



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM PROCEDIMENTOS DE
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Ricardo Mathias Orlando

ORIENTADORA: Dra. Susanne Rath

COORIENTADOR: Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder

Campinas, 3 de junho de 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Or5a Orlando, Ricardo Mathias.
Aplicação de campos elétricos em procedimentos de extração em fase sólida / Ricardo Mathias Orlando. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath.
Coorientador: Prof. Dr. Jarbas Rodrigues Rohwedder.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Extração em fase sólida - Aplicação de campos elétricos. 2. Eletro-extração em fase sólida. 3. Preparo de amostras - Química. 4. Eletrocromatografia. I. Rath, Susanne. II. Rohwedder, Jarbas José Rodrigues. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Application of electric fields in solid phase extraction procedures

Palavras-chaves em inglês: Solid phase extraction-Application of electric fields, Electro solid phase extraction, Sample preparation (Chemistry), Electrochromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Susanne Rath (orientadora), Prof. Dr. Emanuel Carrilho (IQSC-USP), Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass (DQ-UFSCAR), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 03/06/2011

“Temos de fazer o melhor que pudermos. Essa é a nossa sagrada responsabilidade humana”.

Albert Einstein

Dedico este trabalho a todas as pessoas que lutaram e lutam para construir um mundo melhor e também àquelas que apesar de saberem que nunca poderão alcançar os seus sonhos, jamais desistiram de sonhar, de cultivar e fazer o bem.

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Criador, Senhor de todo o conhecimento e de todo amor que nos guia em nossos caminhos.

A minha querida orientadora e amiga, Susanne Rath, que me concedeu o privilégio de compartilhar da sua presença por seis excelentes anos além de dar toda a liberdade para a criação e a execução deste trabalho.

Ao meu nobre coorientador e também amigo Jarbas José Rodrigues Rohwedder cuja hombridade é um exemplo que levarei comigo.

A minha querida família que sempre esteve comigo em minhas conquistas e andanças nos últimos 34 anos. Minhas irmãs queridas que tanto amo: Georgia, Carla e Fernanda. Minha mãe Lourdes e meu pai Geraldo pelo incentivo, pelo apoio e pela vida que vocês me deram.

A todos os demais familiares, em especial ao meu primo André, tios Pedro, Fábio, Ângela, Sandra, Diva, meu querido avô Fabio, minhas queridas avós Maria e Euriva (*in memoriam*) com os quais não tive muitas oportunidades de estar junto nestes últimos anos, mas que sempre estiveram e estarão em meus pensamentos e no meu coração.

A minha querida e amada esposa Cyntia, que teve paciência, amor, solidariedade e me incentivou ao longo desta jornada que, enfim, chega ao seu desfecho.

Ao meu sogro João Ribeiro e a minha sogra Irene que são parte da minha família e que sempre me ajudaram e incentivaram.

Aos meus amigos Moisés, João Felipe, José Marcos e João Marcelo pela amizade e torcida durante todo esse tempo.

Ao grande amigo Jonas Augusto Rizzato Paschoal cuja amizade foi especialmente importante e forte durante estes anos.

Ao Instituto de Química da Unicamp que forneceu a infra-estrutura para a realização deste trabalho e cuja competência e valores dos seus pesquisadores com extrema dedicação e paixão ao que fazem serviram como incentivo e alicerce para o meu desenvolvimento científico.

A FAPESP pela bolsa de estudo que permitiu a execução deste trabalho.

A todos os funcionários de suporte do Instituto de Química e em especial ao amigo e técnico Mário Shissun Toma ao qual foram feitas literalmente centenas de requisições.

A todos os demais colegas do Laboratório D 205 cujo convívio tornou mais alegre e divertido realizar minha pesquisa durante todos esses anos.

CURRICULO VITAE

Dados pessoais

Ricardo Mathias Orlando

Brasileiro, natural de São Paulo – SP, nascido em 12/02/1977

E-mail: orlandoricardo@hotmail.com

Formação Acadêmica

2001 - 2003: Mestrado em Ciências Farmacêuticas na área de concentração de Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP-RP. Ribeirão Preto – SP, Brasil. Dissertação: Análise enantiosseletiva do omeprazol em plasma empregando fases estacionárias quirais. Orientador: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato.

1996 - 1999: Bacharelado em Farmácia pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS. Campo Grande – MS, Brasil.

Artigos completos publicados em periódicos

1. Orlando, R. M.; Bonato, P. S. A simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 795, p. 227-235, 2003.

2. Orlando, R. M.; Gil, E. S. ; Cardoso Filho, N.; Stringhetta, J. P. S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. IV, p. 8-14, 2007.

Capítulos de livros

1. Orlando, R. M. ; Gil, E. S. Preparação de amostras. In: Eric de Souza Gil. (Org.). Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 2ed. São Paulo, Editora Pharmabooks, 2007, p. 79-88.

2. Orlando, R. M. ; Gil, E. S. Métodos de análise e separação. In: Eric de Souza Gil. (Org.). Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos. 2ed. São Paulo, Editora Pharmabooks, 2007, p. 379-403.

Registro de inovação, patente ou marca

1. Orlando, R. M.; Rath, S.; Rohwedder, J. J. R. Dispositivo tipo “manifold” para extração em fase sólida com câmaras e válvulas individualizadas para controle por bomba peristáltica e/ou por vácuo total, do eluato. 2011. Pedido de patente: 18110005366.

2. Orlando, R. M.; Rath, S. Dispositivo com uma pluralidade de válvulas e vias para controle do sistema de extração em fase sólida manifold. 2009. MU 8902843-0.

3. Orlando, R. M.; Rath, S. Dispositivo com válvulas e vias para controle do sistema de extração em fase sólida manifold. 2009. MU 8903082-6.

4. Orlando, R. M.; Rath, S. Sistema de extração em fase sólida utilizando potenciais elétricos e seu processo de extração. 2007. PI 0703755-4.

5. Orlando, R. M.; Rath, S. E-SPE. Cartuchos, discos e equipamentos manuais tipo manifold ou robotizados tipo workstations, que aplicam um potencial ou campo elétrico em procedimentos de extração em fase sólida, para uso laboratorial. Pedido de registro de marca: 830400257.

Total de trabalhos publicados em anais de congressos:

3 internacionais e 1 nacional

Participação em congressos:

3 internacionais e 1 nacional

Experiência Didática e Profissional

2011 – 1º semestre: Participação no Programa de Estágio Docente (PED), Grupo B, na disciplina de Química Analítica Instrumental II (QA682) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas – SP, Brasil.

2008 – 1º semestre: Participação no Programa de Estágio Docente (PED), Grupo A, na disciplina de Química Inorgânica Experimental II (QI542) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas – SP, Brasil.

2006 novembro – 2008 - fevereiro: Especialista de laboratório no Laboratório de Desenvolvimento de Ingredientes da Corn Products Brasil. Jundiaí – SP, Brasil.

2004 – 2006: Docente da disciplina de Análises Toxicológicas para o curso de farmácia na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP. Campo Grande – MS, Brasil.

2002 – 1º semestre: Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) na disciplina de Química Analítica Qualitativa II do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP-RP. Ribeirão Preto – SP, Brasil.

RESUMO

APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O preparo de amostra representa uma etapa determinante e crítica no processo de análise e a extração em fase sólida (SPE) é uma técnica amplamente empregada no preparo de matrizes complexas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de dispositivos e procedimentos que permitem aplicar campos elétricos em SPE empregando cartuchos (E-SPE[®]), visando adicionar os mecanismos da eletroforese ao processo cromatográfico. Para tanto, foram desenvolvidos eletrodos e cartuchos que possibilitam a aplicação de campos elétricos, além de um sistema para monitorar e controlar parâmetros eletrocromatográficos tais como: vazão, corrente elétrica, potencial elétrico e temperatura. Com esses dispositivos foram realizadas extrações com aplicação de campo elétrico empregando compostos modelo aniônicos, catiônicos e anfotéricos. Para permitir uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos foram avaliados diversos parâmetros de extração, entre esses: concentração de íons em solução, pH, modificador orgânico, volume de solução de lavagem e tipo de sorvente. O sistema foi avaliado também na determinação de antimicrobianos em leite. Dependendo da polaridade empregada sobre os eletrodos, a aplicação do campo elétrico foi capaz de modular (acelerar ou retardar) a saída dos compostos modelo do cartucho. Os resultados de extração obtidos demonstraram a eficácia dos dispositivos desenvolvidos, além da grande potencialidade do uso de campos elétricos em SPE para obter maiores recuperações dos analitos de interesse e/ou remoção de interferentes.

Palavras chaves: extração em fase sólida – aplicação de campos elétricos, eletro-extração em fase sólida, preparo de amostras - química, eletrocromatografia.

ABSTRACT

APPLICATION OF ELECTRIC FIELDS IN SOLID PHASE EXTRACTION PROCEDURES

Sample preparation is a crucial and determinant step for the analysis process and solid phase extraction (SPE) is a widely used technique in the preparation of complex matrices. The aim of this work was the development of devices and procedures for applying electric fields to SPE cartridges (SPE-E[®]), in order to add the mechanisms of electrophoresis to the chromatographic process. For this purpose, electrodes and cartridges that allow the application of electric fields were developed, besides a system to monitor and control electrochromatographic parameters such as: flow, electric current, electric potential and temperature. By means of these devices, extractions with application of electric fields were performed using anionic, cationic and amphoteric model compounds. In order to allow a better understanding of the phenomena involved several extraction parameters were evaluated, among these: the concentration of ions in solution, pH, organic modifier, volume of washing solution and type of sorbent. The system was also evaluated for the determination of antibiotics in milk. Depending on the polarity of the electrodes used, the application of an electric field was able to modulate (accelerate or retard) the output of the model compounds from the cartridge. The extraction results obtained showed the effectiveness of the devices developed, and the immense potential of the use of electric fields in SPE to obtain better recoveries of the analytes and/or for removing interferences.

Keywords: solid phase extraction-application of electric fields, electro-solid phase extraction, sample preparation (chemistry), electrochromatography.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxix
APRESENTAÇÃO	xxxiii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1 Técnicas de preparo de amostras	3
1.1.1 <i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	6
CAPÍTULO II - OBJETIVOS	17
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO, CARTUCHOS E ELETRODOS PARA E-SPE®	21
3.1 Considerações gerais	23
3.2 Parte experimental	26
3.2.1 <i>Reagentes e solventes</i>	26
3.2.2 <i>Material</i>	26
3.2.3 <i>Equipamentos</i>	27
3.2.4 <i>Procedimentos</i>	28
A) <i>Desenvolvimento de um sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos</i>	28
B) <i>Desenvolvimento e avaliação dos cartuchos e eletrodos</i>	29
C) <i>Avaliação da repetibilidade da montagem dos cartuchos e eletrodos</i>	35
D) <i>Avaliação do comportamento do pH do eluente frente à aplicação do campo elétrico com e sem o uso do sistema de fluxo bidirecional</i>	36
E) <i>Avaliação da mudança da temperatura no interior do cartucho</i>	39

<i>durante a aplicação do campo elétrico</i>	
<i>F) Desenvolvimento do dispositivo de E-SPE[®] tipo "manifold" para múltiplas extrações</i>	43
3.3 Resultados e discussão	44
<i>3.3.1 Desenvolvimento de um sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos</i>	44
<i>3.3.2 Desenvolvimento e avaliação dos cartuchos e eletrodos</i>	47
<i>3.3.3 Avaliação da repetibilidade da montagem dos cartuchos e eletrodos</i>	55
<i>3.3.4 Avaliação do comportamento do pH do eluente frente à aplicação do campo elétrico com e sem o uso do sistema de fluxo bidirecional</i>	57
<i>3.3.5 Avaliação da mudança da temperatura no interior do cartucho durante a aplicação do campo elétrico</i>	60
<i>3.3.6 Desenvolvimento do dispositivo de E-SPE[®] tipo "manifold" para múltiplas extrações</i>	66
3.4 Conclusão	69
CAPÍTULO IV – APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM EXTRAÇÕES EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS MODELO ANIÔNICOS E CATIÔNICO	71
4.1 Considerações gerais	73
4.2 Parte experimental	79
<i>4.2.1 Reagentes e solventes</i>	79
<i>4.2.2 Material</i>	79
<i>4.2.3 Equipamentos</i>	80
<i>4.2.4 Procedimentos</i>	81
<i>A) Modelos aniônicos: ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas</i>	81
<i>B) Modelos aniônicos: condições gerais empregadas na avaliação dos</i>	82

<i>parâmetros de extração</i>	
<i>C) Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de modificador orgânico empregado na solução de lavagem</i>	84
<i>D) Modelos aniônicos: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem</i>	85
<i>E) Modelos aniônicos: avaliação do pH do tampão empregado na solução de lavagem</i>	85
<i>E.1) Tampão sem ajuste da condutividade</i>	86
<i>E.2) Tampão com ajuste da condutividade</i>	85
<i>F) Modelos aniônicos: avaliação da corrente elétrica aplicada na etapa de lavagem</i>	87
<i>G) Modelos aniônicos: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem</i>	88
<i>H) Modelos aniônicos: avaliação da vazão empregada na etapa de lavagem</i>	88
<i>I) Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de sorvente empregada no preparo do cartucho</i>	89
<i>J) Modelos aniônicos: avaliação do material sorvente empregado no preparo do cartucho</i>	89
<i>K) Modelo catiônico: ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas</i>	90
<i>L) Modelo catiônico: condições gerais empregadas na avaliação dos parâmetros de extração</i>	91
<i>M) Modelo catiônico: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem</i>	92
<i>N) Modelo catiônico: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem</i>	93
4.3 Resultados e discussão	94
4.3.1 <i>Modelos aniônicos: condições cromatográficas e construção das</i>	95

<i>curvas analíticas</i>	
4.3.2 Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de modificador orgânico empregado na solução de lavagem	98
4.3.3 Modelos aniônicos: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem	102
4.3.4 Modelos aniônicos: avaliação do pH do tampão empregado na solução de lavagem	105
A) Tampão sem ajuste da condutividade	106
B) Tampão com ajuste da condutividade	108
4.3.5 Modelos aniônicos: avaliação da corrente elétrica aplicada na etapa de lavagem	111
4.3.6 Modelos aniônicos: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem	114
4.3.7 Modelos aniônicos: avaliação da vazão empregada na etapa de lavagem	117
4.3.8 Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de sorvente empregada no preparo dos cartuchos	119
4.3.9 Modelos aniônicos: avaliação do material sorvente empregado no preparo do cartucho	122
4.3.10 Modelos catiônicos: ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas	124
4.3.11 Modelo catiônico: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem	127
4.3.12 Modelo catiônico: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem	129
4.4 Conclusão	131
CAPÍTULO V – APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM EXTRAÇÕES EM FASE SÓLIDA DE ANTIMICROBIANOS SULFONAMÍDICOS EM	133

LEITE	
5.1 Considerações gerais	135
5.2 Parte experimental	138
5.2.1 <i>Reagentes e solventes</i>	138
5.2.2 <i>Material</i>	138
5.2.3 <i>Equipamentos</i>	139
5.2.4 <i>Procedimentos</i>	140
A) <i>Ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas</i>	140
B) <i>Extração das sulfonamidas em leite</i>	141
5.3 Resultados e discussão	144
5.3.1 <i>Ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas</i>	144
5.3.2 <i>Extração de amostras branco de leite com e sem aplicação de campos elétricos</i>	146
5.3.3 <i>Extração de sulfaquinoxalina em amostras de leite com e sem aplicação de campos elétricos</i>	152
5.4 Conclusão	154
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	155
CAPÍTULO VII – PERSPECTIVAS FUTURAS	159
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
ANEXOS	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para os corantes aniônicos nas condições otimizadas.	97
Tabela 4.2. Parâmetros das curvas analíticas para os corantes aniônicos.	97
Tabela 4.3. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para o pico majoritário da SAF nas condições otimizadas.	126
Tabela 4.4. Parâmetro da curva analítica para a SAF.	126
Tabela 5.1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para os antimicrobianos sulfonamídicos nas condições otimizadas.	144
Tabela 5.2. Parâmetros das curvas analíticas para os antimicrobianos sulfonamídicos.	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Imagem de um cartucho de SPE comercial.	9
Figura 1.2. Representação das etapas frequentemente empregadas em SPE utilizando cartuchos.	10
Figura 3.1. Representação do sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos.	29
Figura 3.2. Diferentes configurações empregadas para montagem dos cartuchos e eletrodos de E-SPE [®] .	30
Figura 3.3. Suporte para o cartucho tipo 3 construído em uma base de PTFE.	31
Figura 3.4. Tipos de eletrodos metálicos inferiores (i) e superiores (s).	32
Figura 3.5. Representação dos locais onde os diferentes cartuchos e eletrodos foram conectados à bomba peristáltica e à fonte de eletroforese.	34
Figura 3.6. Configurações dos cartuchos com o conceito do fluxo bidirecional utilizados no estudo do comportamento do pH do eluente frente à aplicação do campo elétrico.	37
Figura 3.7. Termistor e circuito eletrônico utilizados para a medição de temperatura no interior do cartucho.	40
Figura 3.8. Imagem do cartucho de E-SPE [®] com o termistor.	41
Figura 3.9. Sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos desenvolvido para os estudos de E-SPE [®] .	44
Figura 3.10. Janela gráfica do programa de registro e armazenamento de dados.	45
Figura 3.11. Gráficos dos valores da corrente elétrica e potencial elétrico monitorados durante a aplicação do campo elétrico empregando os eletrodos inferiores i6, i9, i10 e i11 em cartuchos tipo 1.	47

Figura 3.12. Gráficos dos valores da corrente elétrica e potencial elétrico monitorados durante a aplicação do campo elétrico empregando os eletrodos inferiores i6, i9, i10 e i11 em cartuchos tipo 4.	48
Figura 3.13. Gráfico dos valores de corrente elétrica, normalizados empregando os eletrodos inferiores i6 e i9 em cartuchos tipo 1 e 4.	49
Figura 3.14. Gráficos dos valores da corrente elétrica e potencial elétrico monitorados durante a aplicação do campo elétrico empregando os eletrodos inferiores i3, i6 e i7 em cartuchos tipo 1, 2 e 3.	50
Figura 3.15. Imagens dos eletrodos superiores s3 e s9 durante a aplicação do campo elétrico.	51
Figura 3.16. Gráficos dos valores da corrente elétrica e potencial elétrico monitorados durante a avaliação da repetibilidade da montagem de 5 diferentes cartuchos de E-SPE [®] .	56
Figura 3.17. Valores de pH do eluente e da corrente elétrica (mA) aplicada em diferentes soluções de lavagem empregando o fluxo convencional e o fluxo bidirecional.	57
Figura 3.18. Comparação entre o cartucho com o sistema de fluxo convencional e o cartucho com o sistema de fluxo bidirecional.	59
Figura 3.19. Valores da temperatura no interior do cartucho e potenciais elétricos medidos em função da corrente elétrica empregada para três diferentes concentrações de tampão ACF.	61
Figura 3.20. Valores da temperatura no interior do cartucho e potências elétricas em função da corrente elétrica empregada para três diferentes vazões.	62
Figura 3.21. Comparação das potências elétricas medidas e esperadas durante aplicação de campos elétricos para a fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante e potencial elétrico constante.	63

Figura 3.22. Imagens de dois protótipos do sistema tipo “manifold” para múltiplas extrações com aplicação de campo elétrico.	68
Figura 4.1. Exemplos dos efeitos esperados de alguns dos possíveis modos de utilização da E-SPE [®] .	74
Figura 4.2. Esquema representando os fenômenos de transporte de massa envolvidos nos procedimentos de E-SPE [®] .	75
Figura 4.3. Esquema representando o efeito da polarização de concentração induzida por campo elétrico.	76
Figura 4.4. Estrutura química dos corantes aniônicos empregados nos estudos de extração e suas respectivas massas molares.	77
Figura 4.5. Estrutura química do corante catiônico safranina empregado nos estudos de extração e sua respectiva massa molar.	78
Figura 4.6. Separação cromatográfica dos corantes aniônicos por HPLC-DAD.	96
Figura 4.7. Efeito da porcentagem de metanol da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	99
Figura 4.8. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito da porcentagem de metanol sobre a recuperação dos corantes aniônicos.	102
Figura 4.9. Efeito da concentração da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	104
Figura 4.10. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito da concentração das soluções de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos.	105
Figura 4.11. Efeito do pH da solução (sem ajuste da condutividade) empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em	107

procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	
Figura 4.12. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito do pH do tampão de lavagem (sem ajuste da condutividade) sobre a recuperação dos corantes aniônicos.	108
Figura 4.13. Efeito do pH da solução (com ajuste da condutividade) empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	109
Figura 4.14. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito do pH do tampão de lavagem (com ajuste da condutividade) sobre a recuperação dos corantes aniônicos.	111
Figura 4.15. Efeito da corrente elétrica empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	113
Figura 4.16. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito da corrente elétrica sobre a recuperação dos corantes aniônicos.	114
Figura 4.17. Efeito do volume da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	115
Figura 4.18. Efeito da vazão empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	118
Figura 4.19. Efeito da quantidade de sorvente empregado no preparo do cartucho sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-SPE [®] e SPE.	120
Figura 4.20. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito da quantidade de sorvente empregada no preparo dos cartuchos sobre a recuperação dos corantes aniônicos.	122
Figura 4.21. Efeito do tipo de material sorvente empregado no preparo do cartucho sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de E-	123

SPE[®] e SPE.

Figura 4.22. Cromatograma típico da análise do corante catiônico SAF. 125

Figura 4.23. Efeito da concentração da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF em procedimentos de E-SPE[®] e SPE. 127

Figura 4.24. Potenciais e correntes elétricas típicos, monitorados durante o estudo do efeito da concentração das soluções de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF. 129

Figura 4.25. Efeito do volume de solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF em procedimentos de E-SPE[®] e SPE. 130

Figura 5.1. Estrutura química dos antimicrobianos sulfonamídicos empregados nos estudos de extração e suas respectivas massas molares. 135

Figura 5.2. Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas com sua configuração catiônica, neutra e aniônica. 136

Figura 5.3. Etapas e condições do método empregado para extração de sulfonamidas em leite. 143

Figura 5.4. Separação cromatográfica das sulfonamidas por HPLC-DAD. 145

Figura 5.5. Cromatogramas das análises em duplicata de amostras branco de leite extraídas empregando procedimentos de SPE e E-SPE[®]. 148

Figura 5.6. Perfil das correntes e dos potenciais elétricos monitorados durante a extração por E-SPE[®] de amostras branco de leite. 149

Figura 5.7. Comparação de três cromatogramas das análises de amostras branco de leite empregando procedimentos de SPE e E-SPE[®]. 150

Figura 5.8. Sobreposição dos sinais analíticos provenientes da injeção direta no cromatógrafo de solução das sulfonamidas SDA, SMX e SQX, com outros obtidos pela extração de amostra branco de leite empregando o procedimento de SPE e procedimentos de E-SPE[®]. 151

Figura 5.9. Recuperações médias da sulfonamida SQX extraída em amostra de leite empregando procedimentos de SPE e E-SPE®.

152

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF:	Tampão composto pela mistura de solução de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico em diferentes concentrações e pH
ATCA:	Ácido tricloroacético
BP:	Bomba peristáltica
C18:	Sorvente a base de sílica modificada com grupos octadecil
C8:	Sorvente a base de sílica modificada com grupos octil
CE:	Eletroforese capilar (“Capillary electrophoresis”)
CEC:	Eletrocromatografia capilar (“Capillary electrochromatography”)
CE-MS:	Eletroforese capilar acoplada a um espectrômetro de massas (“Capillary electrophoresis mass spectrometry”)
CP:	Polarização de concentração induzida por campo elétrico (“Electrical field-induced concentration polarization”)
DAD:	Detector por arranjo de diodos (“Diode array detector”)
E 102:	Corante tartrazina
E 110:	Corante amarelo crepúsculo
E 123:	Corante amaranto
E 127:	Corante eritrosina
E 129:	Corante vermelho 40
E 143:	Corante verde rápido
EC:	Eletrocromatografia em coluna (“Column electrochromatography”)
EOF:	Fluxo eletrosmótico (“Electroosmotic flow”)
ESI:	Ionização por nebulização (“Electrospray ionization”)

ESI-MS:	Ionização por nebulização em espectrômetro de massas (“Electrospray ionization-mass spectrometry”)
E-SPE [®] :	Extração em fase sólida com aplicação, ou assistida, por campos elétricos
E-SPE [®] _(+/-) :	Extração em fase sólida com aplicação, ou assistida, por campos elétricos com o eletrodo superior atuando como ânodo e o eletrodo inferior atuando como cátodo
E-SPE [®] _(-/+) :	Extração em fase sólida com aplicação, ou assistida, por campos elétricos com o eletrodo superior atuando como cátodo e o eletrodo inferior atuando como ânodo
FE:	Fonte de eletroforese
GCxGC:	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (“Comprehensive two-dimensional gas chromatography”)
HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência (“High performance liquid chromatography”)
HPLC-DAD:	Cromatografo à líquido de alta eficiência acoplado a detector por arranjo de diodos
HTLC:	Cromatografia líquida de alta temperatura (“High temperature liquid chromatography”)
ICP-MS:	Plasma acoplado indutivamente a um espectrômetro de massas (“Inductively coupled plasma-mass spectrometer”)
LLE:	Extração líquido-líquido (“Liquid-liquid extraction”)
MIP:	Polímeros de impressão molecular (“Molecularly imprinted polymers”)
MS:	Espectrômetro de massas (“Mass spectrometer”)
PTFE:	Politetrafluoretileno
PVDF:	Polivinilideno

RAM:	Materiais de acesso restrito (“Restricted access materials”)
SAF:	Safranina
SDA:	Sulfadiazina
SMX:	Sulfametoxazol
SPE:	Extração em fase sólida (“Solid phase extraction”)
SQX:	Sulfaquinoxalina
UHPLC:	Cromatografia Líquida de ultra eficiência (“Ultra high performance liquid chromatography”)
UHT:	Ultra alta temperatura (“Ultra high temperature”)
UV-Vis:	Região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético

APRESENTAÇÃO

Este trabalho descreve, pela primeira vez, o uso de campos elétricos em procedimentos de extração em fase sólida empregando cartuchos. A extração em fase sólida convencional (SPE), governada pelos princípios da cromatografia, nesta tese, passa a ser também influenciada pelos fenômenos eletroforéticos. A esta nova modalidade de SPE assistida por campos elétricos deu-se o nome de eletro-extração em fase sólida (E-SPE[®]).

