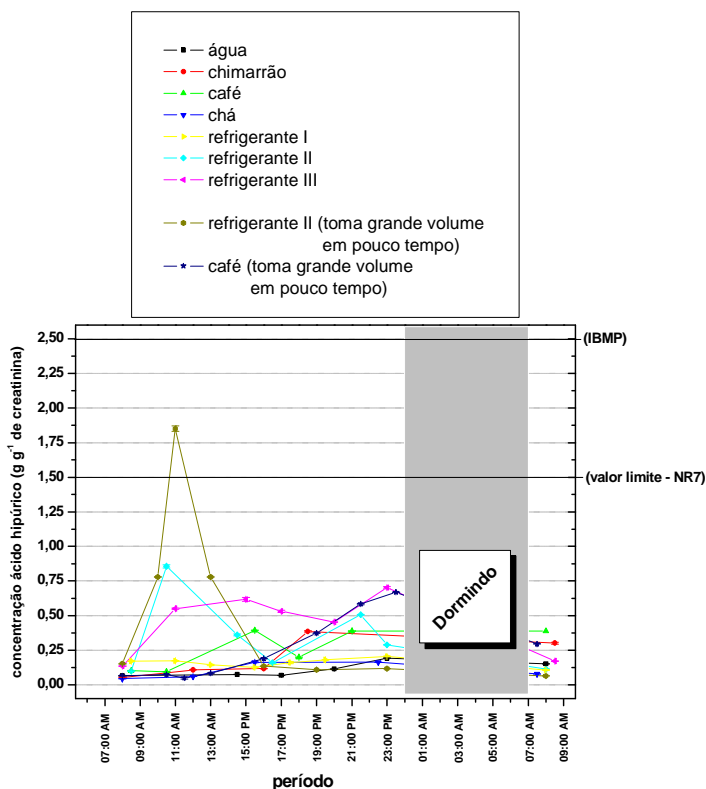


Figura 5.14 Variação da concentração de ácido hipúrico em relação a creatinina durante a ingestão de diferentes bebidas. Informações sobre as bebidas ingeridas: ver seção experimental.

A análise dos resultados obtidos (Figura 5.14) mostrou que durante a ingestão gradativa das diferentes bebidas a concentração de ácido hipúrico no caso da água, chá e refrigerante sem ácido benzóico ficou abaixo de $0,25 \text{ g g}^{-1}$ de creatinina em todo o período monitorado. Enquanto isso, para o café, chimarrão e refrigerante com ácido benzóico os níveis encontrados foram mais expressivos, atingindo um valor de até $0,75 \text{ g g}^{-1}$ de creatinina. Entretanto, em todos esses casos os níveis detectados ficaram abaixo do valor limite estabelecido pela Norma Regulamentadora número 7 (NR-7) da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO, 2011), que estabelece parâmetros biológicos para o controle da exposição a agentes químicos, determinando limites para o ácido hipúrico urinário de até $1,5 \text{ g g}^{-1}$ de creatinina considerado sem risco a saúde (valor limite) e $2,5 \text{ g g}^{-1}$ de creatinina considerado risco extremo (IBMP - Índice Biológico Máximo Permitido). Já para o estudo ingerindo em um curto tempo quantidades elevadas de café e refrigerante contendo ácido benzóico foi possível verificar uma diferença significativa nos níveis de eliminação de ácido hipúrico e também no tempo de eliminação. No caso do refrigerante a geração de ácido hipúrico na urina iniciou rapidamente apresentando um máximo cerca de 30 min após o término da ingestão dessa bebida (1 L de refrigerante ingerido entre 09:00 e 10:30 h), e retornando a níveis baixos a partir de 7 h depois da ingestão. Enquanto isso, o comportamento observado do ácido hipúrico depois de tomar café (0,4 L de café ingerido entre 09:00 e 10:30 h) foi uma eliminação baixa até 7 h depois da ingestão dessa bebida, começando a aumentar gradativamente o nível de ácido hipúrico a partir deste ponto até um máximo 14 h depois da ingestão.

A diferença observada nos níveis de ácido hipúrico em relação à creatinina pode estar relacionada aos processos metabólicos da eliminação dos compostos precursores do ácido hipúrico presentes nas bebidas ingeridas. Um estudo realizado por OGAWA e colaboradores (OGAWA *et al.*, 2011) ilustra a metabolização do ácido clorogênico no organismo, um dos compostos fenólicos mais abundantes no café. A eliminação deste composto envolve a formação de diferentes intermediários em diferentes rotas (Figura 5.15), até ser finalmente convertido em ácido benzóico que reage com a glicina originando o ácido hipúrico.

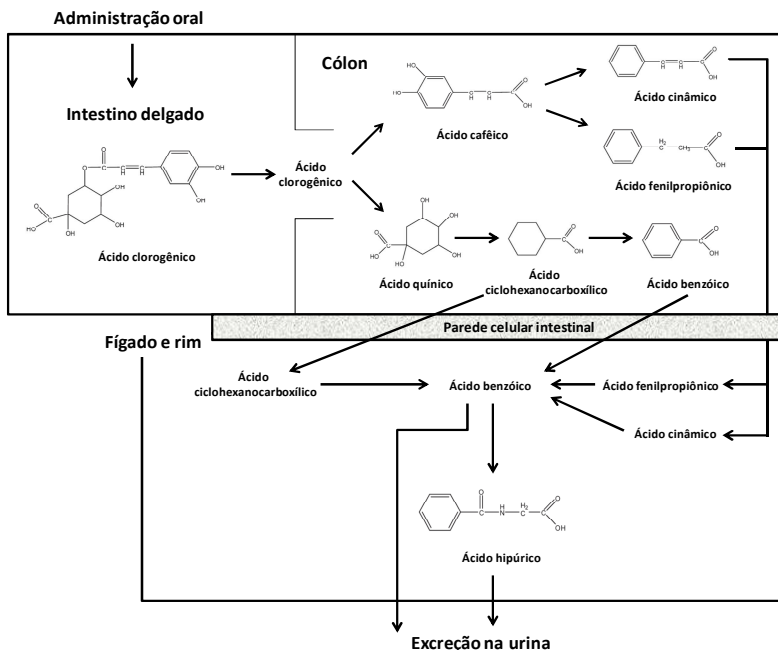


Figura 5.15 Rota metabólica do ácido clorogênico ingerido. (adaptado de OGAWA *et al.*, 2011).

Isso poderia justificar o tempo necessário para a formação do ácido hipúrico na urina quando o café é ingerido. Já para o caso do refrigerante é ingerido diretamente o ácido benzóico que reage com a glicina para formar o ácido hipúrico (última etapa para formação do ácido hipúrico) sendo mais rapidamente eliminado na urina. O que também colabora com essa sugestão são os níveis elevados de ácido hipúrico na manhã do dia seguinte após a ingestão de café e chimarrão, outro indicativo da metabolização mais lenta do ácido clorogênico. Como mostrado no esquema da Figura 5.15 o ácido benzóico também pode ser eliminado na urina sem ser convertido em ácido hipúrico. Por isso devido a elevada ingestão de ácido benzóico no refrigerante tomado

foram realizadas análises com uma das amostras que apresentou um elevado nível de ácido hipúrico nas quais se verificou que essa molécula migra no mesmo tempo do padrão interno, entretanto não foi possível detectá-la quando a amostra foi injetada sem uso do padrão interno. Além disso, o CV da área do padrão interno observado durante a análise das amostras de urina após ingerir refrigerante contendo ácido benzóico e ingerindo somente água, apresentou valores menores que 2% mostrando que o ácido benzóico não interferiu nos resultados das amostras de urina analisadas. Na literatura é descrito que podem ser encontradas pequenas quantidades de ácido benzóico urinário, entretanto a presença de níveis maiores desta molécula na urina pode ser um indicativo do mau funcionamento do metabolismo, especificamente do fígado e rim, na detoxicação do ácido benzóico formando ácido hipúrico (PENNER *et al.*, 2010; LEBEL *et al.*, 1988). Por fim, a diferença significativa observada tanto no tempo de geração do ácido hipúrico quanto nos níveis determinados em função da ingestão de diferentes bebidas com um dos valores ficando acima do valor limite estabelecido pela NR-7, configuraria uma pessoa com riscos a exposição, apesar de não ter tido contato com tolueno. Dos incrementos observados nos níveis de ácido hipúrico durante a ingestão das bebidas pode-se verificar que o efeito da ingestão de bebidas contendo ácido benzóico não seria significativo se a pessoa não ingerisse essa bebida no mesmo dia da coleta. Entretanto, para aquelas contendo ácido clorogênico a eliminação do ácido benzóico foi mais prolongada podendo interferir nos resultados se a bebida fosse tomada no mesmo dia da coleta ou no dia anterior. Isso confirma que a análise dos resultados deste marcador deve ser muito criteriosa sendo talvez necessária a realização de contraprovas do exame.