A inspiração para elaboração da hipótese de que campos elétricos seriam capazes de promover a eliminação de interferentes carregados, como proteínas, e, ao mesmo tempo, poderiam elevar a recuperação de analitos de interesse em procedimentos de SPE veio da alta eficiência de separação obtida na eletrocromatografia capilar e de alguns trabalhos bem sucedidos de eletrocromatografia em coluna.

A princípio, a aplicação de campos elétricos em SPE não seria tão limitada quanto ao seu uso em sistemas cromatográficos de alta eficiência utilizando colunas, pois os cartuchos e discos de SPE são dispositivos abertos que permitem a dissipação dos gases formados durante o processo. Também, de forma mais apropriada que as colunas metálicas cromatográficas, os cartuchos plásticos oferecem menor risco ao operador durante à aplicação de campos elétricos. Outra característica importante é que a vazão, relativamente mais alta na SPE, permitiria a dissipação mais eficiente do calor gerado durante a aplicação do campo elétrico e, finalmente, o comprimento do leito do recheio extrator, consideravelmente mais curto do que nas colunas analíticas, permitiria a obtenção de campos elétricos mais fortes com aplicação de diferenças de potenciais elétricos menores.

A apresentação deste trabalho foi dividida em oito capítulos abrangendo os seguintes conteúdos e resultados:

Capítulo I – Introdução. Neste capítulo, uma abordagem geral das técnicas de preparo de amostras é apresentada com destaque para a extração em fase sólida e suas principais características, tema deste trabalho. Devido à inexistência de artigos empregando campos elétricos em cartuchos SPE, somente alguns trabalhos correlatos de eletrocromatografia em coluna e preparo de amostras são mencionados.

Capítulo II – Apresentação dos objetivos do trabalho.

Capítulo III - Desenvolvimento do sistema de extração, cartuchos e eletrodos para E-SPE[®]. Neste capítulo são descritos os dispositivos que precisaram ser desenvolvidos e avaliados, uma vez que não é do nosso conhecimento a existência de cartuchos, eletrodos ou sistemas de E-SPE[®] comerciais ou mesmo dispositivos similares descritos na literatura.

Capítulo IV – Aplicação de campos elétricos em extrações em fase sólida de compostos modelo aniônicos e catiônico. Este capítulo apresenta os resultados de extração, com e sem aplicação de campo elétrico, para seis compostos aniônicos e um catiônico variando-se diversos parâmetros de extração.

Capítulo V – O último capítulo experimental descreve um exemplo de aplicação de campos elétricos na extração em fase sólida de antimicrobianos sulfonamídicos, em amostras de leite.

Os capítulos finais VI, VII e VIII tratam da conclusão, perspectivas futuras e referências bibliográficas, respectivamente

Os capítulos III, IV, V, que tratam da parte experimental, são sempre iniciados com o tópico “Considerações gerais” que é uma breve contextualização do respectivo tema de estudo.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 Técnicas de preparo de amostras

Nas duas últimas décadas a química desfrutou de um desenvolvimento intenso das técnicas analíticas com especial destaque para as técnicas de separação cromatográficas e eletroforéticas. Todo esse desenvolvimento foi acompanhado e impulsionado pelo avanço da informática e da eletrônica, além do conhecimento mais aprofundado, adquirido nos últimos anos, dos princípios que governam essas técnicas. Esses fatores reunidos levaram ao surgimento das mais modernas abordagens para as técnicas de separação como a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLCⁱ), a cromatografia líquida de alta temperatura (HTLCⁱⁱ) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGCⁱⁱⁱ), além do surgimento de novos materiais para fases estacionárias de eficiência e/ou seletividade superiores como os materiais monolíticos, partículas com diâmetros reduzidos, (< 2,0 µm), partículas superficialmente porosas (*core shell*), entre outros.

Um dos grandes passos na evolução das técnicas de separação modernas foi o desenvolvimento da eletrocromatografia capilar (CEC^{iv}), que consagrou o encontro da eficiência das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC^v) e da eletroforese capilar (CE^{vi}), reunindo os princípios de separação das suas técnicas originais como a retenção pela fase estacionária e a migração eletroforética diferencial [1]. Aliado ao desenvolvimento das técnicas de separação houve também um grande aperfeiçoamento dos sistemas de detecção, principalmente para os espectrômetros de massas que ganharam maior poder de resolução, velocidade de aquisição de dados, robustez e preços mais acessíveis.

O acoplamento das mais modernas técnicas de separação aos avançados espectrômetros de massas atuais permite a quantificação e identificação de novas substâncias em uma escala jamais vista, com tempos de análise algumas vezes de alguns poucos minutos e separação de dezenas de compostos [2].

ⁱUHPLC, do inglês *ultra high performance liquid chromatography*; ⁱⁱHTLC, do inglês *high temperature liquid chromatography*; ⁱⁱⁱGCxGC, do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography*; ^{iv}CEC, do inglês *capillary electrochromatography*; ^vHPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*; ^{vi}CE, do inglês *capillary electrophoresis*

Juntamente com o desenvolvimento das técnicas analíticas, houve também a necessidade de adaptar e aperfeiçoar os métodos de preparo de amostras. Mesmo as mais modernas técnicas de separação necessitam que as amostras a serem analisadas, principalmente as mais complexas como as de alimentos e de origem biológica, recebam o tratamento adequado antes da análise [3-6]. Essa realidade é válida mesmo quando espectrômetros com alto poder de resolução de massas são empregados como detectores, uma vez que muitas substâncias presentes nas matrizes podem entupir ou sujar o sistema de nebulização, reduzir ou aumentar a eficiência de ionização das moléculas alvo ou mesmo interferir com o processo de secagem e explosão coulômbica das gotículas nebulizadas [7].

Apesar de todos os avanços tecnológicos obtidos nos últimos cinquenta anos, ainda são pouco frequentes as situações onde uma matriz pode ser analisada diretamente em um instrumento analítico sem nenhuma etapa de preparação prévia [8].

Uma matriz representa o local onde se encontra o analito e é uma porção de matéria que pode estar repleta de compostos indesejáveis que interferem na separação e/ou detecção. A matriz também pode diluir os analitos presentes e estar em um estado físico incompatível com a técnica instrumental que será empregada, impossibilitando a adequada identificação e quantificação.

Sendo assim, um dos desafios predominantes durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica é a escolha e o emprego de uma técnica de preparo de amostra adequada [9].

As diversas técnicas de extração têm como finalidades básicas: recuperar e concentrar o analito, eliminar os compostos que interferem na análise (limpeza ou “*clean-up*”) e tornar o meio onde se encontra o analito (solvente) compatível com o sistema analítico. Em alguns casos, esta etapa serve também para modificar quimicamente o analito por meio de reações de derivatização [8].

Como o preparo de amostra empregado em matrizes biológicas é frequentemente uma etapa complexa, ela se torna, na maioria dos casos, o ponto crítico da análise, fazendo com que a precisão e a exatidão do método fiquem estritamente dependentes dos procedimentos adotados. Por esses mesmos motivos, essa é uma

das etapas que geralmente requer um maior tempo e esforço por parte do operador [10]. Esse fato é ainda mais crítico quando o preparo de amostras é realizado manualmente, o que representa a maior parcela dos métodos descritos na literatura. A sua automação reduz bastante os problemas citados, porém traz a necessidade da aquisição e manutenção periódica dos equipamentos, assim como a reposição dos materiais de consumo e treinamento especializado para permitir sua correta operação.

Alguns analitos, em certos tipos de amostras, como, por exemplo, fármacos em medicamentos podem não requerer nenhum tipo de tratamento prévio anterior a determinação dos analitos por HPLC, UHPLC, CE ou CEC. Após a solubilização dos fármacos em soluções adequadas, eles são analisados diretamente no equipamento analítico. Por outro lado, a determinação de resíduos de fármacos, agrotóxicos e outros contaminantes presentes em amostras biológicas como sangue, urina, plasma, soro e também de alimentos, vão requerer, via de regra, um preparo de amostra laborioso [11].

A escolha do tipo de preparo de amostra empregado é feita em função das características físico-químicas da matriz e do analito, da disponibilidade dos recursos presentes no laboratório, da precisão e exatidão exigidos para aquela determinada análise, do número de amostras e do tempo disponível para processá-las e, bem como, das condições de análise que incluem, principalmente, o tipo de técnica e de instrumentação empregados [12-14].

De modo geral, o preparo de amostra deve ser um procedimento rápido, de baixo custo, que tenha poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito e, de preferência, que apresente a possibilidade de automação. Outro aspecto importante que deve-se levar em consideração na escolha do tipo de preparo de amostra é a redução do emprego de solventes orgânicos durante o processo a fim de reduzir, tanto o impacto ambiental, como o tempo e dinheiro gasto com os procedimentos de descarte [15]. Atualmente, existem diversas técnicas de preparo de amostras capazes de recuperar analitos dos mais variados tipos de matrizes, cada qual com suas vantagens e limitações, que são empregadas conforme sua eficácia e compatibilidade para o respectivo caso [5].

Apesar de não configurarem entre as técnicas mais recentes, atualmente disponíveis, a extração líquido-líquido (LLEⁱ) e a extração em fase sólida (SPEⁱⁱ) aparecem, seguramente, na ampla maioria dos procedimentos de rotina de preparo de amostras biológicas e de alimentos [14].

Ambas baseiam-se na distribuição dos analitos e interferentes entre duas fases distintas. Contudo, a LLE apresenta uma série de inconvenientes e limitações que restringem sua eficiência, capacidade de automação e também a tornam pouco amigável em termos ambientais [11, 14].

A SPE, por sua vez, é uma técnica de preparo de amostras bastante eficiente para purificação e concentração de analitos em matrizes complexas e com uma série de características que a torna, em muitas ocasiões, mais atrativa que a LLE para este fim. Essa técnica, que é tema dessa tese, vem recebendo diversas modificações e melhorias desde sua criação e, por esses motivos, será discutida com maiores detalhes a seguir.

1.1.1 Extração em fase sólida (SPE)

A SPE é uma técnica de preparo de amostras amplamente empregada em matrizes complexas e que compartilha, com a cromatografia líquida em coluna, uma série de semelhanças operacionais e conceituais [3, 5, 6].

A sorção ou retenção dos compostos em SPE ocorre pela transferência dos analitos ou, alternativamente, dos interferentes da solução para a superfície de um suporte sólido [3, 16].

As interações responsáveis pela sorção dos compostos no sorvente, em SPE, são idênticas àsquelas envolvidas na cromatografia líquida em coluna [6].

Em sorventes empregados no modo reverso como C18, C8 e fenil, a retenção do analito é devida primeiramente às interações de van der Waals entre grupos não polares, ou por meio de elétrons π de anéis aromáticos do analito com os grupos funcionais fenil quimicamente ligado à superfície do sorvente. Com esse tipo de sorvente há também a contribuição de interações hidrofóbicas [3, 16, 17].

6 ⁱLLE, do inglês *liquid-liquid extraction*; ⁱⁱSPE, do inglês *solid phase extraction*

No modo normal (sílica gel), as principais interações são entre os grupos polares do analito e da fase extratora por meio de ligações de hidrogênio, interações π - π e dipolo-dipolo.

Já no modo de troca iônica, interações eletrostáticas são as grandes responsáveis pela extração seletiva dos analitos [17].

As interações descritas ocorrem para todos os tipos de materiais sorvente existentes (sílica, sílica modificada, polimérico, etc) e, dependendo dos grupos funcionais presentes no sorvente e nos analitos, dois ou mais tipos de interações podem ocorrer simultaneamente.

Apesar de ser um processo menos comum em SPE, a retenção através de processos de exclusão por tamanho molecular também é um dos mecanismos de extração de analitos de alta massa molar em sorventes a base de géis de dextrana, agarose, poliacrilamida, entre outros. Neste tipo de purificação os compostos, teoricamente, não são retidos sobre a superfície do sorvente, mas sim, distribuídos seletivamente no interior dos poros do material em função do tamanho molecular que apresentam [6, 16].

Em sorventes contendo grupos funcionais com propriedades de reconhecimento molecular como os baseados em proteínas, anticorpos, aptâmeros, ciclodextrinas, polímeros de impressão molecular (MIPⁱ), entre outros, os processos de sorção também ocorrem pelos mecanismos descritos, além de fatores estéricos de acoplamento. O mesmo é válido ainda para os sorventes com propriedades de exclusão física e/ou química como os materiais de acesso restrito (RAMⁱⁱ) [3, 16, 18].

A retenção dos compostos no sorvente ocorre em função das interações apresentadas anteriormente, mas a distribuição dos compostos da solução para o sorvente e vice-versa acontece pelos processos de transferência de massa convectivo e difusional [19]. A força imposta pelo vácuo, gravidade ou bomba peristáltica promove o movimento inter-partícula da solução até a camada limite de Prandtl próxima a superfície do sorvente. A partir desse limite, assim como no interior dos poros do sorvente, o principal processo de transferência de massa dos analitos ocorre pela difusão em decorrência dos gradientes de concentração existentes nas diferentes porções do cartucho [19].

ⁱMIP, do inglês *molecularly imprinted polymers*; ⁱⁱRAM, do inglês *restricted access materials*

Diferentemente de outras técnicas de preparo de amostras, nas quais a extração está baseada no equilíbrio, a SPE é um processo exaustivo onde, normalmente, recupera-se quase todo o analito da matriz em uma única extração, não permitindo análises em replicatas de uma mesma amostra.

Existem diferentes formatos para a SPE e, dentre esses, os mais utilizados são os cartuchos e os discos de extração que foram justamente os dois primeiros descritos na literatura e disponibilizados comercialmente [3, 6, 16].

Tanto no formato de cartucho ou disco, a amostra é forçada a passar pelo material extrator pela aplicação de pressão ou vácuo em uma de suas extremidades. Para realizar a extração manual de várias amostras simultaneamente de forma mais rápida, geralmente são utilizados sistemas extratores que empregam vácuo também chamados de “manifold”.

Cartuchos são os dispositivos mais empregados para a SPE devido a sua facilidade de manuseio, disponibilidade comercial e menor custo. Os cartuchos assemelham-se a seringas hospitalares sem o êmbolo, dentro das quais encontra-se o material extrator acondicionado entre dois filtros compostos frequentemente de material poroso sinterizado (vidro, plástico ou metal) chamado de frit (Figura 1.1).

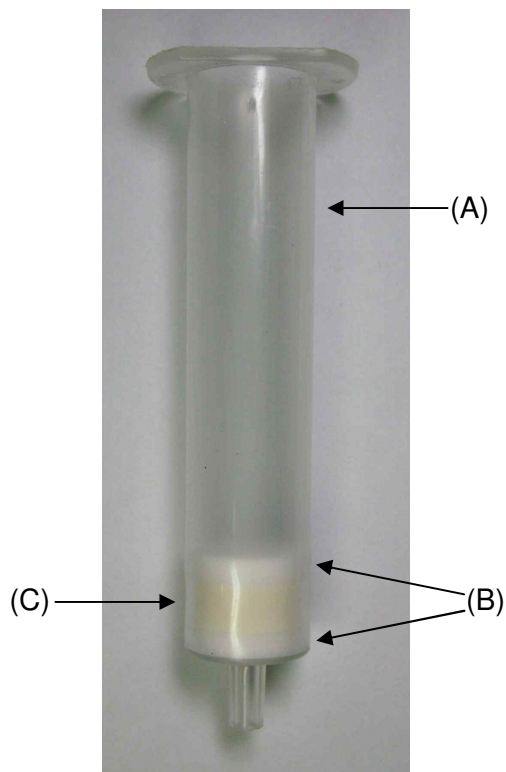


Figura 1.1. Imagem de um cartucho de SPE comercial com o reservatório (A), os filtros de PTFE sinterizado (B) e o sorvente (C).

A porção do cartucho acima do material extrator é chamada de reservatório e serve para acomodar a amostra e os eluentes. Os cartuchos disponíveis comercialmente, em geral, possuem reservatórios com capacidade entre 0,5 e 150 mL e recheios que variam de 0,010 g a 70 g [16, 17].

A SPE empregando cartuchos é um procedimento realizado normalmente em cinco etapas como descrito na Figura 1.2.

A primeira etapa da extração, chamada de condicionamento, consiste no preparo do material sorvente do cartucho. Como a maioria dos materiais sorventes não se encontra em uma condição inicial apropriada para receber a amostra e promover a sorção adequada dos compostos de interesse, é fundamental a eluição prévia de um ou mais solventes. Posteriormente ao condicionamento, a amostra é aplicada ao cartucho para que os analitos ou interferentes sejam retidos no sorvente. Muitas vezes, a amostra precisa ser diluída e ter o pH e/ou a força iônica ajustados previamente, para que os analitos apresentem uma melhor interação com o sorvente.

Após a aplicação da amostra é comum e aconselhável promover a percolação de certos volumes de uma solução que tenha a capacidade de remover seletivamente os interferentes retidos no cartucho e esta é a chamada etapa de lavagem. Após a lavagem, caso seja necessário remover o líquido residual presente no cartucho, pode ser realizada uma etapa de secagem através da passagem de ar ou outro gás, pelo leito do cartucho. Finalmente, o analito purificado é removido e recolhido em um recipiente adequado pela percolação do menor volume possível de solvente capaz de eluí-lo completamente e seletivamente do cartucho [5, 6, 17].

(1) Condicionamento

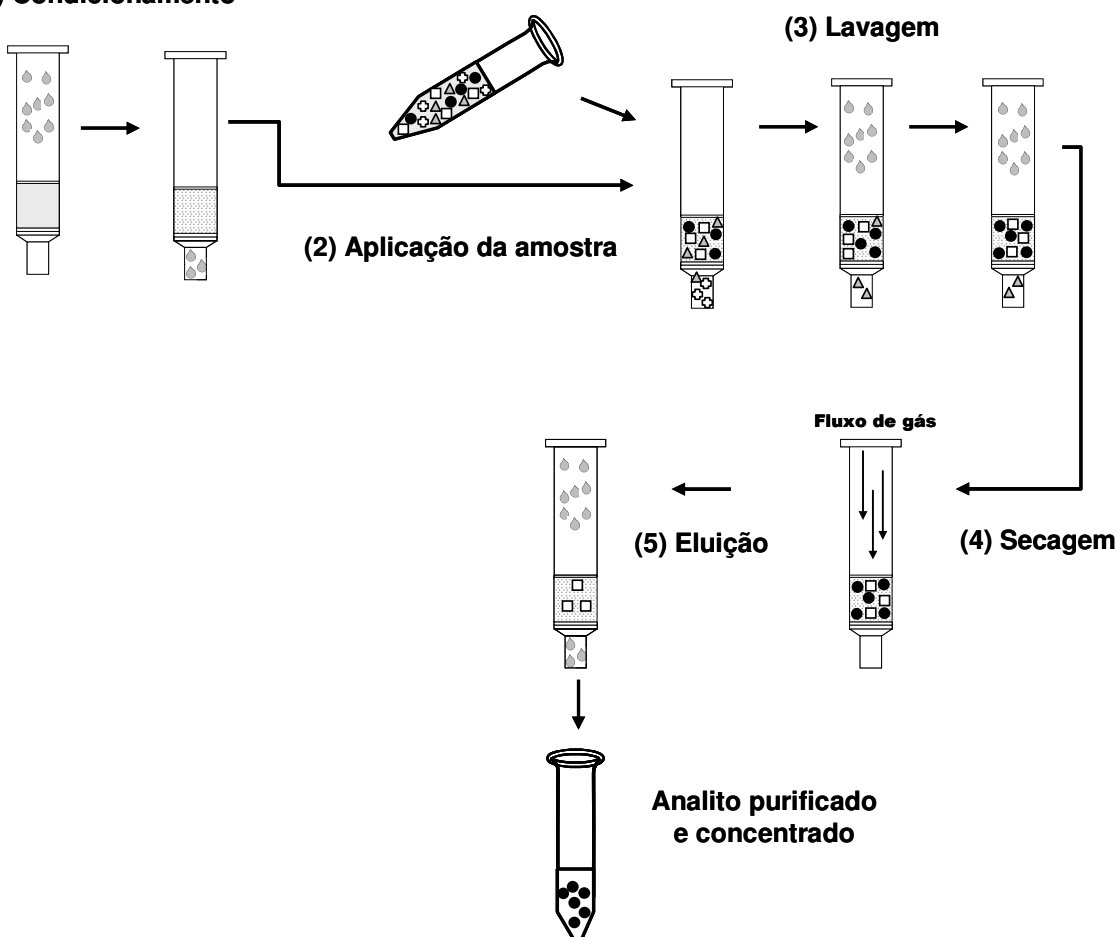


Figura 1.2. Representação das etapas frequentemente empregadas em SPE utilizando cartuchos.

Em SPE, depois de iniciado a etapa de condicionamento até o término da etapa de lavagem, é importante que o leito do cartucho não seque. Esse cuidado é

fundamental para que não sejam criados caminhos preferenciais no sorvente o que acarreta na perda de repetibilidade e eficiência, principalmente em cartuchos a base de sílica reversa. Existem, contudo, materiais sorventes poliméricos que são menos susceptíveis a esse tipo de problema [6, 14, 20].

A SPE conta com uma grande variedade de sorventes disponíveis comercialmente, que podem ser empregados com os mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos [3, 5, 20]. Os mais amplamente utilizados ainda são aqueles a base de sílica e sílica quimicamente modificada com diversos grupos ancorados em sua superfície: C18, C8, ciano, fenil, aminopropil, diol, carboxílico, sulfônico, amínicos, entre outros.

Os sorventes a base de sílica são de menor custo que os materiais poliméricos, porém, eles apresentam restrições ou limitações quanto a faixa de pH de trabalho, retenção excessiva de bases fracas, além de pouca seletividade e, conseqüentemente, limpeza insuficiente [14].

Sorventes poliméricos, por sua vez, apresentam maior estabilidade em pH extremos, maior seletividade e melhor molhabilidade, contudo são de custo mais elevado que os materiais a base de sílica [3]. Os materiais poliméricos mais comumente utilizados em SPE são aqueles a base de poliestireno, entrecruzado com divinilbenzeno [20].

Atualmente, a SPE conta ainda com materiais sorventes avançados de elevada seletividade e eficiência que têm sido empregados e que vêm demonstrando resultados bem superiores aos sorventes convencionais, como os materiais de acesso restrito (RAM) e os polímeros de impressão molecular (MIP) [3, 21].

RAM são materiais que possuem grupamentos ancorados a partículas de sorção de tal maneira que a mesma apresente em sua superfície dois tipos de caráter de interação: um sortivo e outro repulsivo ou exclusivo. Isto é obtido, mais comumente, pela modificação da superfície de partículas de sílica, empregando grupos polares em sua superfície externa e apolares na camada subsequente mais próxima da superfície da partícula [18]. Dependendo do tipo e da maneira que esses grupos são ligados às partículas, os RAM podem combinar mecanismos físicos ou químicos de exclusão [18]. Com esse tipo de material, as proteínas de uma amostra

sofrem um processo de exclusão química ou física e são eliminadas. Os analitos, por sua vez, não passam por esse processo de exclusão e conseguem alcançar a porção mais próxima da superfície do material sorvente onde, nesta região, são retidos pelos mesmos mecanismos já descritos [16]. Apesar da sua grande eficiência em eliminar proteínas, os RAM são comumente empregados em colunas para sistemas de extração “on-line” automatizados e seu emprego em cartucho raramente é encontrado [14, 22].

Os MIP, por sua vez, são materiais que apresentam a chamada “capacidade de reconhecimento molecular”. O reconhecimento molecular é um fenômeno bastante comum e antigo e acontece na natureza em diversas situações como nas ligações antígeno-anticorpo, enzima-substrato e hormônios-receptores celulares [23]. A extração em fase sólida por imunoafinidade pode, até certo ponto, ser considerada como um mecanismo de impressão molecular. Entretanto, antígenos e proteínas utilizadas em extração em fase sólida possuem sérias limitações de uso, como baixa estabilidade química e térmica, além de serem de elevado custo. Outra importante característica dos MIP é a sua maior rigidez molecular em virtude das ligações cruzadas do polímero. Anticorpos e enzimas, por sua vez, possuem uma maior capacidade de flexibilizar-se e ajustar-se à molécula molde. Na última década os MIP passaram a ser muito mais empregados em SPE, pois esses materiais possuem afinidade seletiva pela molécula, ou moléculas, molde e, dessa forma, o eluato final é muito mais livre de interferentes [14]. Os MIP, assim como os RAM, também possuem a vantagem de serem utilizados várias vezes antes de serem descartados [14]. Apesar das vantagens comprovadas na utilização de MIP em SPE, a existência de poucos materiais disponíveis comercialmente e a necessidade de utilizar um MIP diferente para cada composto ou classe de composto que se queira analisar faz com que o seu uso fique restrito somente a algumas aplicações específicas [14].

A SPE executada de forma manual, normalmente, é um procedimento relativamente demorado e operacionalmente complexo onde é possível realizar apenas algumas poucas dezenas de extrações por dia [3]. Entretanto, a SPE apresenta uma grande capacidade de automação e ampla disponibilidade comercial de sistemas automatizados. Diversos trabalhos têm sido publicados nas duas últimas

décadas descrevendo métodos que empregam a SPE automatizada [3, 14, 24, 25]. Os sistemas de SPE automatizados são utilizados acoplados ou não às técnicas analíticas cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas diversas [4]. A SPE automatizada confere maior capacidade e velocidade de análise, reduz o consumo de solventes, aumenta a precisão do método, torna a técnica mais segura e menos tediosa ao operador e, de forma geral, reduz o custo geral por análise. A grande demanda no número de análises em laboratórios de rotina, a necessidade de obter-se resultados rápidos, a capacidade de automação e a existência de sistemas automatizados comerciais impulsionaram a ampla difusão da SPE [14].

O emprego de matérias sorventes mais baratos, como os baseados em sílica modificada, nem sempre são capazes de promover a concentração dos analitos em quantidade de traços e/ou a eliminação eficiente de interferentes de matrizes complexas. A utilização de materiais sorventes avançados, com capacidade de reconhecimento molecular, apesar de solucionar esse problema restringe a abrangência da extração para somente um grupo de compostos ou até mesmo um único analito.

O uso de sistemas automatizados é uma opção para reduzir os custos e o consumo de solvente por análise, mas o investimento inicial, a manutenção e a capacitação de um operador especializado precisam ser levados em consideração. Esses sistemas também podem apresentar incompatibilidades com analitos ou amostras instáveis, apresentar problemas com sobrecarga de amostras ou efeito memória dos analitos no sistema [25].

Todos esses obstáculos fazem com que, continuamente, empresas e grupos de pesquisa desenvolvam novas soluções para as limitações da SPE e novos artigos e patentes sejam publicados e depositados a cada ano.

Os grandes campos de desenvolvimento na área de SPE concentram-se, principalmente, em novos materiais sorventes com eficiência de extração e seletividade diferenciadas, novos formatos que permitam reduzir o número de etapas e reduzam o tempo de extração e, também, sistemas automatizados com maior capacidade e velocidade de processamento [20, 14].

Apesar de todo o desenvolvimento realizado nas duas últimas décadas, o

princípio da SPE nos dispositivos comerciais atuais continua sendo a retenção diferencial dos constituintes das amostras como ocorre na cromatografia convencional.

Morales-Cid *et al.* (2010), em um trabalho recente afirmam que o uso combinado dos mecanismos de diferentes técnicas de preparo de amostras é uma tendência no futuro próximo [26].

Desta maneira, poderíamos prever, para os próximos anos, que novas técnicas de preparo de amostras serão desenvolvidas através da união dos diferentes princípios apresentados por elas.

O uso de campos elétricos em técnicas de preparo de amostras é uma abordagem mais recente e que ainda não teve toda sua capacidade explorada ou mesmo descrita na literatura [26].

Campos elétricos, em alguns casos são capazes de conferir tanto seletividade quando maiores taxas de transferências de massa do que os processos baseados somente em convecção e ou difusão [26].

Morales-Cid *et al.* (2010) propuseram o uso do termo “assistido por campo elétrico” para as técnicas de preparo de amostras que têm seus desempenhos melhorados pela aplicação de campos elétricos, mas que são predominantemente governadas por outros efeitos [26].

Entre as técnicas de preparo de amostras assistidas por campos elétricos e descritas na literatura destacam-se as técnicas de filtração (convencional, micro, ultra e nano), diálise, osmose, LLE e SPE [26].

Recentemente, alguns autores têm explorado o uso de potenciais elétricos para promover a sorção e a dessorção de compostos iônicos em superfícies sorventes condutoras [27, 28, 29-31]. Empregando essa abordagem foi possível obter fatores de concentração altos em tempos de extração relativamente curtos [30].

Liljegren *et al.* (2005) descreveram o uso de um dispositivo com um polímero condutor a base de polipirrol como material sorvente [31]. Neste trabalho o processo de transferência dos analitos da solução para o material sorvente foi acelerado por um processo de atração eletrostática quando aplicado potencial elétrico sobre o polímero condutor. Os mecanismos de sorção e dessorção foram controlados por

reações de oxidação e redução promovidas pelo potencial elétrico aplicado. O dispositivo contendo o polímero extrator foi avaliado tanto pelo acoplamento com um nebulizador (“electrospray”) de um espectrômetro de massas (ESI-MSⁱ), como pela conexão a um sistema de plasma acoplado indutivamente a um espectrômetro de massas (ICP-MSⁱⁱ). Com o dispositivo acoplado ao ESI-MS os autores descreveram a extração de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ em amostras de água, contudo, problemas com supressão iônica e descontinuidade do fluxo do nebulizador limitaram os estudos desenvolvidos. Já o acoplamento do dispositivo ao ICP-MS demonstrou ser muito mais simples e foi capaz de detectar concentrações de brometo de até 3 mmol L^{-1} em amostras de água de torneira com fatores de concentração de até 66 vezes. O polímero extrator apresentou limitações em relação a seletividade, com a recuperação dos íons brometo sendo fortemente reduzida pela presença dos ânions sulfato e fluoreto em solução. Apesar de alguns bons resultados obtidos e de utilizar potenciais elétricos inferiores a 1,5 volt durante o processo de extração, os dispositivos demonstraram ser bastante complexos. Soma-se a isso o fato de o polímero extrator sofrer redução e oxidação durante o processo, o que poderia levar a formação de produtos de degradação não desejáveis com os diversos componentes orgânicos presentes em matrizes complexas.

No melhor do nosso conhecimento, o único trabalho descrito nas principais bases de dados (Science direct, Web of Science, Science Finder e Space net) e que utiliza o conceito da E-SPE[®] foi apresentado por Morales-Cid *et al.*, em 2008 [32]. Neste trabalho foi construído um sistema de extração em fluxo empregando uma minicoluna de extração contendo 14 mg de sorvente a base de sílica-C18 e 3 mm de diâmetro interno que foi acoplada a um equipamento de CE-MSⁱⁱⁱ. Esse sistema foi avaliado na determinação de antimicrobianos (tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina), além de quatro aminas (propilamina, 3-metil-1-butanamina, 1-metilbutilamina e heptilamina), como compostos modelo. Para promover o campo elétrico, o dispositivo empregou o mesmo módulo de corrente de alta voltagem do equipamento de CE e, dessa forma, foi preciso desenvolver um sistema resistor químico para modular a corrente elétrica gerada. Esse sistema resistor químico

ⁱESI-MS, do inglês *electrospray ionization-mass spectrometry*; ⁱⁱICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma-mass spectroscopy*; ⁱⁱⁱCE-MS, do inglês *capillary electrophoresis-mass spectrometry*

precisou ser repostado periodicamente para que a corrente elétrica fosse estável. O sistema também apresentou limitações em relação ao potencial elétrico aplicado (<15 kV) para que não ocorressem descargas elétricas nas partes metálicas da bomba peristáltica. Usando voltagens de -10 kV o campo elétrico foi capaz de aumentar o sinal da tetraciclina em até 7,5 vezes o que foi atribuído tanto ao efeito de empilhamento das moléculas em um menor volume de solvente de eluição como ao formato do pico com uma banda mais estreita e com melhor simetria. Resultados semelhantes também foram obtidos com os demais analitos. Apesar de utilizarem os mecanismos eletrocromatográficos no processo de extração, os autores, neste trabalho, empregaram um dispositivo que configura uma coluna de SPE e não um cartucho convencional. Neste formato também foi preciso utilizar potenciais elétricos elevados para obter o resultado desejado, além de usar um sistema em fluxo com válvulas bastante complexo.

As recentes aplicações de campos elétricos para melhorar o desempenho das técnicas de preparo de amostras, assim como a quase inexistência de trabalhos e patentes relacionadas ao uso desta abordagem em SPE foram os principais fatores que estimularam a realização deste trabalho.

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho compreendeu em aplicar campos elétricos em procedimentos de preparação de amostras baseados na extração em fase sólida.

Os objetivos específicos foram:

- Desenvolver e avaliar eletrodos e cartuchos para serem utilizados em procedimentos de extração em fase sólida com aplicação de campo elétrico.
- Desenvolver e avaliar um sistema para extração em fase sólida com aplicação de campos elétricos, capaz de controlar e/ou monitorar parâmetros eletrocromatográficos como vazão, potencial elétrico, corrente elétrica e temperatura.
- Empregar a extração em fase sólida com aplicação de campos elétricos a grupos de compostos modelo aniônicos e catiônicos.
- Avaliar a influência de parâmetros de extração como pH, concentração iônica da solução de lavagem, quantidade de modificador orgânico, entre outros, sobre a eficiência de extração dos compostos modelo e comparar os resultados obtidos pela técnica de extração em fase sólida convencional com aqueles provenientes da aplicação do campo elétrico.
- Empregar a extração em fase sólida com aplicação de campos elétricos para a extração de antimicrobianos sulfonamídicos adicionados na matriz leite.

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO, CARTUCHOS E ELETRODOS PARA E-SPE®

3.1 Considerações gerais

Antes de iniciar os estudos de E-SPE[®] foi preciso desenvolver os cartuchos e eletrodos para aplicação de potenciais elétricos, uma vez que, como mencionado, não há dispositivos comerciais ou trabalhos na literatura descrevendo esses dispositivos.

O trabalho que mais se aproxima da proposta aqui apresentada empregou uma minicoluna “home-made” de SPE e foi publicado somente três anos após o início dos trabalhos desta tese [32]. Além disso, naquele trabalho, o autor usou os eletrodos do próprio equipamento de CE e, dessa forma, não precisou desenvolver dispositivos adicionais.

Desta maneira, a confecção e adaptação dos cartuchos e eletrodos foram baseadas exclusivamente nos trabalhos de eletrocromatografia em coluna (ECⁱ) que apresentaram resultados relacionados a esse tipo de desenvolvimento [33].

Uma das grandes limitações dos sistemas de EC está relacionada ao sistema de eletrodos e seu isolamento ou não do leito cromatográfico [33].

Para separar e isolar os eletrodos, alguns trabalhos reportam o uso de membranas que dividem as colunas em dois ou mais compartimentos [33, 34, 35, 36, 37]. As membranas são utilizadas para isolar os gases provenientes da eletrólise e outros produtos de degradação do leito da coluna e, também, para prevenir a sorção de macromoléculas sobre os eletrodos. Em EC essas membranas podem ser géis incorporados ou não sobre materiais porosos, membranas de diálise, de ultrafiltração ou de troca iônica [33, 34].

No trabalho desenvolvido por Cole e Cabezas (1997) os autores descrevem o preparo de uma coluna de EC de 30 cm x 1,5 cm recheada com um polímero de exclusão molecular a base de dextrana onde foram empregados eletrodos de platina no formato helicoidal [34]. Os eletrodos foram acondicionados em compartimentos separados do leito da coluna por membranas de ultrafiltração.

Nesta coluna, o tampão empregado no compartimento das membranas era constantemente recirculado por uma bomba peristáltica para promover sua renovação, além da retirada dos gases e dos produtos da eletrólise. Esse sistema foi

ⁱEC, do inglês *electrochromatography*

avaliado na separação de uma mistura das proteínas β -lactoglobulina bovina e mioglobina isolada de coração de cavalos e a detecção realizada por absorção na região do ultravioleta (230 e 280 nm). Empregando os dispositivos desenvolvidos, ficou demonstrado que a separação destas duas proteínas só foi possível com o emprego de um campo elétrico de $14,6 \text{ V cm}^{-1}$ com fase móvel composta de tris-hidroxi-aminometano $3,9 \text{ mmol L}^{-1}$, glicina 47 mmol L^{-1} e ácido etilenodiamino tetracético $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH final de 8,2. Neste trabalho não foram relatados problemas associados aos eletrodos utilizados.

Um outro sistema de EC preparativo para separação de proteínas foi desenvolvido e apresentado por Keim e Ladish, em 2000 [33]. Os autores relatam as limitações em empregar sistemas eletrocromatográficos preparativos com diâmetros internos maiores que 2,5 cm devido às dificuldades em remover os gases provenientes da eletrólise, assim como a baixa dissipação de calor do interior da coluna. Empregando eletrodos compostos por telas de platina separados da fase estacionária por membranas de ultrafiltração foi possível aplicar campos elétricos de 10 a 20 V cm^{-1} em uma coluna de $38,1 \text{ cm} \times 3,81 \text{ cm}$ e 400 mL de volume interno. A eficiência do sistema foi avaliada pela separação de 3 mL de uma mistura de mioglobina com proteína soro albumina bovina em uma fase estacionária a base de metacrilato. A fase móvel consistiu de uma mistura de tampão tris-hidroxi-aminometano $3,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e glicina 47 mmol L^{-1} , obtendo uma solução em pH final de 8,2. Nestas condições as frações das duas proteínas apresentaram um incremento dos coeficientes de partição proporcionais ao aumento do campo elétrico aplicado tornando possível a separação empregando campos elétricos em torno de $11,9 \text{ V cm}^{-1}$. Esse sistema empregou injeção radial da amostra na coluna que precisou ficar posicionada na horizontal para permitir a saída dos gases formados nos dois compartimentos dos eletrodos.

Uma abordagem diferente para EC foi proposta por Tan *et al.*, em 2005 [36]. Neste trabalho foi empregado uma coluna com um compartimento de eletrodos posicionado concentricamente ao leito da coluna, mas externamente a ele. Esse compartimento era separado por uma membrana cerâmica preenchida com gel de poli-acrilamida. O eletrólito usado durante a eletroforese era mantido resfriado a $6 \text{ }^\circ\text{C}$

e recirculado constantemente para a remoção dos gases provenientes da eletrólise. O posicionamento dos eletrodos, paralelamente e longitudinalmente ao leito do cartucho, permitiu aplicar campos elétricos perpendiculares ao sorvente. Com essa nova disposição foi possível empregar campos elétricos transversais intensos a potenciais elétricos relativamente baixos. O potencial elétrico aplicado era oscilante e tinha sua polaridade invertida periodicamente. O uso de um campo elétrico transversal oscilante durante a eluição aumentou a capacidade de sorção de albumina bovina sérica na fase estacionária composta do trocador iônico dietilamino etil quimicamente ligado a uma rede molecular de polissacarídeos. Além disso, com uso do campo elétrico foi possível separar duas frações protéicas diferentes (albumina bovina sérica e imunoglobulina G).

Com base nas informações desses trabalhos de EC foram construídos e avaliados os cartuchos e os eletrodos de EC que serão apresentados a seguir.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Reagentes e solventes

- Citrato trissódico (Merck, Brasil), ácido cítrico (Merck, Brasil), cloreto de sódio (Merck, Brasil), fosfato de sódio monobásico (J.T.Baker, EUA), fosfato de sódio dibásico (Merck, Brasil), ácido fórmico (Nuclear, Brasil), ácido acético glacial (Synth, Brasil), azul de bromotimol (Merck, Brasil), todos com grau de pureza analítico ou superior.
- Solvente: metanol (Tedia, Brasil), com grau HPLC de pureza.
- Sorvente de sílica quimicamente ligada com grupos octadecil (sílica-C18) Septra C18-E para SPE da marca Phenomenex (65 Å X 50 µm, 485 m² g⁻¹) (EUA).

3.2.2 Material

- Cartuchos para SPE de polipropileno com capacidade de 6 mL da marca Varian (EUA).
- Filtros de PTFE (politetrafluoretileno) sinterizado (frit) de 20 µm de poro para cartuchos de SPE de 6 mL da marca Varian (EUA).
- Filtros de aço inoxidável sinterizado (frit) de 20 µm de poro para cartuchos de SPE de 6 mL da marca Supelco (EUA).
- Telas de aço inoxidável de 120 mesh (diâmetro do fio de 0,080 mm e abertura da malha de 0,131 mm) e 80 mesh (diâmetro do fio de 0,12 mm e abertura da malha de 0,192 mm) (Steelmesh, Brasil).
- Agulha hospitalar de aço inoxidável de 1,6 x 40 mm e 1,2 mm de diâmetro interno (BD PrecisionGlide, Brasil).
- Agulha veterinária de aço inoxidável de 2,0 x 100 mm e 1,6 mm de diâmetro interno (Höppner, Brasil).
- Fios de aço inoxidável de 0,07; 0,2; 0,35 e 0,4 mm de diâmetro.
- Termistor com resistência ôhmica de 10 kΩ a 25 °C, coeficiente de

temperatura negativo, 20% de tolerância de variação da resistência, constante termal de 5 segundos, tempo de resposta de 0,9 segundos e faixa de operação de 0 – 100 °C da marca RoHs (Grã Bretanha).

- Tubulações para bomba peristáltica de 2 e 3 mm de diâmetro interno (Gilson, França).
- Placas de acrílico e PTFE, tarugos de PTFE, tubos e tarugos de aço inoxidável e alumínio.

3.2.3 Equipamentos

- Bomba peristáltica da marca Gilson, modelo Minipuls Evolution (França).
- Fonte estabilizada de alta tensão para eletroforese, Fisher-Scientific, modelo FISH-FB3000Q (Malásia).
- Balança analítica Precisa, modelo XT 220A (Suíça).
- Purificador de água Millipore, modelo Milli-Q Academic (EUA).
- pH-metro Digimed, modelo DM-22 empregando um eletrodo de vidro combinado (Brasil).
- Condutivímetro Digimed, modelo DM-32 (Brasil).
- Multímetros da marca Protek, modelo 506 com saída RS-232 (Coréia do Sul).
- Microcomputador Pentium (Intel, EUA) contendo: sistema operacional Microsoft Windows 95 (EUA), programa de aquisição de dados escrito em Visual Basic 3.0 da Microsoft (EUA), duas entradas RS-232 e uma interface de comunicação paralela.
- Interface de comunicação paralela Advantec, modelo 711-S (EUA) contendo um conversor analógico digital de 12 bits, 16 entradas e 16 saídas TTL (transistor-transistor-logic).
- Microcomputador Pentium 4 (Intel, EUA) contendo: sistema operacional Microsoft Windows XP (EUA), programas de processamento de dados Origin versão 6.1 (EUA) e Microsoft Excel 2003 (EUA).

3.2.4 Procedimentos

A) *Desenvolvimento de um sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos*

Os estudos de extração com e sem aplicação do campo elétrico foram realizados empregando um sistema descrito na Figura 3.1. Esse sistema foi empregado para o monitoramento e controle do potencial elétrico aplicado, da corrente elétrica resultante, da vazão e da temperatura no interior do cartucho e era composto de:

- cartuchos de extração em fase sólida (1A) adaptados com eletrodos (1B e 1C), conectados à fonte de alta tensão para eletroforese (4) por conexões elétricas e acoplado a um dispositivo tipo “manifold” de extração em fase sólida (2);

- dispositivo de E-SPE[®] tipo “manifold” para múltiplas extrações em fase sólida (2) conectado aos cartuchos (1A) e à bomba peristáltica (3);

- multímetros (5A e 5B) para leitura da corrente e potencial elétrico conectados à fonte de eletroforese (4) por conexões elétricas e a um microcomputador (8) por portas seriais RS-232;

- termistor (6) encaixado a um único cartucho de extração e conectado a um circuito eletrônico para condicionamento do sinal analógico (7);

- circuito eletrônico para condicionamento do sinal analógico (7) baseado em um amplificador operacional 741 CN;

- microcomputador (8) com duas portas seriais RS-232 (8A e 8B) para transferência dos dados provenientes dos multímetros (5A e 5B), além de uma interface paralela com conversor analógico digital (8C) para leitura do sinal proveniente do termistor;

- programa de comunicação escrito em linguagem Visual Basic 3.0 e instalado no microcomputador para registro e armazenamento dos dados de potencial elétrico, corrente elétrica e temperatura.

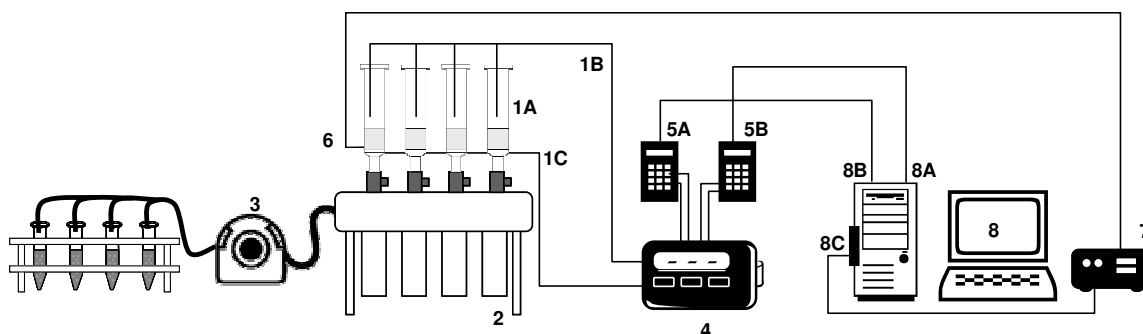


Figura 3.1. Representação do sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos (vazão, potencial elétrico, corrente elétrica e temperatura) empregado durante os procedimentos de SPE com e sem aplicação do campo elétrico. 1A = cartucho de extração adaptado com eletrodo superior 1B e inferior 1C; 2 = dispositivo tipo “manifold” para múltiplas extrações; 3 = bomba peristáltica; 4 = fonte de alta tensão para eletroforese; 5A e 5B = multímetros; 6 = termistor; 7 = circuito eletrônico amplificador; 8 = microcomputador contendo duas portas seriais RS-232 (8A e 8B) e uma interface de comunicação paralela (8C).

B) Desenvolvimento e avaliação dos cartuchos e eletrodos

Todos os cartuchos utilizados nos estudos de SPE e E-SPE[®] eram de polipropileno, com capacidade para 6 mL e da marca Varian.

Foram avaliadas quatro configurações diferentes de montagem dos cartuchos (Figura 3.2):

- Cartucho tipo 1, montado através das seguintes etapas: 1.1) introdução de um frit de PTFE para compor o fundo do cartucho (frit inferior); 1.2) inserção de uma conexão elétrica (fio metálico) com contatos elétricos através de um orifício confeccionado na parede do cartucho e, posteriormente, selado com cola de silicone; 1.3) introdução do eletrodo inferior; 1.4) introdução de um segundo frit de PTFE; 1.5) adição do sorvente; 1.6) introdução de um terceiro frit de PTFE para compor o topo do cartucho (frit superior); 1.7) introdução do eletrodo superior;

- Cartucho tipo 2, montado através das seguintes etapas: 2.1) introdução do eletrodo inferior para compor fundo do cartucho; 2.2) introdução de um frit de PTFE (frit inferior); 2.3) adição do sorvente; 2.4) introdução de um segundo frit de PTFE

para compor o topo do cartucho (frit superior);

- Cartucho tipo 3, montado através das seguintes etapas: 3.1) remoção (corte) do fundo do cartucho convencional; 3.2) introdução de um frit de PTFE para compor o fundo do cartucho (frit inferior); 3.3) adição do sorvente; 3.4) introdução de um frit de PTFE para compor o topo do cartucho (frit superior); 3.5) introdução do eletrodo superior;

- Cartucho tipo 4, montado através das seguintes etapas: 4.1) introdução de um frit de PTFE para compor o fundo do cartucho (frit inferior); 4.2) adição do sorvente; 4.3) introdução de um frit de PTFE para compor o topo do cartucho (frit superior); 4.4) introdução do eletrodo superior.

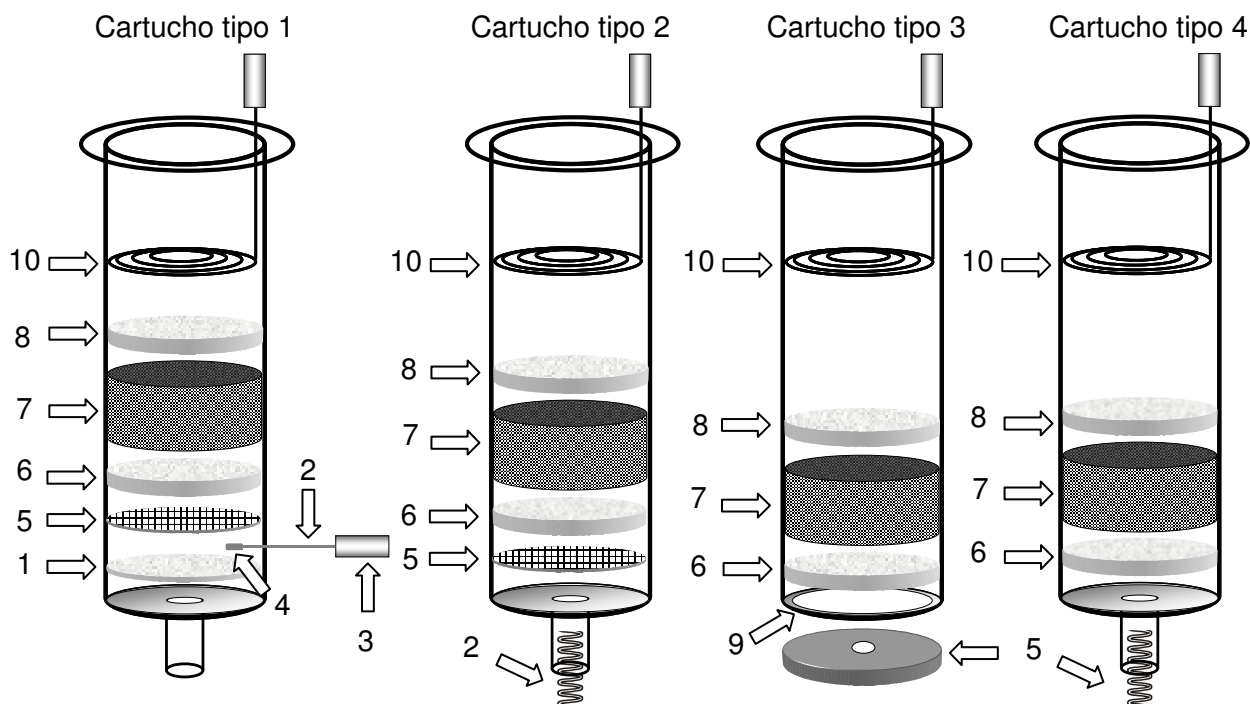


Figura 3.2. Diferentes configurações empregadas para montagem dos cartuchos e eletrodos de E-SPE® avaliados. 1 = frit de PTFE; 2 = conexão elétrica com 3 = contato elétrico externo e 4 = contato elétrico interno; 5 = eletrodos inferiores; 6 = frit de PTFE; 7 = sorvente; 8 = frit de PTFE; 9 = cartucho com o fundo removido (cortado); 10 = eletrodos superiores.