5.5 CONCLUSÕES

No presente estudo foi desenvolvido um método rápido de separação que permite determinar creatinina, histidina e os biomarcadores ácido hipúrico e ácido mandélico em amostras de urina utilizando Tris e HIBA como componentes do eletrólito de corrida e um capilar revestido com SAQQ reticulado e κ -carragena. O procedimento de preparo da amostra empregado foi simples e rápido. O revestimento usado no capilar apresentou um bom desempenho ao longo de várias injeções de uma amostra de urina, com pequenas variações no tempo de migração dos analitos. O TIA gasto foi menor que 3 min por análise possibilitando realizar cerca de 20 corridas h^{-1} . A avaliação do método mostrou bons resultados de recuperação, de precisão e LD e LQ adequados para análise dos quatro analitos de interesse nas amostras de urina. O método foi aplicado na avaliação dos níveis de ácido hipúrico urinário durante a ingestão de diferentes bebidas mostrando perfis de eliminação de ácido hipúrico distintos, em termos de tempo e quantidade eliminada, principalmente quando ingerido bebida contendo ácido benzóico ou ácido clorogênico. Foi confirmado um incremento significativo na quantidade de ácido hipúrico gerado após a ingestão de bebidas contendo precursores do ácido hipúrico podendo influenciar significativamente na interpretação dos resultados do exame para avaliar a exposição ao tolueno. Estudos deveriam ser realizados com mais voluntários para se ter uma real dimensão da quantidade e do tempo de metabolização dos componentes de diferentes bebidas considerando diferenças entre os organismos, para se predizer quanto tempo antes da coleta o indivíduo deveria ser privado de tal bebida para não alterar os resultados de ácido hipúrico medidos. Seria interessante fazer um estudo também da alteração dos níveis de ácido hipúrico em urina durante a ingestão de alimentos contendo benzoato como conservante, uma vez que inúmeros fabricantes utilizam largamente essa molécula para conservar alimentos.

REFERÊNCIAS

ALESSIO, L.; APOSTOLI, P.; CRIPPA, M. Influence of individual factors and personal habits of biological indicators of exposure. *Toxicology Letters*, v. 77, p. 93-103, 1995.

ANTUNES, M. V.; PATUZZI, A. L. M.; LINDEN, R. Determinação simultânea de creatinina e indicadores biológicos de exposição ao tolueno, estireno e xilenos em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 31, p. 1865-1868, 2008.

ARNDT, T. Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: Reflections using a cohort of 45,000 samples. *Forensic Science International*, v. 186, p. 48-51, 2009.

BLOCK, W. D.; WESTHOFF, M. H.; STEELE, B. F. Histidine Metabolism in the Human Adult: Histidine blood tolerance, and the effect of continued free L-histidine ingestion on the concentration of imidazole compounds in blood and urine. *The Journal of Nutrition*, v. 91, p. 189-194, 1967.

BULCÃO, R.; SANTA MARIA, L.; CHARÃO, M.; MORO, A.; ROEHRS, M.; GARCIA, S. C.; LIMBERGER, R. P. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 31, p. 1343-1348, 2008.

ČERNÝ, S.; MRÁZ, J.; FLEK, J.; TICHÝ, M. Effect of ethanol on the urinary excretion of mandelic and phenylglyoxylic acids after human exposure to styrene. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 62, p. 243-247, 1990.

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. 140-143, 2007.