Para avaliar os cartuchos tipo 3 foi construído um suporte em uma base de PTFE (Figura 3.3) com um orifício para encaixe do cartucho (item 1, Figura 3.3). No fundo deste orifício foram acoplados os eletrodos avaliados (item 2, Figura 3.3).

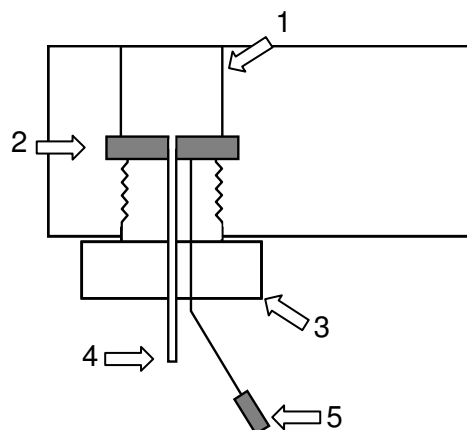


Figura 3.3. Suporte para o cartucho tipo 3 construído em uma base de PTFE. 1 = orifício para encaixe do cartucho; 2 = eletrodo inferior; 3 = base com rosca para posicionamento do eletrodo inferior; 4 = saída de eluente e 5 = conexão elétrica para o eletrodo inferior com contato elétrico para a fonte de eletroforese.

Os diferentes cartuchos foram avaliados com dois tipos de eletrodos: um eletrodo posicionado abaixo do sorvente denominado eletrodo inferior (i) e um segundo eletrodo posicionado acima do sorvente denominado eletrodo superior (s) (Figura 3.4). Todos os eletrodos superiores e inferiores avaliados foram confeccionados em liga de aço inoxidável.

Os discos porosos metálicos avaliados como eletrodos (s1 a s5, i1 e i3) consistiam de filtros de aço inoxidável sinterizados e foram adquiridos da Supelco (EUA), porém as modificações realizadas nestes eletrodos, assim como a confecção dos demais eletrodos foi realizada no setor de mecânica fina do Instituto de Química da Unicamp.

Com os diferentes tipos de cartuchos foram avaliados os seguintes grupos de eletrodos inferiores:

- Cartucho tipo 1: frit metálico (i3), disco sólido perfurado (i4), telas metálicas de 80 e 120 mesh (i5 e i6) e fio confeccionado na forma de espiral (i7). Esses eletrodos foram posicionados no interior do cartucho.

- Cartucho tipo 2: eletrodos compostos de telas metálicas de 80 e 120 mesh (i5 e i6) posicionados no interior do cartucho. Os eletrodos i5 e i6 foram combinados (conectados) ou aos eletrodos helicoidais (i10) ou aos eletrodos tubulares (i11) que foram introduzidos no interior do bico do cartucho. Os eletrodos helicoidais e

tubulares (i10 e i11), por sua vez, foram conectados a uma tubulação metálica (Figura 3.4 A), contendo uma extremidade de borracha (Figura 3.4 B), utilizada para encaixar-se ao bico do cartucho.

- Cartucho tipo 3: frits metálicos perfurados (i1) e disco sólido perfurado (i2). Esses eletrodos foram encaixados no fundo do suporte de PTFE descrito na Figura 3.3.

- Cartucho tipo 4: eletrodos compostos de agulhas veterinárias (i8), agulhas hospitalares (i9), eletrodos helicoidais (i10) e tubulares (i11). Os eletrodos (i8) e (i9) foram encaixados diretamente ao bico do cartucho. Já os eletrodos (i10) e (i11), por sua vez, foram conectados a uma tubulação metálica (Figura 3.4 A) contendo uma extremidade de borracha (Figura 3.4 B) que foi utilizada para encaixar-se ao bico do cartucho.

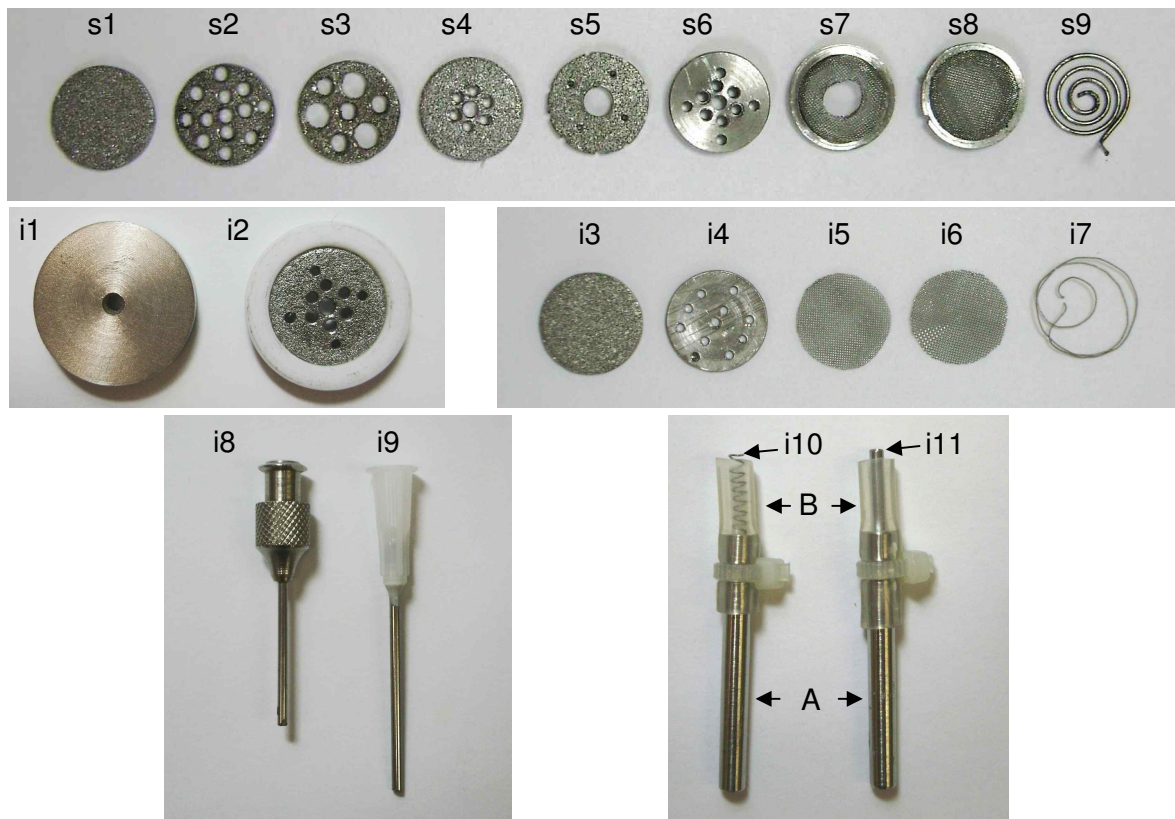


Figura 3.4. Tipos de eletrodos metálicos inferiores (i) e superiores (s) avaliados. A = tubulação metálica e B = borracha para encaixar-se ao bico do cartucho.

Para todos os quatro diferentes tipos de cartuchos, foram avaliados os eletrodos superiores apresentados na Figura 3.4: frit metálico (s1), frits metálicos

perfurados (s2, s3, s4 e s5), disco sólido perfurados (s6), telas inseridas em halos metálicos (s7 e s8) e fio confeccionado na forma de espiral (s9). Os eletrodos superiores avaliados foram unidos a conexão elétrica (fio) de aço inoxidável (Figura 3.5), contendo um contato elétrico em sua extremidade para fazer conexão com a fonte de eletroforese (Figura 3.5). Esses eletrodos foram introduzidos no interior do cartucho através da sua abertura superior.

Os eletrodos inferiores foram conectados a fonte de eletroforese das seguintes maneiras (Figura 3.5):

- Cartucho tipo 1: eletrodo inferior conectado a fonte de eletroforese através de um terminal elétrico preso a uma conexão elétrica (fio) inserida no interior do cartucho através de um orifício na parede lateral do mesmo;
- Cartucho tipo 2: eletrodo inferior conectado a fonte de eletroforese através da tubulação metálica acoplada ao eletrodo tubular ou helicoidal;
- Cartucho tipo 3: eletrodo inferior conectado a fonte de eletroforese através de uma conexão elétrica (fio) inserida no suporte de PTFE com uma terminação elétrica;
- Cartucho tipo 4: eletrodo inferior conectado a fonte de eletroforese ou através 3.1) do corpo metálico da agulha ou 2.2) da tubulação metálica acoplada ao eletrodo tubular ou ao eletrodo helicoidal.

Os eletrodos superiores s1 a s9, assim como os eletrodos inferiores i3 a i7 apresentavam aproximadamente 12 mm de diâmetro. Já os eletrodos i1 e i2 para o cartucho tipo 3 apresentava 20 mm de diâmetro.

Para a avaliação dos diferentes tipos de eletrodos e cartuchos, os mesmos foram conectados a uma bomba peristáltica de três modos diferentes (Figura 3.5):

- Cartucho tipo 1 conectado à tubulação da bomba peristáltica através do bico do cartucho;
- Cartuchos tipo 2 e 4 conectados a tubulação metálica pelo bico do cartucho (*luer*) e esta, por sua vez, conectada à tubulação da bomba peristáltica;
- Cartucho tipo 3 conectado à um suporte de PTFE com uma tubulação para saída de eluente e este, por sua vez, conectado à tubulação da bomba peristáltica;

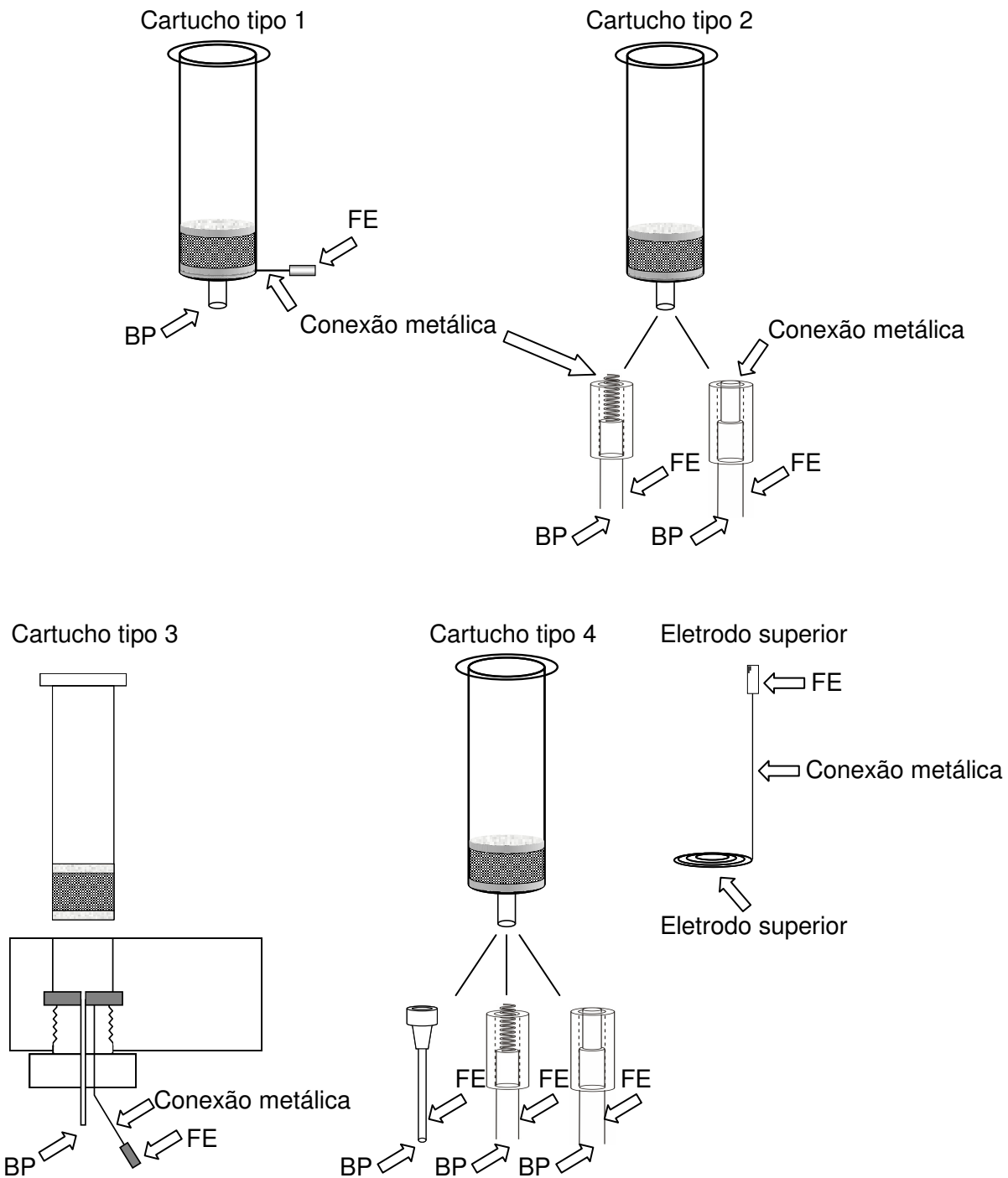


Figura 3.5. Representação dos locais onde os diferentes cartuchos e eletrodos (inferiores e superiores) foram conectados à bomba peristáltica (BP) e à fonte de eletroforese (FE).

A avaliação do desempenho dos diferentes cartuchos e eletrodos foi realizada

empregando 500 mg de sílica-C18, Sepra C18-E da marca Phenomenex como sorvente.

O condicionamento dos cartuchos adaptados com eletrodos foi realizado eluindo 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de água deionizada e finalmente 2 mL de solução tampão. O tampão utilizado foi preparado em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 20 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 40 mmol L⁻¹, denominado solução tampão ACF 20/40. À solução ACF 20/40, pH 4,0, foi adicionado 10% (v/v) de metanol resultando em uma solução com condutividade de 1,69 mS cm⁻¹.

Durante a eluição da solução de ACF 20/40 contendo 10% (v/v) de metanol foram aplicados campos elétricos com a fonte de eletroforese operando no modo potencial elétrico constante de 25, 50 e 75 V. O campo elétrico foi aplicado por 2 minutos para cada potencial avaliado, com polaridade positiva sobre o eletrodo superior e negativa sobre o eletrodo inferior (E-SPE[®]_(+/-)). Antes de cada incremento do valor de potencial elétrico, o cartucho foi novamente condicionado. Neste experimento foram avaliadas as vazões de 1 e 2 mL min⁻¹.

Durante a aplicação do campo elétrico tanto a corrente elétrica quanto o potencial elétrico foram registrados pelo sistema para monitoramento dos parâmetros cromatográficos descrito na secção 3.2.4 A.

A avaliação dos eletrodos foi feita observando o perfil do gráfico das correntes e potenciais elétricos monitorados pelo tempo, assim como pela observação do acúmulo de bolhas no sorvente do cartucho e na superfície dos eletrodos. Cada sistema de eletrodo e cartucho foi avaliado uma única vez (n = 1).

C) Avaliação da repetibilidade da montagem dos cartuchos e eletrodos

A repetibilidade da montagem dos cartuchos de E-SPE[®] foi avaliada através da comparação do perfil das correntes e dos potenciais elétricos medidos durante a aplicação de campo elétrico em 5 cartuchos (n= 5). Foram utilizados cartuchos tipo 1 montados com eletrodo inferior i6 e superior s9 como descrito na Figura 3.2.

Antes da aplicação do campo elétrico os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol seguido de 2 mL de água e 2 mL de solução tampão ACF 20/40, pH 4,0, contendo 10% (v/v) de metanol (condutividade de $1,63 \text{ mS cm}^{-1}$) preparado como descrito na secção 3.2.4 B. O campo elétrico foi aplicado durante a percolação da solução ACF 20/40 empregando a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante de 3, 6, 9 e 20 mA durante 2 minutos para cada valor de corrente elétrica empregada. Antes de cada incremento do valor de corrente elétrica, o cartucho foi novamente condicionado. O campo elétrico foi aplicado com a polaridade do eletrodo superior positiva e do eletrodo inferior negativa (E-SPE[®]_(+/-)). A vazão empregada durante a avaliação foi de 2 mL min^{-1} e os cartuchos foram recheados com 500 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex.

D) Avaliação do comportamento do pH do eluente frente à aplicação do campo elétrico com e sem o uso do sistema de fluxo bidirecional

Para a avaliação da mudança do pH frente à aplicação do campo elétrico foram comparados o fluxo convencional utilizado em SPE e também o princípio denominado neste trabalho de fluxo bidirecional. Para tanto, foram utilizados cartuchos montados como apresentado na Figura 3.6.

Os cartuchos com o conceito do fluxo bidirecional apresentavam três modificações em relação aos cartuchos descrito na secção 3.2.4 B:

- uma tubulação de PTFE de 1,6 mm de diâmetro externo e 0,5 mm de diâmetro interno, inserida no interior do cartucho através de um orifício na sua parede lateral que foi posteriormente selado com cola de silicone (Figura 3.6, item 1). Essa tubulação tinha a função de recolher o excesso de solução de lavagem (dreno) e direcioná-la para um descarte por meio da sua conexão com a bomba peristáltica;
- duas tubulações de PTFE de 1,6 mm de diâmetro externo e 0,5 mm de diâmetro interno, introduzida no interior do cartucho através da abertura superior (Figura 3.6, item 2). Essas tubulações tinham a função de introduzir a solução de

lavagem por meio de suas extremidades que foram posicionadas a frente do eletrodo superior e justapostas ao frit de PTFE superior;

- posicionamento do eletrodo superior de 3 a 5 mm acima do frits de PTFE superior (Figura 3.6, item 4).

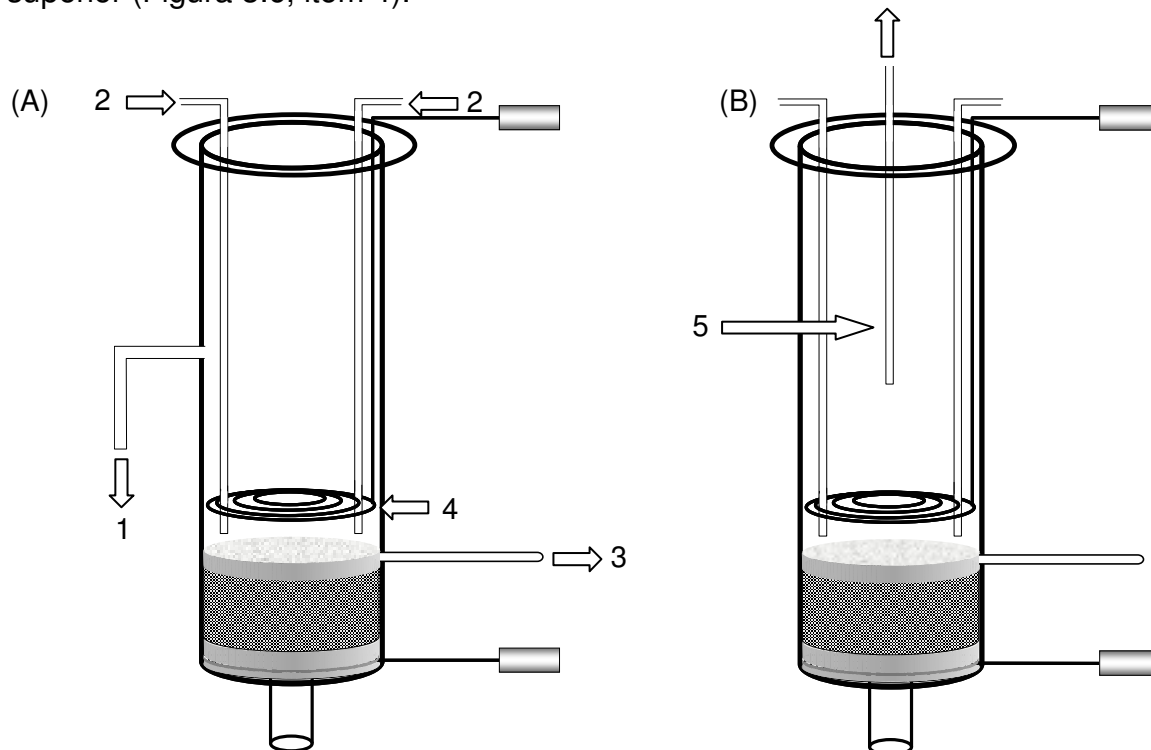


Figura 3.6. (A) Configuração do cartucho com o conceito do fluxo bidirecional utilizado no estudo do comportamento do pH do eluente frente à aplicação do campo elétrico. 1 = tubulação de PTFE com a função de dreno e acoplada a uma linha da bomba peristáltica; 2 = tubulações de PTFE com a função de introduzir a solução de lavagem e 3 = tubulação de PTFE para coleta da fração da solução eluente para medida do pH; 4 = posicionamento do eletrodo superior 3 a 5 mm acima do frit superior. (B) Configuração alternativa do cartucho com o conceito do fluxo bidirecional com a diferença do tipo de dreno (5) utilizado.

Para os estudos de pH do eluente empregando o fluxo bidirecional foi inserido, lateralmente em direção ao centro do cartucho e internamente ao frit de PTFE superior, uma tubulação de PTFE (1,6 mm de diâmetro externo e 0,5 mm de diâmetro interno), que foi acoplada a uma bomba peristáltica (Figura 3.6, item 3). Através dessa tubulação, uma fração da solução que atravessava o eletrodo superior (≈ 3 mL) foi recolhida em um tubo de ensaio para posterior avaliação do pH. Essa

tubulação lateral não fazia parte do sistema de fluxo bidirecional propriamente dito, mas sim constituiu o meio de avaliar sua eficiência e, por esse motivo, ela foi utilizada somente durante esses estudos. A avaliação do pH da fração coletada foi realizada empregando pHmetro com eletrodo de vidro combinado.

Neste estudo os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol, seguidos por 2 mL de água deionizada para, em seguida, ser introduzida a solução de lavagem a ser avaliada.

As soluções de lavagem empregadas neste estudo foram:

- solução tampão ACF 10/20, pH 4,0. Essa solução tampão foi preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 10 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 20 mmol L⁻¹;

- solução tampão ACF, 1/2 pH 4,0. Essa solução tampão foi preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 1 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 2 mmol L⁻¹;

- solução de NaCl 10 mmol L⁻¹.

Na etapa de lavagem a solução na saída inferior do cartucho (bico) era succionada através da bomba peristáltica a uma vazão de 0,9 mL min⁻¹. No momento em que foi empregado o fluxo bidirecional foram utilizadas as tubulações adicionais (Figura 3.6, item 2), com vazão total de entrada de solução no cartucho de 3,6 mL min⁻¹. Simultaneamente, a solução na tubulação lateral (Figura 3.6, item 3), utilizada para coleta do eluente de lavagem, era succionada a uma vazão de 0,9 mL min⁻¹.

Dessa forma, no momento em que o fluxo bidirecional estava acionado, existia uma vazão de entrada de eluente no cartucho duas vezes superior à vazão de saída (Entrada = 3,6 mL min⁻¹ / Saída: bico = 0,9 mL min⁻¹ + tubulação lateral = 0,9 mL min⁻¹).

A coleta das soluções para medição do pH foi realizada durante a etapa de lavagem com e sem a aplicação do campo elétrico, utilizando os fluxos convencional e bidirecional.

Para este estudo o campo elétrico foi aplicado utilizando a fonte de eletroforese no modo corrente constante de 0; 3; 9 e 16 mA, com polaridade negativa sobre o eletrodo superior e positiva sobre o eletrodo inferior (E-SPE[®]_(-/+)). Os

experimentos foram realizados empregando um único cartucho ($n = 1$) tipo 1 descrito na secção 3.2.4 B. Este cartucho utilizou o eletrodo inferior i6 e superior s9.

Nesta avaliação, foi empregado 500 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex, como sorvente.

A eficiência do fluxo bidirecional também foi avaliada utilizando o corante indicador de pH azul de bromotimol.

Para esta avaliação foi utilizado o fluxo bidirecional descrito na Figura 3.6, com a exceção de que não foi utilizada a tubulação lateral para coleta da fração da solução de lavagem. O cartucho utilizado foi o tipo 1 (secção 3.2.4 B), montado com os eletrodos inferior i6 e superior s9 e recheados com 4 frits de PTFE em substituição ao sorvente de sílica-C18.

Após o condicionamento dos cartuchos com 2 mL de metanol e 2 mL de água, foi percolada solução tampão citrato $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 4,5, contendo 2% (v/v) de solução 0,05% (m/v) do indicador azul de bromotimol a uma vazão de 2 mL min^{-1} .

Durante a eluição da solução tampão contendo o indicador de pH, foram utilizadas correntes elétricas de 15 mA com o eletrodo superior catódico.

Neste experimento, o desempenho do sistema com fluxo bidirecional empregando o indicador de pH foi avaliada pela observação da mudança de coloração no interior do cartucho e comparação com o resultado obtido com o fluxo convencional.

E) Avaliação da mudança da temperatura no interior do cartucho durante a aplicação do campo elétrico

Para realizar a medição da temperatura no interior do cartucho foi empregado um termistor com coeficiente de variação negativo e um encapsulamento de resina epóxi de 2,0 mm de diâmetro por 4,0 mm de comprimento, sendo esta a área ativa do termistor (Figura 3.7 A). Um terminal do termistor foi ligado a uma fonte de 5 volts enquanto o outro terminal foi ligado a entrada inversora do 741 como mostra a Figura 3.7 B.

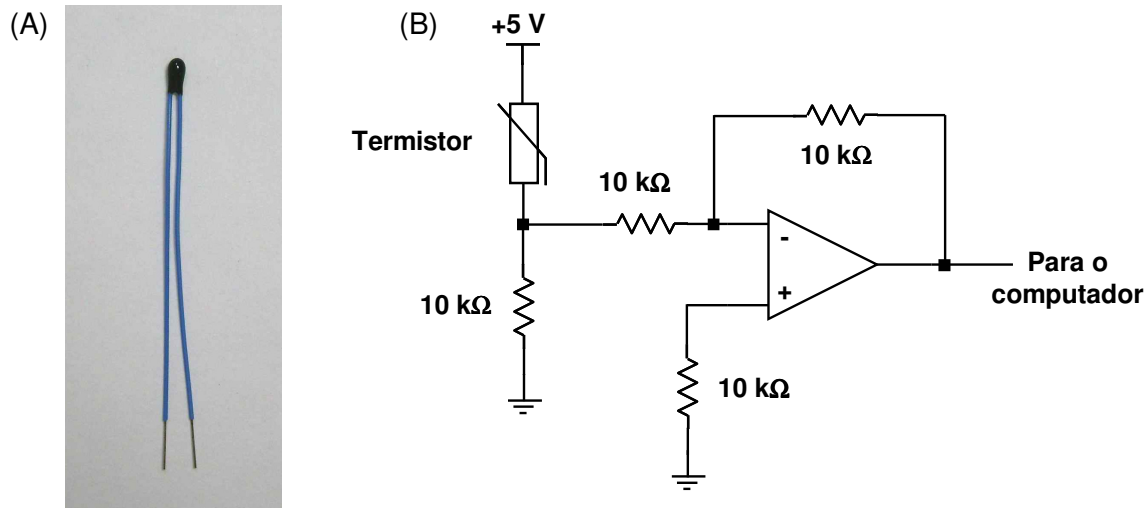


Figura 3.7. (A) Termistor utilizado para a medição da temperatura no interior do cartucho e (B) circuito eletrônico baseado em um amplificador operacional 741 CN contendo o termistor.

Após o condicionamento apropriado do sinal de tensão elétrica do termistor pelo circuito amplificador, este era enviado para um conversor analógico digital da interface paralela 711 acoplada a um microcomputador. Esses dados digitais foram, então, coletados e convertidos em temperatura através de um programa de comunicação escrito em Visual Basic 3.0.

Para que o programa fosse capaz de converter a tensão elétrica em temperatura o termistor foi calibrado com um termômetro convencional e água termostaticada na faixa entre 4 e 60 °C. Empregando o método de mínimos quadrados com o programa Microsoft Excel 2003, foi feita a regressão linear dos dados de temperatura *versus* tensão elétrica obtida, resultando, assim, em uma equação do tipo $y = ax + b$ que foi inserida no programa para conversão dos resultados de tensão elétrica em temperatura (°C).

Para avaliar a mudança de temperatura no interior do cartucho em função do campo elétrico aplicado, o encapsulamento do termistor foi introduzido no interior do cartucho através de um orifício feito em sua parede lateral, na região imediatamente acima do segundo frit de PTFE (Figura 3.8 A e B).

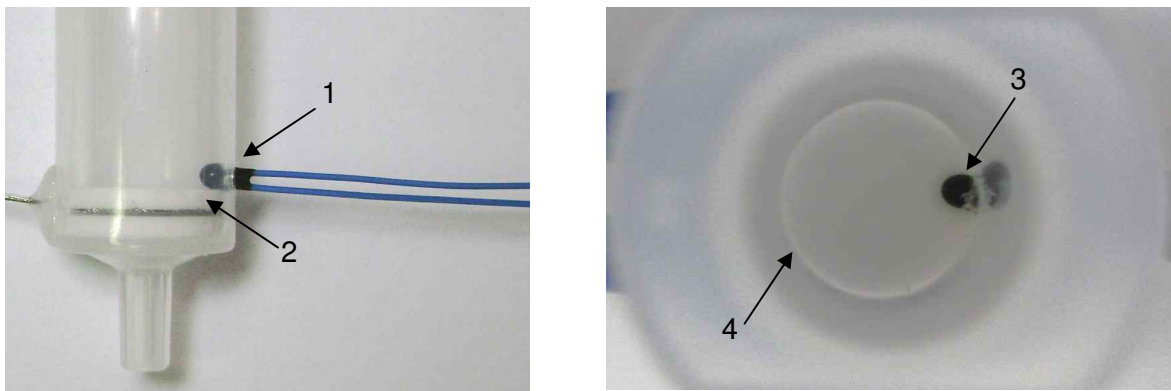


Figura 3.8. (A) Imagem do cartucho de E-SPE® com o termistor (1) introduzido em um orifício feito na sua lateral logo acima do segundo frit de PTFE (2). (B) Imagem do interior do cartucho com a região do encapsulamento do termistor (3) e a parede interna do cartucho (4).

Para unir o conjunto cartucho-termistor e vedar o orifício foi utilizada cola de silicone e, após essa etapa, o cartucho foi recheado com 500 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex.

Neste estudo foram avaliados os valores da temperatura no interior do cartucho em função do campo elétrico aplicado, da concentração da solução tampão e também da vazão empregada durante a etapa de lavagem.

Estes estudos empregaram as seguintes soluções tampão:

- solução tampão ACF 10/20, pH 4,0. Essa solução tampão foi preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 10 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 20 mmol L⁻¹;

- solução tampão ACF, 20/40 pH 4,0. Essa solução tampão foi preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 20 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 40 mmol L⁻¹;

- solução tampão ACF, 100/200 pH 4,0. Essa solução tampão foi preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 200 mmol L⁻¹.

Às soluções ACF 10/20, ACF 20/40 e ACF 100/200 foi adicionado 10% (v/v) de metanol e assim, elas passaram a apresentar condutividades de 0,85, 1,63 e 6,70 mS cm⁻¹, respectivamente.

Na avaliação do efeito do campo elétrico aplicado sobre a temperatura no interior do cartucho, a fonte de eletroforese foi empregada tanto no modo corrente elétrica constante (6, 9, 12, 15, 20, 25, 30 e 35 mA) como no modo potencial elétrico constante (21, 50, 66, 90, 109, 150 e 185 V). Durante a aplicação do campo elétrico foi eluída a solução tampão ACF 10/20, pH 4,0, contendo 10% (v/v) de metanol, empregando vazão de 2 mL min⁻¹.

Para o estudo da concentração do tampão empregado durante a aplicação do campo elétrico foram avaliadas as soluções tampão ACF 10/20, ACF 20/40 e 100/200 todas contendo 10% (v/v) de metanol. Neste estudo a fonte de eletroforese foi empregada no modo corrente elétrica constante de 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30 e 35 mA e a vazão mantida a 2 mL min⁻¹.

O estudo do efeito da vazão utilizada durante a aplicação do campo elétrico sobre a temperatura no interior do cartucho foi realizada empregando a solução tampão ACF 20/40, pH 4,0 contendo 10% (v/v) de metanol. Para este estudo foram avaliadas as vazões de 1, 2 e 3 mL min⁻¹ com a fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30 e 35 mA.

Anterior à aplicação do campo elétrico, os cartuchos de E-SPE[®] foram condicionados com 2 mL de metanol, seguidos por 2 mL de água e 4 mL de solução tampão.

Antes de cada incremento do valor de corrente elétrica, potencial elétrico, variação de vazão ou concentração do tampão de lavagem, o cartucho foi novamente condicionado. O campo elétrico foi aplicado sempre com a polaridade do eletrodo superior positiva e do eletrodo inferior negativa (E-SPE[®]_(+/-)).

Os experimentos foram realizados empregando um único cartucho (n = 1) tipo 1 (eletrodo inferior i6 e superior s9) em cada parâmetro avaliado. Neste experimento não foi utilizado o sistema de fluxo bidirecional.

F) Desenvolvimento do dispositivo de E-SPE[®] tipo “manifold” para múltiplas extrações

Um dispositivo para múltiplas extrações baseado nos sistemas tipo “manifold” convencionais foi projetado, construído e utilizado como parte do sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos descrito no item 3.2.4 A.

A configuração simplificada desse dispositivo compreendeu:

- um sistema capaz de utilizar tanto bombas de vácuo como bombas peristálticas para promover a eluição das soluções;
- um conjunto de válvulas manuais capazes de direcionar os eluatos para canais acoplados a uma bomba peristáltica ou, alternativamente, direcioná-los para canais conectados a um sistema a vácuo;
- um conjunto de canais para direcionamento dos eluatos de interesse para câmaras diferenciadas de descarte e de coleta das amostras purificadas;
- circuito elétrico com chaves liga-desliga para acionamento dos eletrodos;
- conectores elétricos para conexão da fonte de eletroforese;

Para o desenvolvimento desse sistema foram utilizados os seguintes materiais: chapas de acrílico e PTFE empregadas nos suportes para válvulas e câmaras de vácuo; tarugos de PTFE empregados nas válvulas; tubos de aço inoxidável empregados em válvulas e conexões; vacuômetro utilizado para a visualização do vácuo empregado; tubulações de silicone empregado para as conexões.

Esse sistema foi desenvolvido através do setor de mecânica fina do Instituto de Química da Unicamp que confeccionou as peças solicitadas após receber os desenhos e a indicação dos materiais que deveriam ser empregados.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Desenvolvimento de um sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos

As extrações com e sem aplicação do campo elétrico foram realizadas empregando o sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos descrito na secção 3.2.4 A e apresentado na Figura 3.9.

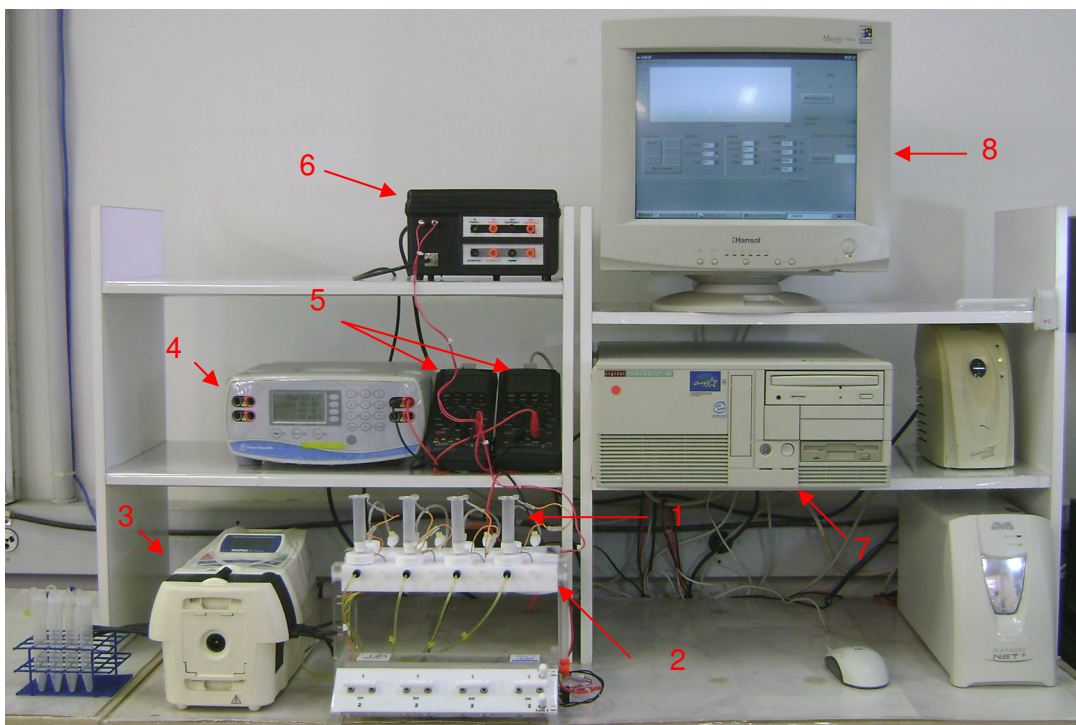


Figura 3.9. Sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos desenvolvido para os estudos de E-SPE[®]. 1 = cartucho de extração adaptado com eletrodos; 2 = sistema de extração tipo “manifold”; 3 = bomba peristáltica; 4 = fonte de eletroforese; 5 = multímetros; 6 = circuito eletrônico amplificador; 7 = microcomputador e 8 = monitor mostrando a tela do programa para coleta e armazenamento dos dados.

Para a visualização e registro dos valores medidos dos parâmetros eletrocromatográficos foi desenvolvido um programa de comunicação escrito em linguagem Visual Basic (Figura 3.10). Este programa monitorava, simultaneamente,

os dados dos sinais de potencial elétrico e corrente elétrica provenientes dos dois multímetros, além dos sinais de potencial elétrico do termistor, que eram armazenados no disco rígido do microcomputador. O programa desenvolvido também realizava a conversão dos valores de potencial elétrico proveniente do termistor (volt) em valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$). A Figura 3.10 mostra a janela gráfica do programa.

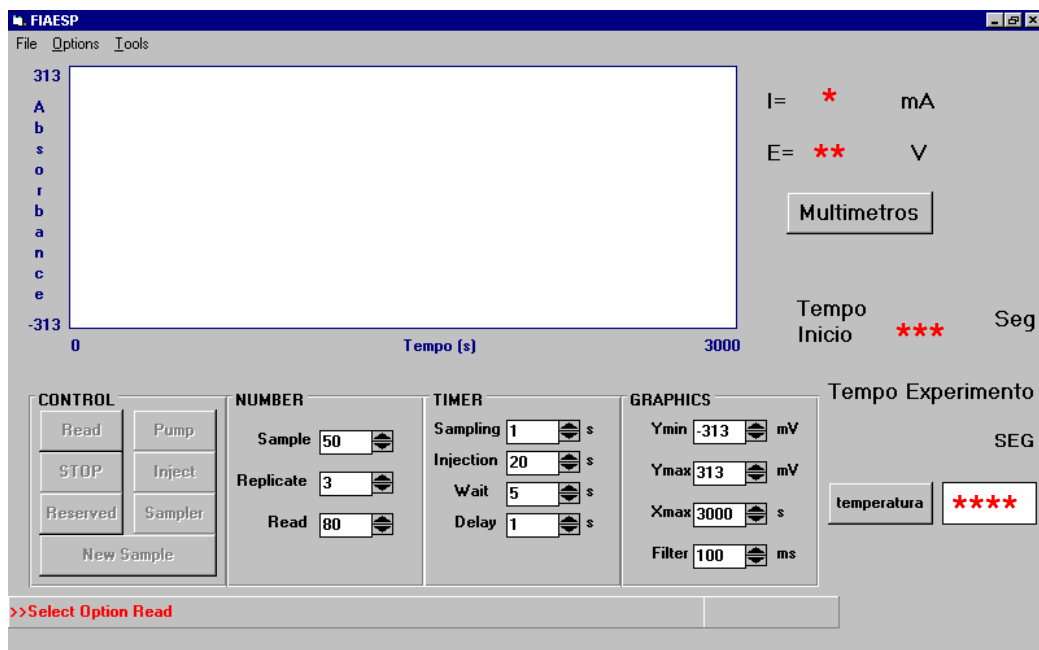


Figura 3.10. Janela gráfica do programa de registro e armazenamento de dados utilizado para monitorar a corrente elétrica*, potencial elétrico**, tempo do experimento*** e temperatura****.

Os estudos subsequentes, incluindo o desenvolvimento dos cartuchos e eletrodos, além dos estudos de extração com e sem aplicação de campo elétrico com os compostos modelo, foram realizados empregando o sistema desenvolvido para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos.

Apenas a determinação da recuperação do analito ao final do processo de extração não é suficiente para a compreensão adequada dos efeitos da aplicação do campo elétrico sobre o processo de extração. Foi preciso também que o potencial elétrico, a corrente elétrica, a vazão e a temperatura fossem monitorados e/ou controlados constantemente durante o período de aplicação do campo elétrico.

Dessa forma, para que os estudos de extração com aplicação de campos elétricos gerassem dados confiáveis e que permitissem explicar os fenômenos envolvidos foi preciso desenvolver um sistema para monitoramento e controle desses parâmetros eletrocromatográficos.

Não é do nosso conhecimento, até o presente momento, a existência de qualquer dispositivo comercial ou descrito na literatura com funcionamento avaliado e comprovado e de finalidade específica para extrações em fase sólida aplicando campos elétricos em cartuchos. Por esse motivo, todos os dispositivos apresentados neste trabalho precisaram ser desenvolvidos completamente, ou, no mínimo, ser adaptados das técnicas eletroforéticas e eletrocromatográficas correlatas.

No processo de E-SPE[®] a vazão é um parâmetro mais importante a ser controlado que na SPE convencional, uma vez que ela determinará o tempo da extração e, dessa forma, o tempo em que os analitos serão submetidos à força do campo elétrico. A vazão também é responsável, em parte, pela diminuição do aquecimento no interior do cartucho em função da potência elétrica aplicada como será mostrado na seção 3.3.5. O aumento da temperatura durante o processo de extração influencia tanto os processos cromatográficos quanto eletroforéticos. Dessa forma, o controle preciso da vazão é de grande importância para o procedimento de E-SPE[®]. Contudo, em sistemas de extração em fase sólida comerciais tipo “manifold” que trabalham sob vácuo, o controle preciso da vazão é difícil de ser obtido. Sendo assim, a incorporação da bomba peristáltica demonstrou ser fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Os efeitos eletroforéticos (mobilidade eletroforética e fluxo eletrosmótico), também dependem dos potenciais elétricos aplicados e da corrente elétrica gerada e, por esses motivos, o seu monitoramento e controle são fundamentais para os estudos de extração com aplicação do campo elétrico.

Em todas as demais extrações empregando tanto a SPE convencional, como a E-SPE[®], foi utilizado o sistema mostrado na Figura 3.9.

3.3.2 Desenvolvimento e avaliação dos cartuchos e eletrodos

Os primeiros cartuchos e eletrodos avaliados foram os cartuchos tipo 4 empregando eletrodos inferiores i9, i10 e i11 acoplados ao bico do cartucho além do cartucho tipo 1 onde o eletrodo i6 é introduzido no interior do cartucho (Figuras 3.2 e 3.4). Esses eletrodos inferiores foram avaliados juntamente com o eletrodo superior s9 (Figura 3.4). Os resultados da avaliação desses cartuchos e eletrodos são apresentados nos gráficos A e B da Figura 3.11.

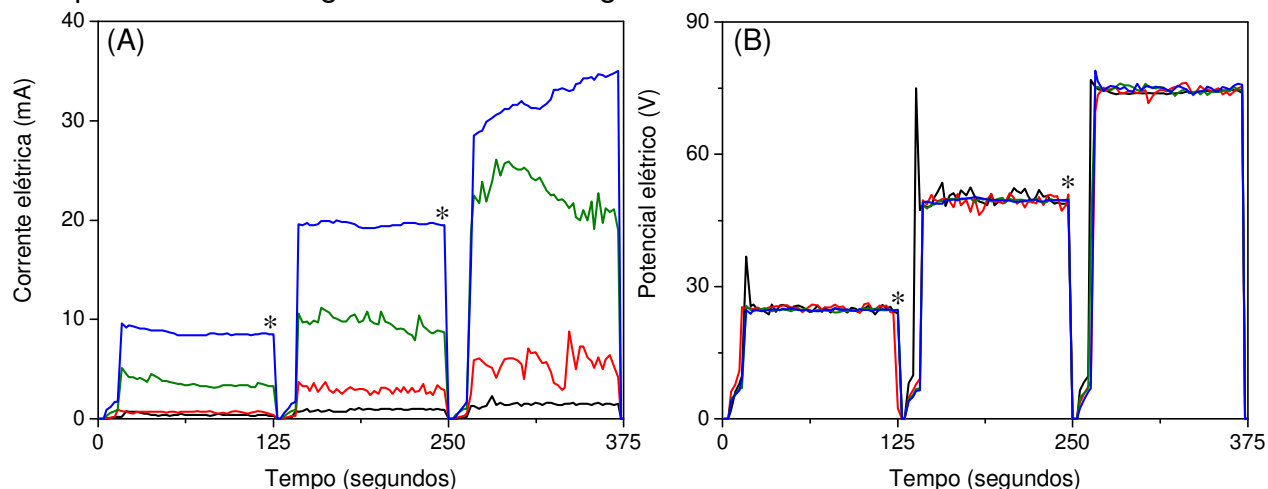


Figura 3.11. Gráficos dos valores da corrente elétrica (A) e potencial elétrico (B) monitorados durante a aplicação do campo elétrico empregando: cartuchos tipo 1 com o eletrodo inferior — i6 e, cartucho tipo 4 com os eletrodos inferiores — i9, i10 e i11. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução tampão ACF 20/40 adicionado de 10% (v/v) de metanol; vazão de 1 mL min⁻¹; eletrodos superiores s9 positivos e eletrodos inferiores negativos (E-SPE[®]_(+/-)). Demais condições descritas na seção 3.3.4 B. * = Momento em que a fonte de eletroforese é desligada e posteriormente ligada empregando um potencial elétrico superior ao anterior.

Analisando os gráficos de corrente elétrica da Figura 3.11 A é possível observar que os eletrodos inferiores i9, i10 e i11, acoplados ao bico do cartucho tipo 4, apresentaram correntes elétricas bastante inferiores ao eletrodo i6, posicionado no interior do cartucho tipo 1.

Esses mesmos eletrodos também foram avaliados em vazão de 2 mL min⁻¹ e os resultados de corrente e potencial elétrico são apresentados na Figura 3.12.

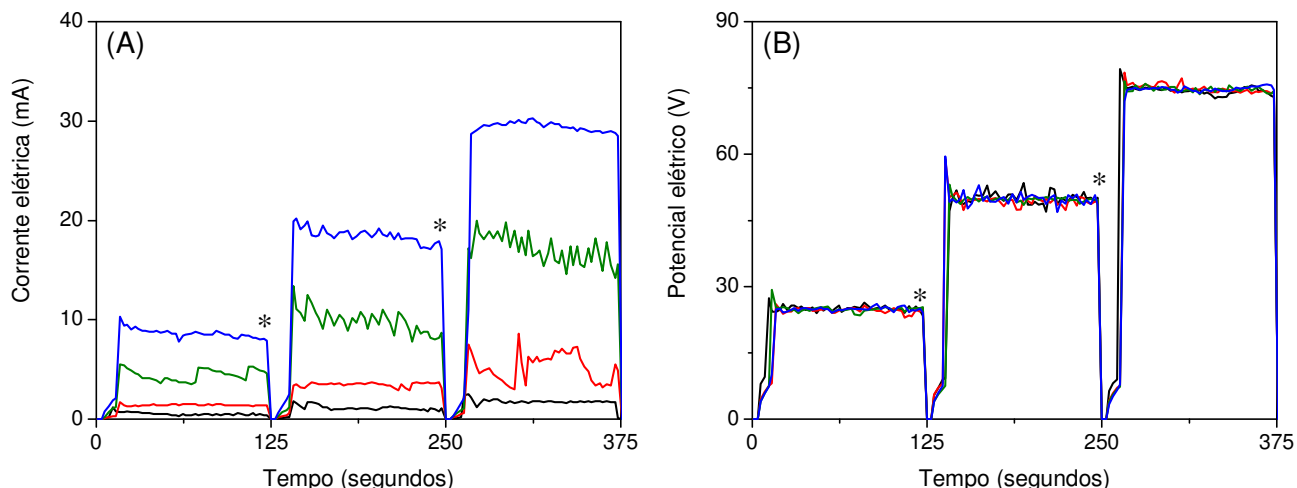


Figura 3.12. Gráficos dos valores da corrente elétrica (A) e potencial elétrico (B) monitorados durante a aplicação do campo elétrico empregando: cartucho tipo 4 com o eletrodo inferior — i6 e, cartucho 4 com os eletrodos inferiores — i9, — i10 e — i11. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução tampão ACF 20/40 adicionado de 10% (v/v) de metanol; vazão de 2 mL min⁻¹; potenciais elétricos constantes de 25, 50 e 75 V; eletrodos superiores s9 positivos e inferiores negativos (E-SPE^{® (+/-)}). Demais condições descritas na secção 3.3.4 B. * = Momento em que a fonte de eletroforese é desligada e posteriormente ligada empregando um potencial elétrico superior ao anterior.

Um perfil mais estável e linear da corrente elétrica pode ser observado para o cartucho tipo 1 com o eletrodo i6 em potencial elétrico de 75 V e vazão 2 mL min⁻¹. Para os demais eletrodos não foi observado variação significativa do perfil dos potenciais e correntes elétricas monitoradas com o incremento da vazão.

A comparação do desempenho dos eletrodos também foi realizada normalizando os valores de corrente elétrica ao dividi-los pela corrente elétrica média observada para o respectivo eletrodo, a cada valor de potencial elétrico avaliado. O gráfico com os dados normalizados de corrente elétrica empregando os eletrodos i6 e i9 estão apresentados na Figura 3.13.