- ESTEBAN, M.; CASTAÑO, A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environment International*, v. 35, p. 438–449, 2009.
- FONSECA, E. P.; JOHANN, I.; ALEGRETTI, A. P.; THIESEN, F. V. Interferência do consumo de Chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 38, p. 163-165, 2006.
- FUJII, T.; KAWABE, S.; HORIKE, T.; TAGUCHI, T.; OGATA, M. Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis. Comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 730, p. 41–47, 1999.
- HOMARCO. Diagnóstico laboratorial. Auxílio Medicina Ocupacional. Disponível em <http://www.homarco.com.br/site/imagens/pdf/manual_toxicologico.pdf> Acesso em: 24 nov. 2011.
- KIEFER, P.; PORTAIS, J.-C.; VORHOLT, J. A. Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, v. 382, p. 94–100, 2008.
- LAFFON, B.; LEMA, M.; MENDEZ, J. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as indirect evaluation of styrene exposure. *Journal of Chromatography B*, v. 753, p. 385–393, 2001.
- LEBEL, M., FERRON, L., MASSON, M., PICHETTE, J., CARRIER, C. Benzyl alcohol metabolism and elimination in neonates. *Developmental Pharmacology and Therapeutics*, v. 11, p. 347-356, 1988.
- MANINI, P.; ANDREOLI, R.; MUTTI, A. Application of liquid chromatography–mass spectrometry to biomonitoring of exposure to industrial chemicals. *Toxicology Letters*, v. 162, p. 202–210, 2006.

MICKE, G. A. *Otimização e simulação em Eletroforese Capilar*. 2004. 311 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. Legislação da República Federativa do Brasil: banco de dados. Disponível em <http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C812D308E21660130E0819FC102ED/nr_07.pdf> Acesso em: 25 nov. 2011.

NAN, C. G.; PING, W. X.; PING, D. J.; QING, C. H. A study on electrochemistry of histidine and its metabolites based on the diazo coupling reaction. *Talanta*, v. 49 p. 319–330, 1999.

OGAWA, M.; SUZUKI, Y.; ENDO, Y.; KAWAMOTO, T.; KAYAMA, F. Influence of Coffee Intake on Urinary Hippuric Acid Concentration. *Industrial Health*, v. 49, p. 195–202, 2011.

OHASHI, Y.; MAMIYA, T.; MITANI, K.; WANG, B.; TAKIGAWA, T.; KIRA, S.; KATAOKA, H. Simultaneous determination of urinary hippuric acid, o-, m- and p-methylhippuric acids, mandelic acid and phenylglyoxylic acid for biomonitoring of volatile organic compounds by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 566, p. 167–171, 2006.

PEAKMASTER: *software* livre. Versão 5.3. Disponível em: <<http://web.natur.cuni.cz/gas/>> Acesso em: 05 mar. 2011.

PENNER, N.; RAMANATHAN, R.; ZGODA-POLS, J.; CHOWDHURY, S. Quantitative determination of hippuric and benzoic acids in urine by LC–MS/MS using surrogate standards. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, p. 534–543, 2010.

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

ROUX, A.; LISON, D.; JUNOT, C.; HEILIER, J.-F. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based

metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, v. 44, p. 119–135, 2011.

RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; KENDALL, M. Recent and potential developments in the analysis of urine: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 684, p. 17–29, 2011.

SAITO, T.; TAKEICHI, S. Simultaneous detection of hippuric acid and methylhippuric acid in urine by empore™ disk and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, p. 365–370, 2002.

SILVA, Z. L.; SILVEIRA, J. N.; JACINTO, M.; AMORIM, L. C. A.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil-hipúrico urinários por métodos cromatográficos: comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa capilar. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, p. 197 - 204, 2002.

SIMPSON JR., S. L.; QUIRINO, J. P.; TERABE, S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1184, p. 504–541, 2008.

WILLIAMS, B. A.; VIGH, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 68, p. 1174–1180, 1996.

TŮMA, P.; SAMCOVÁ, E.; BALÍNOVÁ, P. Determination of 3-methylhistidine and 1-methylhistidine in untreated urine samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 821, p. 53–59, 2005.

ZHAO, F.; WANG, Z.; WANG, H.; DING, M. Determination of hippuric acid in human urine by ion chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography B*, v. 879, p. 296–298, 2011.