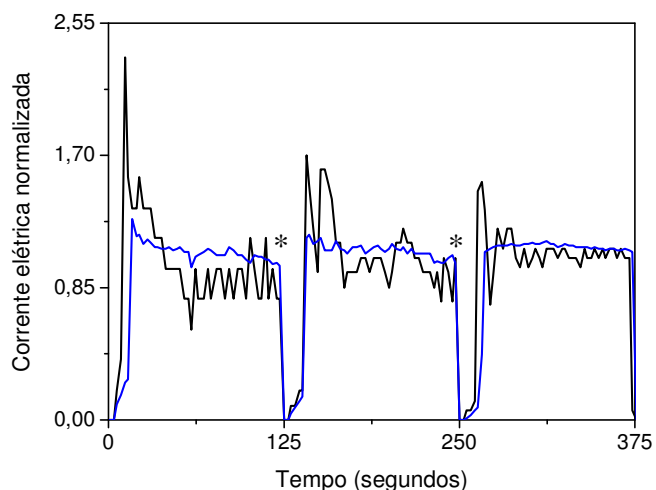


Figura 3.13. Gráfico dos valores de corrente elétrica, normalizados em relação ao valor médio, provenientes da aplicação do campo elétrico empregando: cartuchos tipo 1 e 4 com os eletrodos inferiores — i6 e — i9, respectivamente. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução tampão ACF 20/40 adicionado de 10% (v/v) de metanol; vazão de 2 mL min⁻¹; potenciais elétricos constantes de 25, 50 e 75 V; eletrodos superiores s9 positivos e inferiores negativos (E-SPE[®]_(+/-)). Demais condições descritas na secção 3.3.4 B. * = Momento em que a fonte de eletroforese é desligada e posteriormente ligada empregando um potencial elétrico superior ao anterior.

Neste gráfico observa-se que o eletrodo i9 acoplado ao cartucho tipo 4 além de apresentar correntes elétricas inferiores também demonstrou uma maior oscilação dos valores em relação a corrente média em comparação ao eletrodo i6 empregado no cartucho tipo 1. Resultados semelhantes ao eletrodo i9 foram observados também para os eletrodos i10 e i11 (não apresentado).

Também foram avaliados os cartuchos tipo 1 acoplados aos eletrodos inferiores i3 e i7, cartuchos tipo 3 com o eletrodo inferior i2 e o cartucho tipo 2 com o eletrodo inferior i6 combinado com o eletrodo inferior i10, todos eles empregando o eletrodo superior s9. Os resultados de corrente e potencial elétrico dessa avaliação são apresentados nos gráficos A e B da Figura 3.14. Nesta figura, são apresentados, novamente, os dados do cartucho tipo 3 empregando o eletrodo i6 para efeitos de comparação.

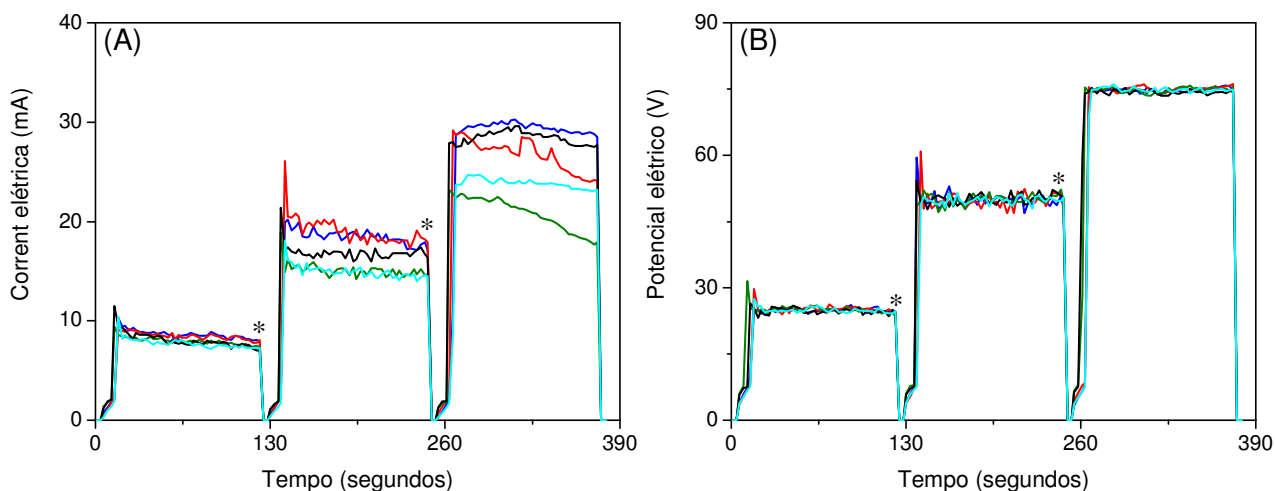


Figura 3.14. Gráficos dos valores da corrente elétrica (A) e potencial elétrico (B) monitorados durante a aplicação do campo elétrico empregando: cartucho tipo 1 com os eletrodos inferiores — i3, — i6 e — i7; cartucho tipo 2 com o eletrodo inferior combinado — i6 com i10 e, cartucho tipo 3 com o eletrodo inferior — i2. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução tampão ACF 20/40 adicionado de 10% (v/v) de metanol; vazão de 2 mL min^{-1} ; potenciais elétricos constantes de 25, 50 e 75 V; eletrodos superiores s9 positivos e inferiores negativos (E-SPE[®]_(+/-)). Demais condições descritas na secção 3.3.4 B. * = Momento em que a fonte de eletroforese é desligada e posteriormente ligada empregando um potencial elétrico superior ao anterior.

No gráfico A da Figura 3.14 observa-se que os valores de corrente elétrica, nos três níveis de potencial elétrico aplicado, foram mais próximos para esses pares de cartuchos e eletrodos. Uma maior diferença foi observada apenas para o cartucho tipo 1 com o eletrodo inferior i3 (—) e cartucho tipo 3 com o eletrodo inferior i2 (—).

Já os valores dos potenciais elétricos medidos foram todos bastante similares e com perfis estáveis.

Após esta etapa, foram avaliados outros formatos de eletrodos superiores. Para todos os eletrodos superiores avaliados os valores de corrente e potencial elétrico foram semelhantes (resultado não apresentado). Contudo, foi observado o problema de acúmulo de bolhas na superfície da maioria dos eletrodos superiores avaliados (Figura 3.15).

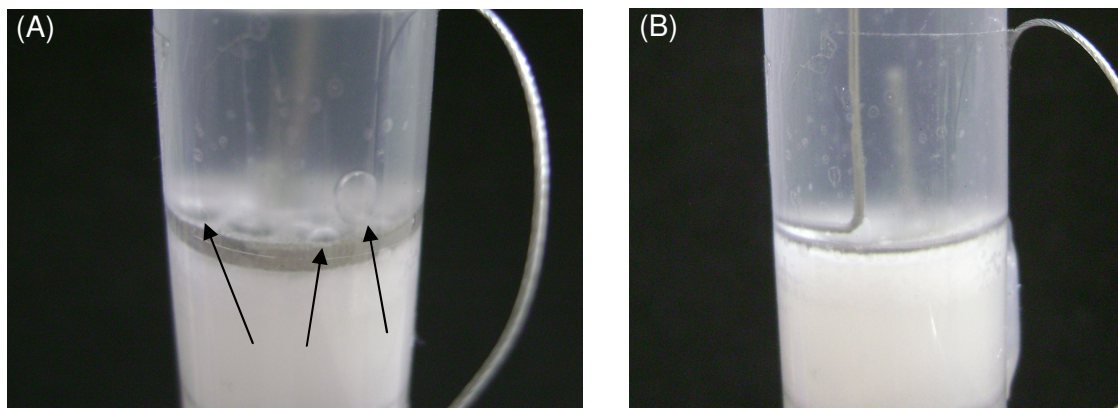


Figura 3.15. Imagens dos eletrodos superiores s3 (A) e s9 (B) durante a aplicação do campo elétrico. Setas indicando o acúmulo de bolhas na superfície do eletrodo s3. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução tampão ACF 20/40 adicionado de 10% (v/v) de metanol; vazão de 2 mL min⁻¹; cartuchos tipo 1 montados com eletrodos inferiores i6; eletrodos superiores positivos e inferiores negativos (E-SPE[®]_(+/-)). Demais condições descritas na seção 3.3.4 B.

É possível observar que o eletrodo s3 apresentou um acúmulo de bolhas na sua superfície, enquanto o mesmo não ocorreu para o eletrodo s9.

Todos os demais eletrodos superiores avaliados (s1, s2, s4, s5, s6, s7 e s8) também apresentaram problemas de acúmulo de bolhas na sua superfície semelhantes ao eletrodo s3 (resultados não apresentados).

Para que ocorra o processo eletrocromatográfico de forma eficiente é preciso que haja um campo elétrico que atravesse o leito do cartucho em toda a extensão do sorvente e, por esses motivos, os eletrodos são dispositivos fundamentais para a E-SPE[®].

Os eletrodos precisam ser necessariamente condutores, resistentes à eletrólise, ao ataque de substâncias químicas e a passivação, permitir uma livre passagem e uma distribuição uniforme das soluções para o interior do recheio e, finalmente, permitir a dispersão dos gases provenientes da eletrólise do solvente. A presença dos eletrodos no cartucho também não deveria alterar de modo significativo o modo convencional de operação dos cartuchos de SPE, que é relativamente simples e por isso vantajoso. Outra característica importante é que os eletrodos deveriam ser de fácil confecção para permitir que um número significativo

de unidades fosse construído para a realização dos diversos estudos propostos.

Para as técnicas eletrocromatográficas, em especial, a eletrocromatografia, dois grandes problemas são relatados quanto ao formato e ao posicionamento do eletrodo [33]. O primeiro é o acúmulo de gases H_2 e O_2 , provenientes da eletrólise da água, na superfície do eletrodo. Dependendo da intensidade, esse acúmulo pode distorcer o campo elétrico ou cortar o circuito elétrico ao impedir o contato do eletrodo com a solução. Para a E-SPE[®], esses gases também podem acumular-se no recheio e levar a formação de caminhos preferenciais e, por isso, eles devem ser removidos do interior do cartucho.

O outro problema do eletrodo está relacionado a perda da eficiência ou a distribuição não homogênea do campo elétrico sobre o sorvente [33]. Qualquer barreira física e/ou química representa uma região de alta resistência elétrica fazendo com que grande parte do campo elétrico recaia sobre esse local e reduza sua eficiência.

Vários conjuntos de eletrodos e cartuchos foram avaliados buscando solucionar esses problemas, bem como simplificar a montagem e reduzir custos.

Dentre as principais características da confecção dos eletrodos inferiores e tipo de cartuchos avaliados vale destacar:

- eletrodos i8 e i9 utilizados com o cartucho tipo 4: esse cartucho possui a mesma configuração de um cartucho comercial; os eletrodos são facilmente acoplados ao cartucho e são os mais econômicos e amplamente disponíveis;

- eletrodos i10 e i11 utilizados com o cartucho tipo 4: esse cartucho também possui a mesma configuração de um cartucho comercial; os eletrodos são facilmente acoplados ao cartucho porém, não são disponíveis comercialmente e são de custo mais elevado que os anteriores;

- eletrodos i1 e i2 utilizados com o cartucho tipo 3: essa configuração não requer o acoplamento do eletrodo ao cartucho porém, esse cartucho não é disponível comercialmente e requer um suporte especialmente construído para o acoplamento do cartucho, o que eleva o custo tanto dos cartuchos como dos eletrodos;

- eletrodos i3 a i7 utilizados com o cartucho tipo 2: o cartucho não é disponível comercialmente, mas é facilmente montado; os eletrodos são facilmente acoplados

ao cartucho mas precisam ser combinados com os eletrodos i10 e i11; os eletrodos i3 a i7 são disponíveis comercialmente mas os eletrodos i10 e i11 não, o que torna o conjunto relativamente oneroso;

- eletrodos i3 a i7 utilizados com o cartucho tipo 1: o cartucho não é disponível comercialmente e requer certa habilidade para montagem; os eletrodos são facilmente acoplados ao cartucho, são disponíveis comercialmente e de preço acessível.

O desempenho dos eletrodos superiores, quando submetidos a campos elétricos, também diferiu significativamente.

Dentre os eletrodos inferiores estudados (i1 a i7), foi observado que, para aqueles que foram posicionados dentro do cartucho (i3 a i7) ou, simplesmente, logo abaixo do frit inferior (i1 e i2), as correntes elétricas foram mais estáveis (Figura 3.14). Já os eletrodos acoplados ao cartucho pelo bico (i9 a i11) apresentaram correntes elétricas inferiores e com maior oscilação Figura 3.12 A.

O bico do cartucho representa uma região constricta e com diâmetro inferior ao diâmetro do corpo do cartucho avaliado (2 mm *versus* 12,54 mm para o cartucho de 6 mL utilizado). Como a resistência elétrica do cartucho (R) (eq. 1) depende do comprimento do leito (L) (distância entre os eletrodos), da condutividade elétrica da solução (σ) e também da área da secção transversal (A) (diâmetro) [36]:

$$R = L / (\sigma \cdot A) \quad (\text{eq. 1})$$

O campo elétrico irá recair de forma intensa na região do bico em função da sua acentuada resistência elétrica. Como consequência as correntes elétricas para o eletrodo i9 posicionado no bico do cartucho foram bastante inferiores as demais. Esse efeito foi reduzido com os eletrodos i10 e i11 acoplado ao cartucho tipo 4. A porção tubular ou helicoidal desses eletrodos era introduzida no bico até alcançar o frit inferior do cartucho. Dessa forma, o campo elétrico não era afetado pelo menor diâmetro do bico e, por esse motivo, as correntes elétricas medidas foram bastante superiores ao eletrodo i9.

Uma outra limitação observada para o eletrodo inferior posicionado no bico foi

em relação à oscilação dos valores da corrente elétrica medida, que proporcionalmente, foram muito superiores aos eletrodos posicionados no interior do cartucho. Esse resultado foi atribuído aos gases que se acumulavam no bico do cartucho formando bolhas. Essas bolhas permaneciam presas nessa porção e aumentavam de volume até o momento em que o fluxo era capaz de removê-las, fazendo com que a corrente elétrica oscilasse.

Para os eletrodos inferiores inseridos no interior do cartucho, como mencionado, as correntes elétricas resultantes associadas aos mesmos valores de potenciais elétricos aplicados foram superiores e mais estáveis. Esse resultado é decorrente do campo elétrico mais intenso e melhor distribuído sobre o sorvente do cartucho que é a região de interesse. Foi possível observar que ao posicionar os eletrodos no interior do cartucho de forma a diminuir os espaços livres ao seu redor o problema de oscilação da corrente elétrica e do potencial elétrico foi drasticamente minimizado. Quando não é fornecido espaço suficiente para o crescimento das bolhas dentro dos cartuchos, elas permanecem em tamanho suficiente para serem levadas pelo fluxo em direção a saída do cartucho e, ao chegarem ao bico do mesmo, elas encontram espaço para coalescer e continuam a seguir em direção ao fluxo.

Entre os conjuntos avaliados, o eletrodo inferior i6 inserido no interior do cartucho tipo 1 foi o que apresentou corrente e potenciais elétricos mais estáveis, e, por esse motivo, foi escolhido para os estudos subseqüentes de extração com aplicação de campo elétrico empregando compostos modelo (capítulos 4 e 5).

A segunda etapa do desenvolvimento foi em relação ao eletrodo superior empregado. Para tanto, vários formatos de eletrodos superiores foram avaliados.

O encaixe dos eletrodos superiores não apresentou limitações e pode ser realizada facilmente pela porção superior dos cartuchos de SPE que é aberta. Entre os eletrodos superiores avaliados o fio em formato de espiral (s9) é o mais fácil de ser confeccionado e ainda pode ser adquirido comercialmente a um preço bastante acessível.

Para esse eletrodo superior não foi observado o problema de acúmulo de bolhas, pois ele tem uma configuração suficientemente livre para que os gases não

se acumulem sobre sua superfície e saiam pela parte superior do cartucho que é aberta.

Com os demais eletrodos (s1 a s8) observou-se que suas configurações não foram suficientemente permissivas para facilitar a plena saída dos gases pela porção superior do cartucho o que resultou em problemas de acúmulo de bolhas na superfície do eletrodo.

O acúmulo de bolhas na superfície do eletrodo superior pode perturbar o fluxo dentro do leito do cartucho e alterar a livre passagem e a distribuição homogênea dos líquidos que penetram no sorvente, levando a formação de caminhos preferenciais. Dessa forma, o eletrodo s9 foi escolhido para os demais experimentos de E-SPE[®] descritos nos capítulos seguintes.

3.3.3 Avaliação da repetibilidade da montagem dos cartuchos e eletrodos

Para os estudos subsequentes de E-SPE[®] com compostos modelo foi escolhido o conjunto de eletrodos inferior i6 e superior s9 montados no cartucho tipo 3.

Como esses cartuchos seriam montados manualmente foi preciso avaliar também se diferentes cartuchos montados com essa configuração apresentariam perfis de corrente e potencial elétrico semelhantes durante a aplicação de campos elétricos e, assim, garantir que os procedimentos e os resultados de E-SPE[®] apresentassem repetibilidade.

A repetibilidade da montagem dessa configuração de cartuchos de E-SPE[®] foi avaliada através da aplicação de campo elétrico em 5 cartuchos diferentes ($n = 5$) e os valores de corrente e potencial elétrico medidos estão representados nos gráficos A e B da Figura 3.16.

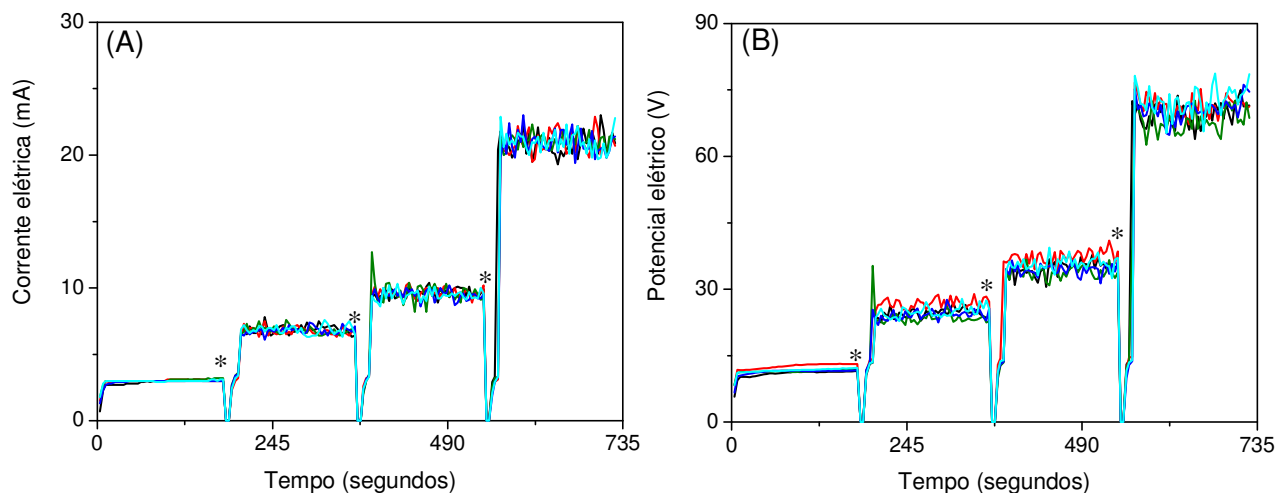


Figura 3.16. Gráficos dos valores da corrente elétrica (A) e potencial elétrico (B) monitorados durante a avaliação da repetibilidade da montagem de 5 diferentes cartuchos de E-SPE[®]. Cartuchos tipo 1 montados com eletrodos inferiores i6 e eletrodos superiores s9. Condições durante a aplicação do campo elétrico: solução tampão ACF 20/40 adicionado de 10 (v/v) de metanol; vazão de 2 mL min⁻¹; correntes elétricas constante de 3, 6, 9 e 20 mA; eletrodos superiores s9 positivos e inferiores i6 negativos (E-SPE[®]_(+/-)). Demais condições descritas na secção 3.3.4 C. * = Momento em que a fonte de eletroforese é desligada e, em seguida, restabelecida a um outro valor de corrente elétrica superior ao anterior.

Na Figura 3.16, observa-se que perfil dos gráficos dos valores de corrente e potencial elétrico foram bastante semelhante e com poucas flutuações para os 5 cartuchos avaliados. Esses resultados demonstraram que a montagem dos cartuchos é repetitiva e capaz de gerar campos elétricos similares. Nesse estudo a aplicação do campo elétrico foi realizada empregando corrente elétrica constante que foi considerado o melhor modo de utilização da fonte de eletroforese para evitar um excesso de aquecimento no interior do cartucho como será discutido na secção 3.3.5.

3.3.4 Avaliação do comportamento do pH do eluente frente à aplicação do campo elétrico com e sem o uso do sistema de fluxo bidirecional

Na Figura 3.17 são apresentados os valores de pH medidos na solução eluentes (ACF 10/20; ACF 1/2 e NaCl) durante os procedimentos de SPE e E-SPE[®] empregando o fluxo convencional e também a inovação denominada de sistema de fluxo bidirecional.

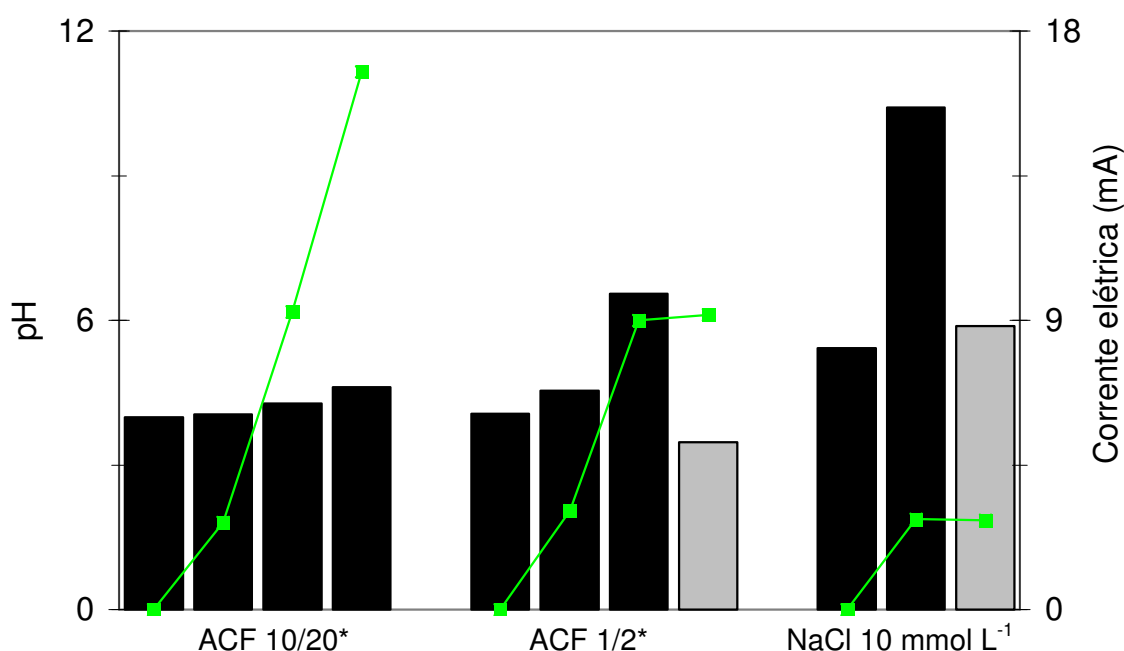


Figura 3.17. Valores de pH do eluente e da corrente elétrica (mA) (-■-) aplicada em diferentes soluções de lavagem empregando (■) o fluxo convencional e (■) o fluxo bidirecional. *Soluções tampão de lavagem preparadas em pH 4,0 pela mistura das soluções de ácido cítrico 10 mmol L⁻¹ com fosfato de sódio bibásico 20 mmol L⁻¹ (ACF 10/20); e ácido cítrico 1 mmol L⁻¹ com fosfato de sódio bibásico 2 mmol L⁻¹ (ACF 1/2). Vazões empregadas: 0,9 mL min⁻¹ na saída inferior (bico); 0,9 mL min⁻¹ na saída lateral (dreno) onde foi obtida uma alíquota do eluente para medida do pH; 3,6 mL min⁻¹ nas duas entradas superiores do fluxo bidirecional bidirecional. Campo elétrico aplicado com a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante, empregando eletrodo superior negativo e inferior positivo (E-SPE[®]_(-/+)). Demais condições descritas na secção 3.3.4 D.

Neste estudo foram empregadas soluções de lavagem tamponada e não tamponada que tiveram parte dos seus volumes percolados recolhidos, através de uma tubulação inserida dentro do frit superior através de um orifício na parede lateral do cartucho como foi descrito na Figura 3.6. Após recolher aproximadamente 3 mL das soluções eluentes, os valores de pH dessas frações recolhidas foram medidos. A cada novo valor de corrente elétrica avaliado ou a cada troca de solução percolada o cartucho foi novamente condicionado para que a força iônica e o pH fosse reequilibrado com a nova solução.

Analisando o gráfico da Figura 3.17 é possível observar que a solução tamponada ACF 10/20 sofreu pouca variação do pH frente à corrente elétrica empregada e, assim, não houve a necessidade de avaliar o efeito do fluxo bidirecional para essa solução. Entretanto, quando o tampão ACF 1/2 com menor concentração de eletrólitos foi utilizado, em fluxo convencional, a variação de pH foi de aproximadamente 2 unidades com corrente elétrica de 9 mA. Essa mesma solução, agora empregada com o fluxo bidirecional, apresentou grande estabilidade do pH frente à mesma corrente elétrica de 9 mA. Um resultado ainda mais significativo da aplicação do fluxo bidirecional foi observado para a solução não tamponada de NaCl. Para essa solução, correntes elétricas de apenas 3 mA foram suficientes para provocar uma elevação do pH da solução de quase 5 unidades com a utilização do fluxo convencional. Entretanto, quando empregado o fluxo bidirecional, essa elevação do pH foi praticamente anulada.

A comparação do fluxo convencional com o fluxo bidirecional também foi realizada empregando o indicador de pH azul de bromotimol em solução tampão citrato 0,5 mmol L⁻¹, pH 4,52 (Figura 3.18). Nesta solução foi verificado que o indicador muda da cor amarela para cor azul em valores de pH acima de 6,5.

Através das imagens da Figura 3.18, podemos observar o efeito da corrente elétrica sobre a solução tampão citrato 0,5 mmol L⁻¹. Essa solução, com baixa concentração de eletrólitos, não conseguiu neutralizar a mudança do pH promovida pela eletrólise da água e, por esse motivo, sofreu uma mudança de coloração de amarelo para azul. Com essa mesma solução, ao usar o fluxo bidirecional proposto, a mudança de pH e de coloração ficou restrita a porção superior do cartucho logo

acima do eletrodo, não interferindo, de forma significativa, na concentração hidrogeniônica que atravessa o leito do sorvente.

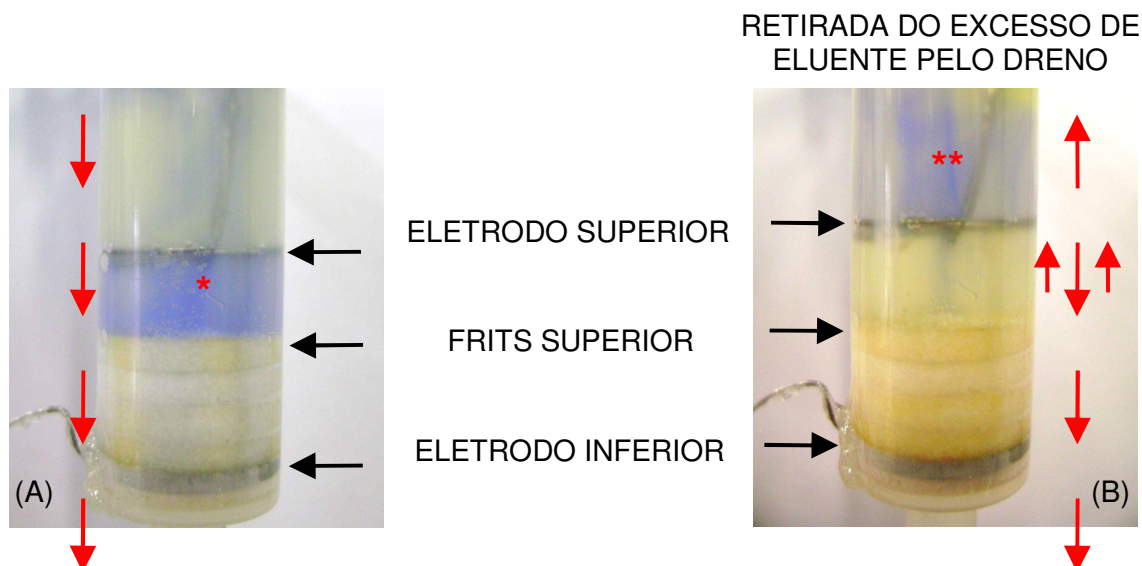


Figura 3.18. Comparação entre o cartucho com o sistema de fluxo convencional (A) e o cartucho com o sistema de fluxo bidirecional (B). * região onde ocorreu mudança de coloração do indicador de pH no cartucho com o fluxo convencional; ** região onde ocorreu da mudança de coloração do indicador de pH no cartucho com o sistema de fluxo bidirecional. Condições durante a aplicação do campo elétrico (A e B): cartucho recheado com 4 frits de PTFE; vazão de 2 mL min^{-1} ; eletrodo superior negativo e inferior positivo (E-SPE[®]_(-/+)); fonte de eletroforese no modo corrente elétrica de 15 mA; tampão citrato $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 4,52, com 2% (v/v) de solução do indicador azul de bromotimol 0,05% (m/v). Setas vermelhas indicam a direção do fluxo naquela região do cartucho.

A geração dos íons H^+ e OH^- provenientes da eletrólise da água é um dos grandes problemas decorrente da aplicação de campos elétricos em sistemas electrocromatográficos em coluna. Keim e Ladisch (2000) relatam que correntes elétricas médias de 25 mA geram aproximadamente $4,7 \times 10^{-4} \text{ mol h}^{-1}$ de H_2 e $2,3 \times 10^{-4} \text{ mol h}^{-1}$ de O_2 [33]. Dessa forma, podemos estimar, através das semi-reações de hidrólise, que os íons OH^- e H^+ são formados a uma taxa de $9,4 \times 10^{-4}$ e $9,2 \times 10^{-4} \text{ mol h}^{-1}$, respectivamente. Essa quantidade significativa de íons irá alterar o pH da solução, em maior ou menor escala, dependendo obviamente do volume e da velocidade da vazão aplicada, além da concentração e do tipo de tampão

empregado.

Dessa forma, foi necessário avaliar a mudança do valor do pH no leito do cartucho durante o procedimento de extração com aplicação de campo elétrico e, ao mesmo tempo, propor uma solução para contornar esse problema.

A proposta sugerida e avaliada foi a de promover um fluxo bidirecional que levasse a solução para o leito do cartucho em direção ao sorvente e, simultaneamente, carresse parte dos gases e íons da hidrólise em outra direção preferencialmente para fora do cartucho.

A estratégia foi direcionar a entrada de solução de lavagem abaixo do eletrodo superior e proporcionar a sua passagem simultânea, tanto pelo recheio, quanto por um escape posicionado na parede lateral do cartucho acima do eletrodo superior (Figura 3.6). Dessa forma, parte dos íons provenientes da hidrólise foram forçados para cima onde seriam drenados pelo escape (Figura 3.18 B). Nessa situação a quantidade de solvente de lavagem empregado passaria a ser controlada pela vazão da bomba peristáltica e pelo tempo de seu funcionamento e não mais pelo volume de lavagem adicionado ao cartucho.

Os resultados apresentados nas Figuras 3.17 e 3.18 demonstraram, claramente, que o fluxo bidirecional é bastante eficiente para manter o controle do pH da solução eluente, mesmo na ausência de elementos tamponantes.

Por esses motivos o conceito do fluxo bidirecional foi aplicado aos estudos onde se julgou necessário um controle mais preciso do pH da solução eluente.

3.3.5 Avaliação da mudança da temperatura no interior do cartucho durante a aplicação do campo elétrico

Este estudo foi realizado empregando um termistor inserido no interior do cartucho de E-SPE[®] como descrito na seção 3.2.4 D e os resultados dessa avaliação estão apresentados nos gráficos das Figuras 3.19, 3.20 e 3.21.

A Figura 3.19 A descreve a mudança da temperatura do cartucho em função da corrente elétrica empregada com três diferentes concentrações de tampão com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante. Através deste

gráfico é possível observar que, para os mesmos valores de corrente elétrica empregada, os tampões mais concentrados apresentaram aquecimentos substancialmente menores em relação aos tampões mais diluídos. Também vale ressaltar que os potenciais elétricos associados às suas respectivas correntes elétricas, empregando as soluções tampão mais concentradas, foram significativamente menores (Figura 3.19 B).

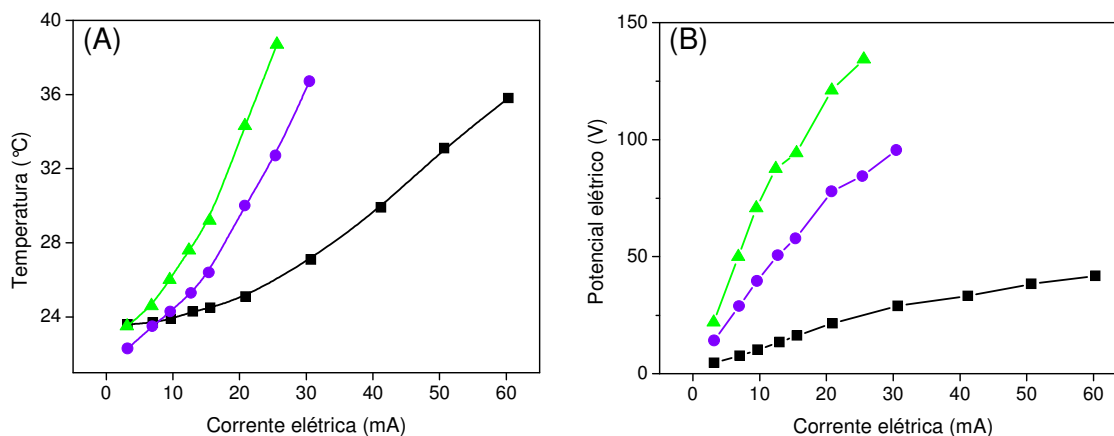


Figura 3.19. (A) Valores da temperatura no interior do cartucho em função da corrente elétrica empregada para três diferentes concentrações de tampão ACF. (B) Respective valores de potenciais elétricos associados às correntes elétricas do gráfico (A). (-▲-) = solução tampão ACF 10/20, preparada pela mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 10 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 20 mmol L⁻¹; (-●-) = solução tampão ACF 20/40, preparada pela mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 20 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 40 mmol L⁻¹; (-■-) = solução tampão ACF 100/200, preparada pela mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 200 mmol L⁻¹. Tampões ACF preparados em pH 4,0 e contendo 10% (v/v) de metanol. Vazão de 2 mL min⁻¹, campo elétrico aplicado com corrente elétrica constante, eletrodo superior positivo e inferior negativo (E-SPE[®]_(+/-)). Demais condições descritas na secção 3.3.4 E.

A variação da temperatura em função da vazão empregada também foi avaliada e os resultados estão apresentados nos gráficos A e B da Figura 3.20. Neste estudo, a temperatura foi medida durante a eluição da solução tampão com aplicação de campo elétrico empregando a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante.

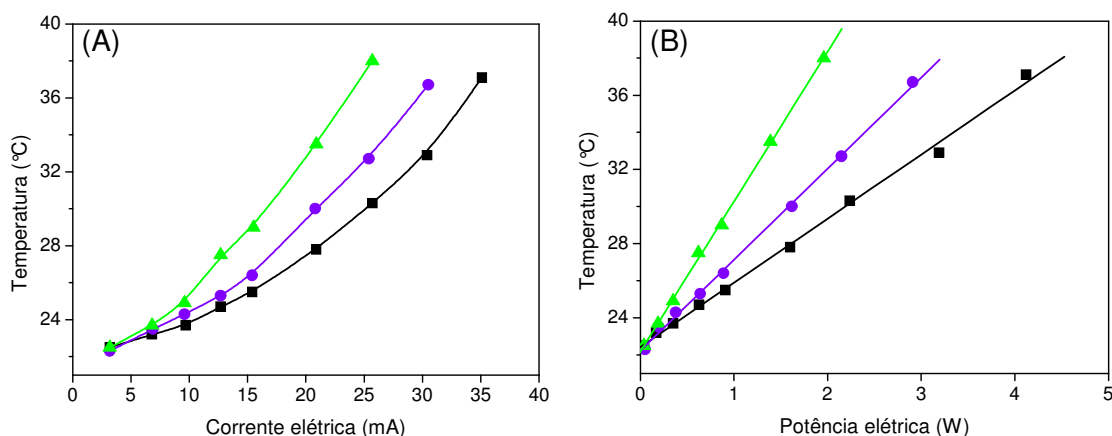


Figura 3.20. (A) Valores da temperatura no interior do cartucho em função da corrente elétrica empregada para três diferentes vazões. (B) Respective valores de potências elétricas associadas às correntes elétricas do gráfico (A). (-▲-) = vazão de 1 mL min⁻¹; (-●-) = vazão de 2 mL min⁻¹; (-■-) = vazão de 3 mL min⁻¹. Solução ACF 20/40 empregada durante a aplicação do campo elétrico, preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 20 mmol L⁻¹ com fosfato de sódio bibásico 40 mmol L⁻¹ e adicionado de 10% (v/v) de metanol. Campo elétrico aplicado com corrente elétrica constante, empregando eletrodo superior positivo e inferior negativo (E-SPE^{® (+/-)}). Demais condições descritas na secção 3.3.4 E.

No gráfico A da Figura 3.20 é possível observar que, para os mesmos valores de corrente elétrica empregada, a temperatura medida no interior do cartucho diminui em função da vazão empregada. No gráfico B por sua vez, nota-se para as três vazões utilizadas (1, 2 e 3 mL min⁻¹), que a correlação da temperatura com a potência elétrica aplicada (produto do potencial elétrico com a corrente elétrica) foi linear na faixa avaliada, com coeficientes de correlação linear (r) superiores a 0,998 para a regressão linear obtida pelo método dos mínimos quadrados.

Uma vez que o aumento da temperatura está diretamente correlacionado com a potência elétrica aplicada, foi avaliado o comportamento da potência elétrica ao empregar a fonte de eletroforese nos modos corrente elétrica constante e potencial elétrico constante (Figura 3.21).

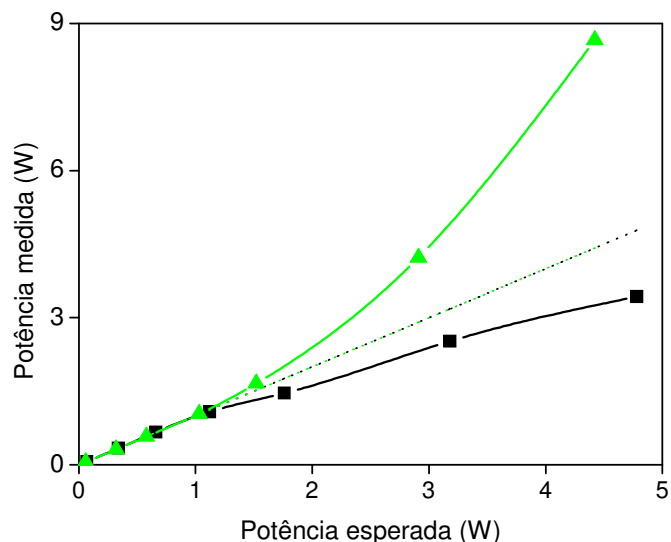


Figura 3.21. Comparação das potências elétricas medidas e esperadas durante a aplicação de campos elétricos para a fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante (-■-) e potencial elétrico constante (-▲-). As linhas tracejadas indicam uma relação hipotética perfeita entre os valores de potência elétrica esperada e medida para termos de comparação. Condições: solução tampão ACF 10/20 empregada durante a aplicação do campo elétrico preparada em pH 4,0 através da mistura de quantidades adequadas de ácido cítrico 10 mmol L^{-1} com fosfato de sódio bibásico 20 mmol L^{-1} e adicionado de 10% (v/v) de metanol. Vazão de 2 mL min^{-1} . Demais condições descritas na seção 3.3.4 E.

O gráfico da Figura 3.21 evidencia que ao empregar a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante (-■-), existe um deslocamento negativo dos valores de potência elétrica medida em relação aos valores teóricos esperados o que significa, em outras palavras, que a potência elétrica medida é menor do que a esperada. Entretanto, ao empregar a fonte de eletroforese no modo de potencial elétrico constante (-▲-), esse deslocamento é positivo resultando em valores de potência elétrica superiores ao esperado.

Nos sistemas eletroforéticos, o transporte de íons em decorrência do potencial elétrico aplicado leva, conseqüentemente, ao aquecimento da solução [1]. Apesar dos dispositivos de resfriamento comumente empregados (líquido e ar refrigerado, forçados) e da corrente elétrica resultante na ordem de poucas dezenas de micro ampères, na eletrocromatografia capilar (CEC), todo aquecimento gerado acaba por

concentrar-se sobre poucas dezenas de nanolitros de solução no interior dos capilares. Soma-se a isso, o fato de que, apesar da corrente elétrica baixa, o potencial aplicado em CE é de algumas dezenas de kV, o que acarreta na geração de potências elétricas de até 6 watts de energia. A distribuição de toda essa energia no interior do capilar pode resultar em um aquecimento excessivo no seu interior e representa um dos problemas nas separações eletroforéticas capilares.

Em E-SPE[®], como nos demais sistemas eletroforéticos, algum aquecimento será gerado durante a aplicação do potencial elétrico, mas ao contrário das técnicas eletroforéticas capilares, espera-se que o transporte intenso de massa por convecção, promovido pela vazão, seja eficiente para manter o interior do cartucho em uma faixa de temperatura aceitável. Somado ao volume percolado, existe ainda a massa do sorvente, dos frits e das paredes do cartucho que auxiliam na dissipação do calor. Dessa forma, mesmo com correntes elétricas cerca de 1000 vezes maiores que os procedimentos de CE e CEC, em E-SPE[®] é esperado uma elevação razoável da temperatura durante a aplicação do campo elétrico.

Em eletroforese, o aquecimento produzido em Joules (J) (eq. 2) é um produto da corrente elétrica (I) e do potencial elétrico (V) aplicado pelo tempo (t) [38]:

$$J = I \cdot V \cdot t \quad (\text{eq. 2})$$

O produto $I \cdot V$ representa a potência elétrica em watts (W). Portanto, quanto maiores forem os produtos das correntes com os potenciais elétricos (potência elétrica), mais calor será gerado. Como foi observado no gráfico B da Figura 3.20, essa relação também demonstrou ser aplicável para E-SPE[®].

Quando aplicamos campos elétricos em E-SPE[®] a corrente elétrica (I) (eq. 3) resultante é uma função do potencial elétrico aplicado (V) e da resistência (R) do meio de acordo com a lei de Ohm [39, 40]:

$$I = V \cdot R^{-1} \quad (\text{eq. 3})$$

A resistência elétrica do meio, por sua vez, é inversamente proporcional a condutividade elétrica da solução como foi descrito na equação 1 (página 50).

Com base nas equações 2 e 3, espera-se que soluções menos condutoras desenvolvam maiores aquecimentos quando submetidas a campos elétricos com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante e esse fato também foi observado na E-SPE® (Figura 3.19 A).

Sendo assim, a potência elétrica gerada pela fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante é tão menor quanto maior for a concentração da solução do tampão empregado. Esse comportamento seria exatamente o oposto caso o experimento fosse realizado no modo potencial elétrico constante.

Neste estudo também foi possível verificar que a vazão empregada é fundamental para reduzir a temperatura no interior do cartucho. Como foi demonstrado nos gráficos A e B da Figura 3.20, quanto maiores as vazões empregadas menores foram as temperaturas registradas. Esse resultado é explicado pelo maior volume de solução eluída por quantidade de calor gerada durante a aplicação do campo elétrico. Vale lembrar que em SPE podem ser utilizadas vazões muito superiores à máxima vazão avaliada neste estudo, o que resultaria em um aquecimento no interior do cartucho ainda menor ao observado.

Outra importante observação obtida com o estudo da vazão foi que a temperatura registrada no interior do cartucho apresentou correlação linear ($r > 0,998$) com a potência elétrica empregada para as três vazões estudadas (Figura 3.20 B). Esse resultado dá indícios de que é possível estabelecer estimativas do aquecimento sem a necessidade da utilização do sistema eletrônico com o termistor e também é uma confirmação de que esse dispositivo foi adequado nas medidas de temperatura.

A aplicação do campo elétrico pode ser realizada empregando a fonte de eletroforese no modo potencial elétrico constante ou corrente elétrica constante e, segundo os resultados da Figura 3.21, existe uma diferença significativa na potência elétrica medida empregando esses dois diferentes modos de operação.

Os resultados da Figura 3.21 demonstram que, quando usamos a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante, ocorre uma redução do valor da potência elétrica medida em relação ao valor da potência elétrica esperada. Já quando a fonte de eletroforese é utilizada no modo potencial elétrico constante, esse

desvio é positivo, no sentido de elevar a potência elétrica medida. A explicação para essas observações é que, à medida que utilizamos uma potência elétrica maior, o aumento da temperatura faz com que a viscosidade do eluato diminua e, conseqüentemente, a condutividade da solução aumente conforme descrito na equação 4 (Atkins, 2003):

$$\sigma_{T_2} = \sigma_{T_1} [1 + \alpha \cdot (T_2 - T_1)] \quad (\text{eq. 4})$$

Onde, σ_{T_2} é a condutividade final medida a temperatura T_2 , σ_{T_1} é a condutividade inicial medida a temperatura T_1 e α é o coeficiente de compensação de temperatura da solução.

No caso da fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante, o potencial elétrico medido, associado ao valor de corrente elétrica estabelecida, torna-se cada vez menor à medida que a solução é aquecida, tornando-se menos viscosa e mais condutora. Com a fonte de eletroforese empregada no modo potencial elétrico constante, esse efeito é exatamente o inverso com uma corrente elétrica cada vez maior atravessando o sistema à medida que a condutividade aumenta.

Uma importante consequência dessas diferenças é que o aquecimento no interior do cartucho será, de certo modo, melhor controlado quando a fonte de eletroforese é empregada no modo corrente elétrica constante.

3.3.6 Desenvolvimento do dispositivo de E-SPE[®] tipo “manifold” para múltiplas extrações

O desenvolvimento do “manifold” de E-SPE[®] passou pela construção de três protótipos, dos quais, os protótipos 1 e 3 são apresentados na Figura 3.22.

Esses protótipos foram desenvolvidos em peças plásticas (PTFE e acrílico) e metálicas (aço inoxidável).

Ao protótipo número 3, foi incorporado um circuito elétrico com válvulas com contatos elétricos para os eletrodos inferiores e chaves elétricas tipo liga-desliga para

acionamento do circuito elétrico, o que permitiu operar os diferentes cartuchos de forma individualizada (Figura 3.22 c1 e c5).

Os estudos de E-SPE[®] empregando os compostos modelo despenderia centenas de extrações com aplicação de campo elétrico e a realização desse grande número de extrações, uma a uma, tornaria a execução deste trabalho inviável. Como não existem sistemas comerciais disponíveis para E-SPE[®] foi preciso que um protótipo desse sistema fosse desenvolvido para viabilizar os estudos de extração com aplicação de campo elétrico.

Os elementos essenciais para que esse sistema atendesse as necessidades do projeto eram: a capacidade de realizar múltiplas extrações de forma simultânea (4 extrações) e individualizada; o controle fino da vazão através de bomba peristáltica e a possibilidade de utilizar vácuo para a etapa de secagem.

Além do sistema possuir a inovação de poder ser acoplado a uma bomba peristáltica (Figura 3.22 c2), ele também apresenta válvulas para acoplamento e direcionamento de vácuo, o que permite alterar o seu modo de operação. O sistema desenvolvido também possui a vantagem de não precisar utilizar frascos coletores de descarte nem ser aberto para troca dos mesmos, como acontece atualmente nos sistemas “manifold” comerciais. Demais detalhes do sistema fluídico e do modo operacional dos “manifold” desenvolvidos são descritos nas referências [41, 42, 43].

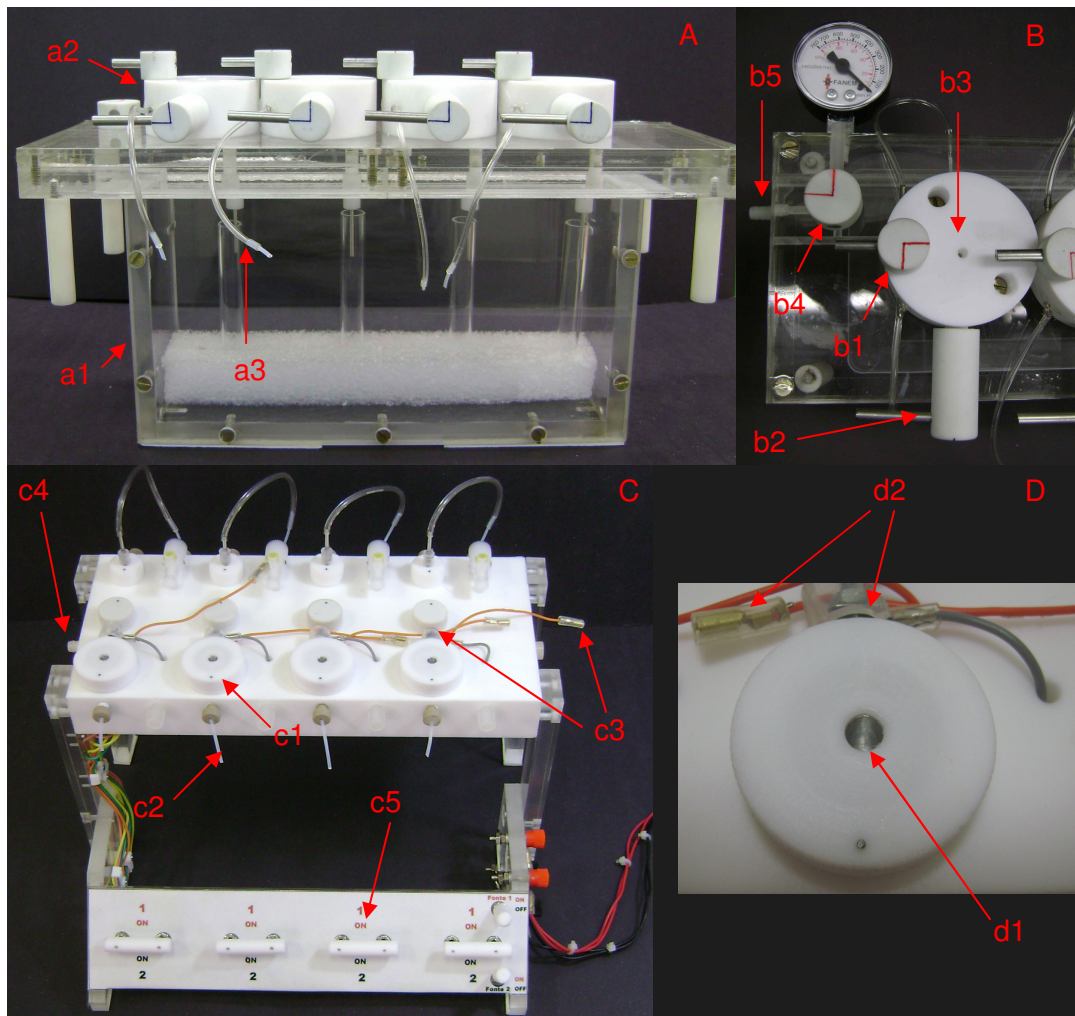


Figura 3.22. (A e C) Imagens de dois protótipos do sistema tipo “manifold” para múltiplas extrações com aplicação de campo elétrico. (B e D) Imagens ampliadas mostrando detalhes das válvulas para encaixe dos cartuchos. a1 = câmara de vácuo; a2 = válvulas para direcionamento do eluato contendo encaixe para conexão dos cartuchos; a3 = conexão para tubulação da bomba peristáltica. b1 = válvula para direcionamento do eluato; b2 = válvula para acionamento da eluição; b3 = região de encaixe do cartucho; b4 = válvula para acionamento e direcionamento do vácuo; b5 = encaixe para vácuo. c1 = válvula para encaixe do cartucho e aplicação do campo elétrico; c2 = conexão para tubulação da bomba peristáltica; c3 = contatos elétricos para os eletrodos; c4 = encaixe para vácuo; c5 = chaves elétricas para acionamento do campo elétrico. d1 = região para encaixe dos cartuchos; d2 = contatos elétricos para eletrodos.