ZHOU, L.; YAN, N.; ZHANG, H.; ZHOU, X.; PU, Q.; HU, Z. Microwave-accelerated derivatization for capillary electrophoresis with

laser-induced fluorescence detection: A case study for determination of histidine, 1- and 3-methylhistidine in human urine. *Talanta*, v. 82, p. 72–77, 2010.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; PISANU, E.; SCANU, B.; SANNA, M.; DEIANA, L.; CARRU, C. Quantification of histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection. *Journal of Separation Science*, v. 33, p. 3781–3785, 2010.

ZUPPI, C.; ROSSETTI, D. V.; VITALI, A.; VINCENZONI, F.; GIARDINA, B.; CASTAGNOLA, M.; MESSANA, I. Determination of urinary hippuric acid by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 793, p. 223–228, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram apresentados diferentes modificações de capilares usando QTS, SAQQ, κ -carragena e, também GLU, como agente reticulante. O preparo dos revestimentos foi muito simples, sendo realizado por lavagens do capilar com soluções envolvidas em cada modificação. Apesar da simplicidade de preparo dos revestimentos, em alguns casos, quando capilares de 50 μm (DI) foram usados durante as modificações com QTS e SAQQ reticulados, algumas vezes ocorreram problemas de entupimento dos capilares. Por isso, deve-se ter cuidado de monitorar a passagem pelo capilar das soluções usadas na modificação durante o preparo dos revestimentos. Os revestimentos propostos apresentaram uma versatilidade interessante com relação aos resultados de mobilidade do EOF em função do pH. Entretanto, valores elevados de CV observados na região de inflexão dos perfis de mobilidade do EOF, especificamente para QTS e SAQQ reticulados, comprometem o uso destes pH em métodos de separação por CE. A avaliação de outras características importantes dos capilares modificados como, estabilidade química e estabilidade ao longo de várias corridas, indicou a compatibilidade das modificações com diferentes soluções e solventes e também, a possibilidade de uso prolongado desses capilares revestidos. A reutilização dos capilares revestidos foi outro ponto estudado, no qual verificou-se a possibilidade de reciclagem dos capilares. As características dos capilares modificados foram exploradas no desenvolvimento de novos métodos analíticos por CE, cada um trazendo vantagens importantes no campo da química analítica. A vantagem do emprego dos capilares modificados com SAQQ sem reticulação e SAQQ reticulado e κ -carragena, aplicados no desenvolvimento de um método para análise de iodeto em amostras de xarope e de um método para análise de betaina e metionina em amostras de hepatoprotetor, respectivamente, foi contribuir para a separação dos analitos no modo co-eletrosmótico, resultando em métodos com tempo de separação de apenas alguns segundos. Os revestimentos com QTS reticulada e SAQQ reticulado e κ -carragena, foram empregados no desenvolvimento de um método para determinar nitrato e tiocianato em amostras de saliva e um método para determinar creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico em

amostras de urina, respectivamente, com a vantagem de permitir a eliminação da etapa do procedimento experimental de precipitação das proteínas presentes em ambas as amostras e contribuir com uma separação rápida dos analitos. A não necessidade de precipitação das proteínas colaborou com a frequência analítica dos métodos e somente foi possível devido a atuação dos revestimentos prevenindo a interação indesejável das proteínas com a parede do capilar. Além disso, no método para determinação de creatinina, histidina, ácido hipúrico e ácido mandélico, o revestimento permitiu a separação rápida e simultânea dos quatro analitos (cátions e ânions) devido ao elevado valor de mobilidade do EOF em pH 3,6 característico da modificação usada. Por fim, a CE com capilares revestidos mostrou um grande potencial de aplicação em métodos de separação.

Como perspectivas do trabalho pode-se citar a complementação da caracterização das modificações propostas por meio da realização de análises de ressonância plasmônica de superfície para determinar a espessura da camada de revestimento formada na superfície do capilar e também, a realização de análises de microscopia de força atômica para ter maiores informações sobre a morfologia dos capilares revestidos a fim de permitir um entendimento maior das características obtidas das modificações. Além disso, empregar os capilares revestidos no desenvolvimento de métodos para determinação de proteínas em amostras de alimentos e amostras biológicas, utilizando como detector o fotodetector baseado na absorção na região do UV-visível e, também o espectrômetro de massas.