3.4 Conclusão

O desenvolvimento dos eletrodos, assim como a maneira de acoplá-los aos cartuchos, foi fundamental para obter campos elétricos estáveis em uma faixa adequada de potencial e corrente elétrica.

O conjunto de eletrodos inferior i6 (tela de aço) e superior s9 (fio na forma de espiral) montados no cartucho tipo 3 foram escolhidos para os estudos posteriores de E-SPE[®], uma vez que, eles apresentaram correntes e potenciais elétricos estáveis e não demonstraram problemas de acúmulo de bolhas.

O emprego do sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos foi fundamental e permitiu controlar e/ou monitorar, de forma precisa, a vazão, o potencial elétrico, a corrente elétrica e a temperatura durante as extrações com aplicação de campo elétrico.

A avaliação do pH da solução eluente durante a aplicação do campo elétrico e a proposta de controle do pH através do fluxo bidirecional, mostraram-se importantes e adequadas para compreender e contornar o efeito da eletrólise do solvente sobre o sistema.

A variação da temperatura no interior do cartucho, durante a aplicação do campo elétrico, também foi avaliada e demonstrou estar dentro de uma faixa normalmente encontrada nos sistemas cromatográficos e eletroforéticos convencionais. A elevação da temperatura demonstrou ser fortemente influenciada pela vazão, concentração de eletrólitos na solução eluente, pelo modo de utilização da fonte de eletroforese e, principalmente, pela potência elétrica empregada.

Somado aos desenvolvimentos anteriores, um sistema “manifold” para múltiplas extrações aplicando campos elétricos foi construído. Esse sistema foi empregado nos estudos de E-SPE[®] com os compostos modelo e permitiu executar de forma eficiente e, em tempo hábil, as extrações com aplicação de campos elétricos.

CAPÍTULO IV – APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM EXTRAÇÕES EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS MODELO ANIÔNICOS E CATIÔNICO

4.1 Considerações gerais

Depois do desenvolvimento dos eletrodos, a E-SPE[®] foi empregada em procedimentos de extração para avaliar o efeito do campo elétrico sobre a recuperação de compostos modelo iônicos.

Em E-SPE[®], o uso do campo elétrico pode ser utilizado, principalmente, durante as etapas de aplicação da amostra, lavagem e eluição com o objetivo de obter melhores eficiências de extração e/ou uma remoção mais efetiva de interferentes em comparação a SPE convencional. Exemplos de alguns modos de utilização da E-SPE[®] são apresentados na Figura 4.1.

A SPE convencional é um processo exclusivamente cromatográfico onde dois mecanismos de transporte de massa são responsáveis pela movimentação dos analitos no interior do cartucho: a difusão decorrente dos gradientes de concentração e a convecção, promovida pelos sistemas de propulsão de solvente, como por exemplo os sistemas de vácuo [16, 17, 19]. A difusão é o principal processo de transferência de massa intra-partícula, ou seja, do analito em solução para o interior dos poros do sorvente e vice-versa. Já a convecção está envolvida nos movimentos inter-partícula dos analitos. Esses fenômenos, associados ao processo de sorção seletiva na superfície da sílica e sílica modificada, promovem a extração e a purificação dos analitos de interesse [19].

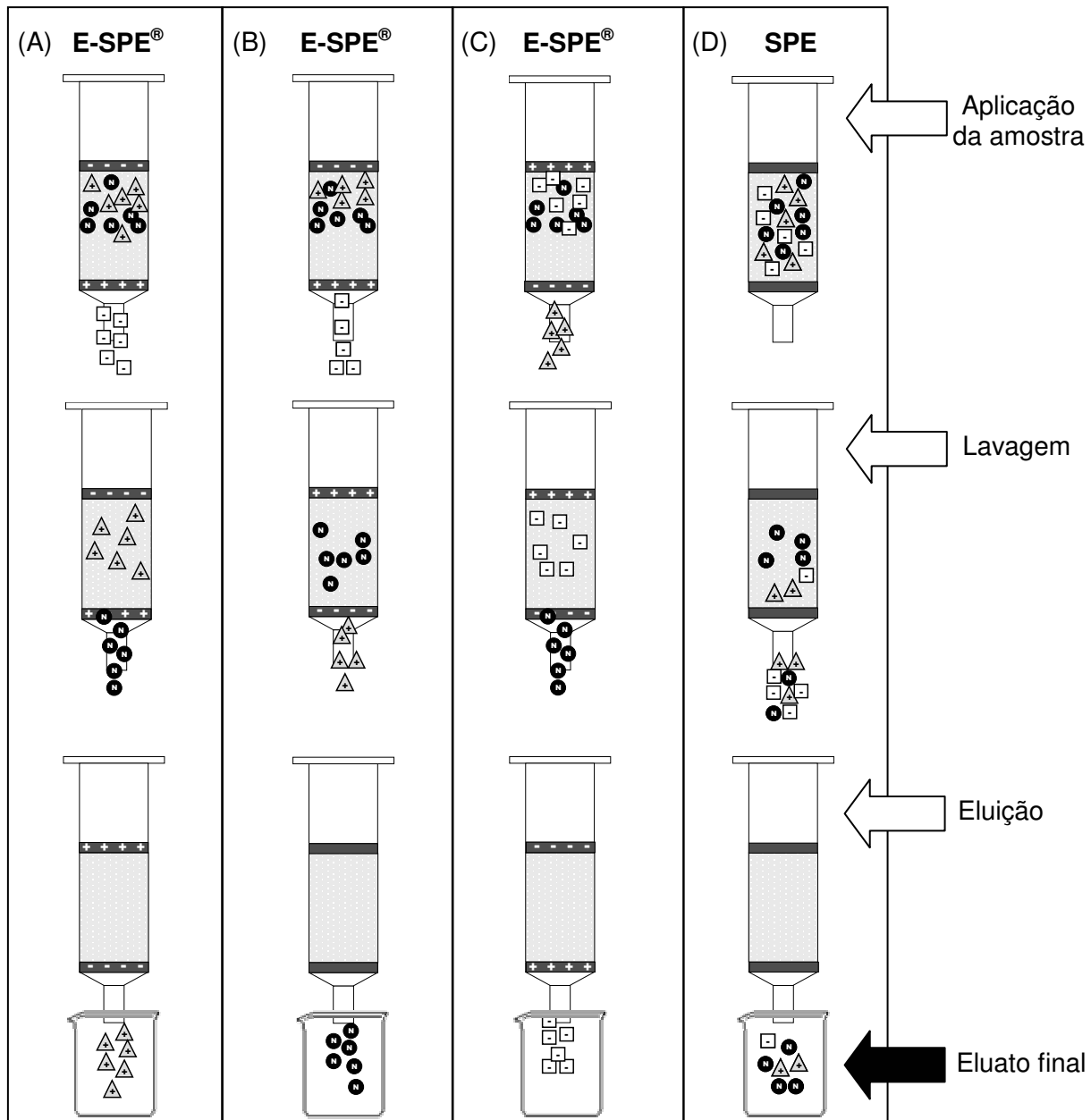


Figura 4.1. Exemplos dos efeitos esperados de alguns dos possíveis modos de utilização da E-SPE[®] (A), (B) e (C), sobre a eficiência e a seletividade da extração, em comparação a SPE convencional (D). Sinais “+” e “-” sobre os frits indicam as polaridades positivas e negativas dos eletrodos, respectivamente. Note que o campo elétrico pode ser usado tanto para favorecer como para reduzir a saída dos compostos iônicos do cartucho.

Em E-SPE[®], a remoção dos interferentes assim, como a melhora na recuperação dos analitos é obtida pela ação conjunta dos mecanismos cromatográficos e eletroforéticos (Figura 4.2).

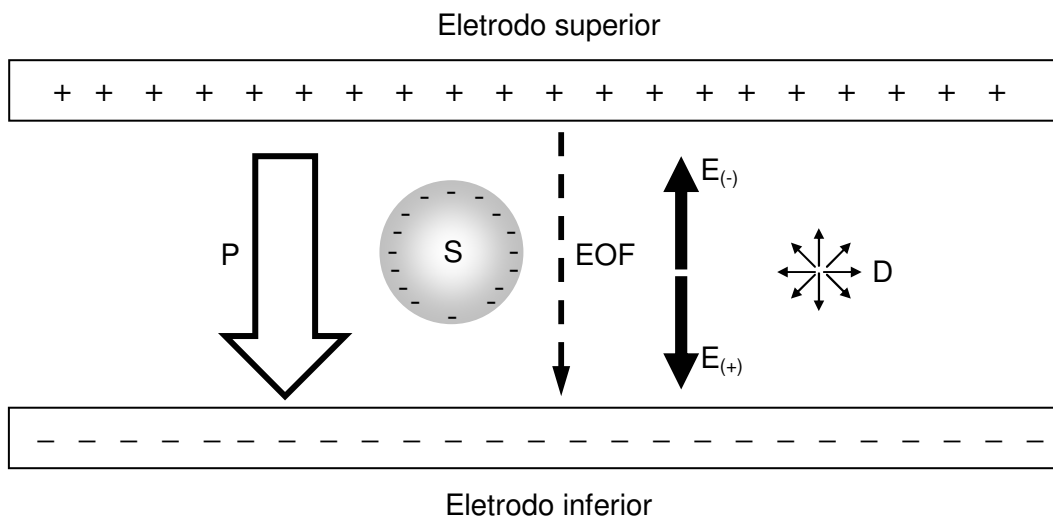


Figura 4.2. Esquema representando os fenômenos de transporte de massa envolvidos nos procedimentos de E-SPE[®], empregando sorventes (S) com cargas negativas residuais em sua superfície (i.e. sorvente a base de sílica). D = difusão; P = transporte convectivo por diferença de pressão; EOF = fluxo eletrosmótico; $E_{(-)}$ = eletromigração de composto aniônicos; $E_{(+)}$ = eletromigração de composto catiônicos.

O fluxo eletrosmótico (EOF^i), assim como a eletromigração, podem ser empregados para forçar os interferentes a sair e/ou forçar os analitos a permanecer no interior do cartucho. Os solutos irão eluir mais rapidamente, ou mais lentamente, para fora do cartucho dependendo da intensidade e da direção em que o fluxo eletrosmótico e a eletromigração estiverem atuando.

A direção do fluxo eletrosmótico, assim como da eletromigração são facilmente invertidos pela mudança da polaridade dos eletrodos e, dessa forma, ambos podem ser empregados para obter maior remoção de interferentes e melhores recuperações durante o processo de extração.

Um terceiro fenômeno, chamado de polarização de concentração induzida por campo elétrico (CP)ⁱⁱ, também pode estar envolvido nos processos de E-SPE[®]. Esse fenômeno consiste na mobilização de íons, ou para o interior (concentração), ou para o exterior (exclusão ou depleção) de partículas porosas em decorrência da aplicação de campos elétricos [44]. No fenômeno de CP os coíons, íons com a mesma carga

ⁱEOF, do inglês *electroosmotic flow*; ⁱⁱCP, do inglês *electrical field-induced concentration polarization*

predominantemente encontrada na superfície da partícula, são excluídos do interior dos poros, enquanto que os contra-íons, íons com carga oposta à predominantemente encontrada na superfície da partícula, são seletivamente concentrados no interior dos poros (Figura 4.3). Para que ocorra esse fenômeno é preciso que o material apresente um certo grau de sobreposição das duplas camadas elétricas [44].

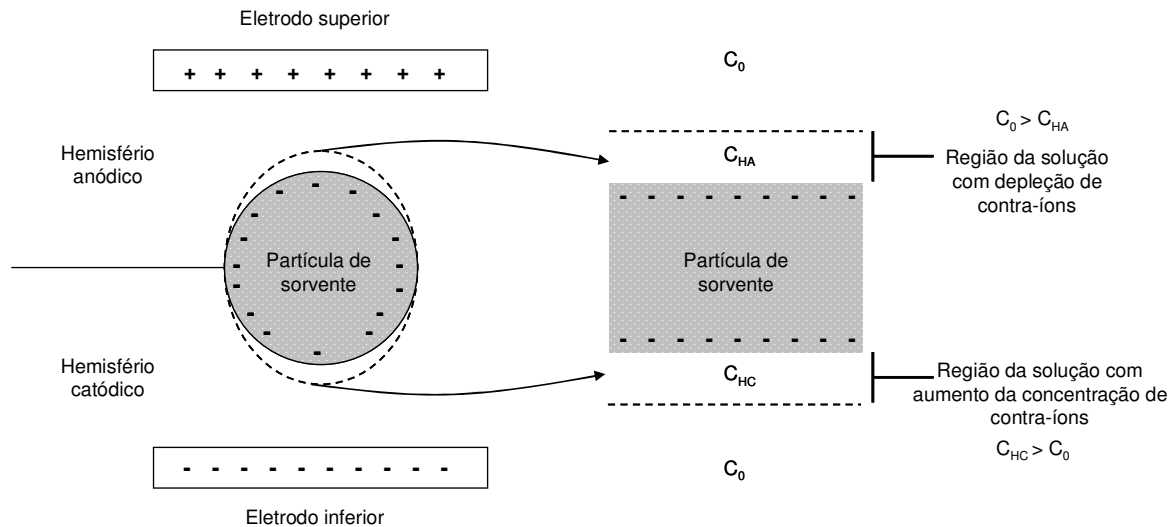


Figura 4.3. Esquema representando o efeito da polarização de concentração induzida por campo elétrico (CP). C_0 = concentração do contra-íon na solução; C_{HA} = concentração do contra-íon na região do hemisfério anódico; C_{HC} = concentração do contra-íon na região do hemisfério catódico. Baseado no artigo de Nischang *et al.*, 2006 [44].

O efeito da CP sobre o processo de sorção é a formação de regiões iônicas seletivas no interior dos poros das partículas que modificam os coeficientes de distribuição analito-sorvente nestes locais, durante a aplicação do campo elétrico. A CP é, basicamente, dependente do pH do meio, da concentração iônica da solução, da densidade de cargas na superfície da partícula, do grau de sobreposição da dupla camada elétrica e do campo elétrico aplicado [44].

Em todos os parâmetros de extração avaliados, tanto os fenômenos de transporte de massa como os de sorção descritos acima devem contribuir para os valores de recuperações obtidos e, por esse motivo, os resultados destes estudos serão discutidos separadamente.

Neste capítulo os fenômenos da E-SPE[®] foram avaliados inicialmente para os corantes de alimentos aniônicos amarelo tartrazina (E 102), amaranato (E 123), amarelo crepúsculo (E 110), vermelho 40 (E 129), verde rápido (E 143) e eritrosina (E 127) (Figura 4.4).

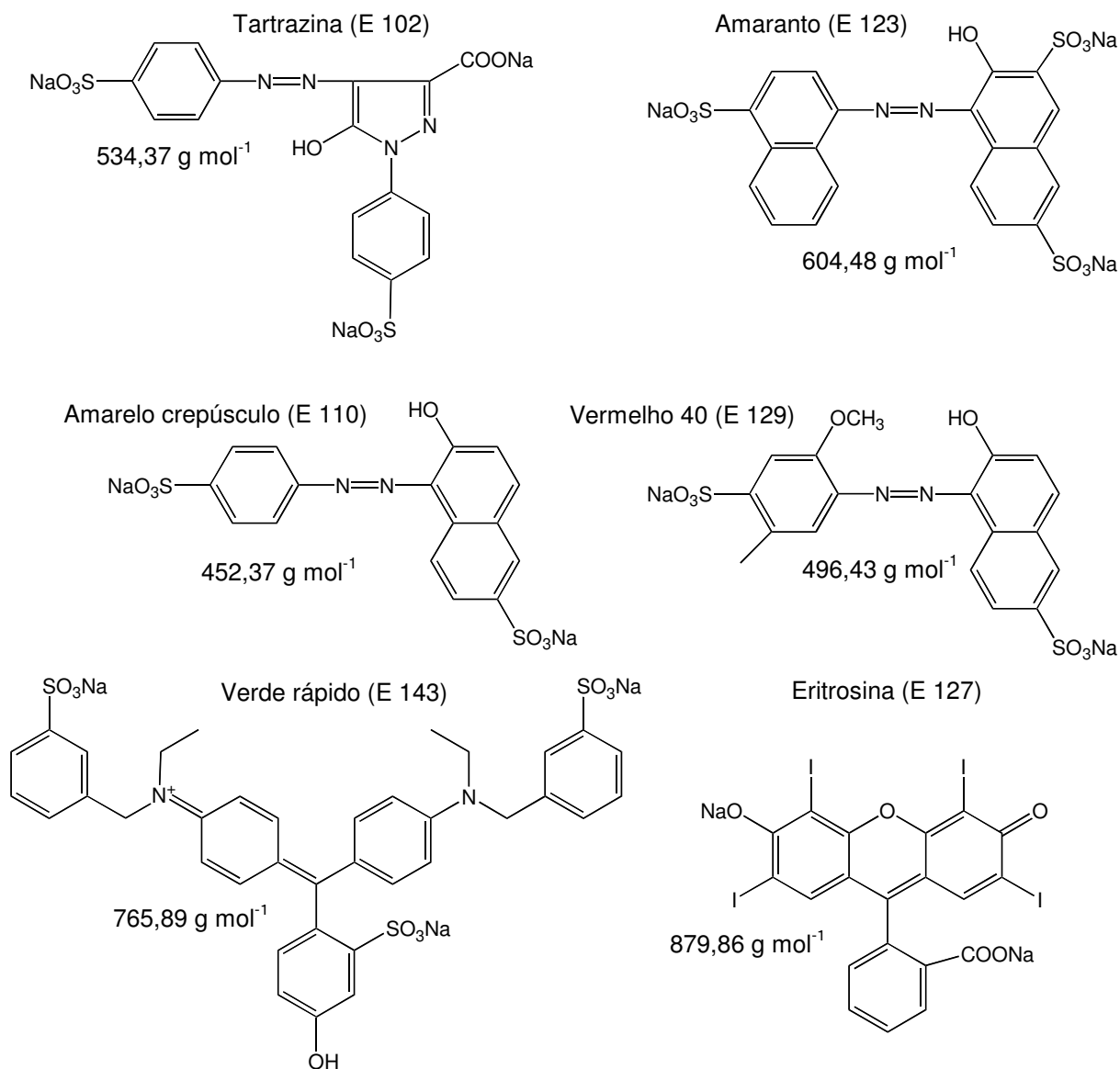


Figura 4.4. Estrutura química dos corantes aniônicos empregados nos estudos de extração e suas respectivas massas molares.

Todos esses corantes, dependendo das características físico-químicas do meio, podem apresentar carga e, por isso, são amplamente estudados por técnicas

eletroforéticas [45-51]. Esses compostos também apresentam retenção adequada em sorventes à base de sílica-C18, como foi demonstrado nos métodos cromatográficos empregando esse tipo de sorvente [52-57].

O segundo grupo de experimentos foi realizado com o corante catiônico safranina (SAF) (Figura 4.5).

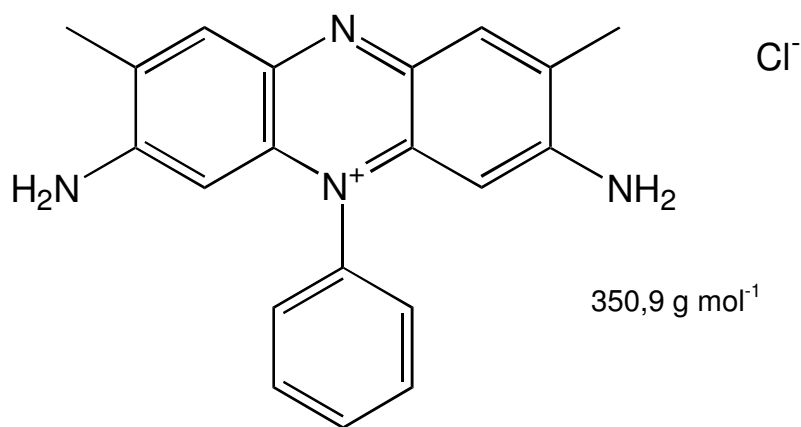


Figura 4.5. Estrutura química do corante catiônico safranina empregado nos estudos de extração e sua respectiva massa molar.

O composto catiônico SAF é largamente empregado como corante biológico de ácidos nucleicos em histologia e citologia [58]. Não foram encontrados métodos de análise para este composto por CE ou mesmo por HPLC, uma vez que, de modo geral, a determinação de SAF é realizada por espectrofotometria no visível [59-61].

Compostos catiônicos, especialmente aqueles com amina quaternária em sua estrutura, apresentam uma forte interação eletrostática por grupos silanóis de sorventes a base de sílica [17, 62]. A estratégia para reduzir essa interação é empregar um composto auxiliar que interage preferencialmente com os silanóis, como, por exemplo, o brometo de cetiltrimetil amônio. Esse composto tem sido amplamente utilizado em CE para anular ou mesmo inverter o fluxo eletrosmótico [63, 64]. Dada essa característica dos compostos catiônicos optou-se por trabalhar com um único modelo ao invés de empregar multi-compostos, como ocorreu para os modelos aniônicos.

4.2 Parte experimental

4.2.1 Reagentes e solventes

- Ácido cítrico (Merck, Brasil), cloreto de sódio (Merck, Brasil), fosfato de amônio bibásico (Qeel, Brasil), cloreto de sódio (Merck, Brasil), dodecilsulfato de sódio (Merck, Brasil), ácido fórmico (Nuclear, Brasil) e brometo de cetiltrimetil amônio (Riedel-de-Haën-Sigma-Aldrich, Alemanha), todos com grau de pureza analítico ou superior.
- Solventes: metanol (Tedia, Brasil), 2-propanol, acetonitrila, tetraidrofurano (J.T.Baker, EUA), todos com grau HPLC de pureza.
- Corantes aniônicos: amarelo tartrazina, amarantho, amarelo crepúsculo e vermelho 40 todos Sigma-Aldrich (EUA) e apresentando pureza superior a 80%; verde rápido e eritrosina ambos da marca Vetec (Brasil) e com purezas de 85% e >90%, respectivamente.
- Corante catiônico safranina com 95% de pureza (Vetec, Brasil).
- Sorvente de sílica-C18 para SPE das marcas: Phenomenex (Septra C18-E, 65 Å x 50 µm), Varian (Bond Elut C18, 72 Å x 57 µm) e Applied Separations (C18/18, 60 Å x 40 µm) todos provenientes dos EUA.
- Sorvente a base de copolímero n-vinilpirrolidona-divinilbenzeno da marca Waters (OASIS HLB, 85 Å x 29,3 µm) (EUA).

4.2.2 Material

- Cartuchos para SPE de polipropileno com capacidade de 6 mL da marca Varian (EUA).
- Filtro de PTFE (politetrafluoretileno) sinterizado (frit) de 20 µm de poro para cartuchos de SPE de 6 mL da marca Varian (EUA).
- Tela de aço inoxidável de 80 mesh (diâmetro do fio de 0,080 mm e abertura da malha de 0,131 mm) (Steelmesh, Brasil).

- Fio de aço inoxidável de 0,35 mm de diâmetro (Steelmesh, Brasil).
- Filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22 μm x 13 mm (Millipore, Brasil).
- Colunas cromatográficas analítica e de guarda, de fase reversa a base de sílica-C18 PurospherStar[®] (50 x 4 mm) (10 x 4 mm), ambas com partículas de 3,0 μm (Merck, Alemanha).
- Colunas cromatográficas analítica e de guarda, de fase reversa a base de sílica híbrida quimicamente ligada com grupos C18 X-Bridge[®] (150 x 4,6 mm) (20 x 4,6 mm), ambas com partículas de 3,5 μm (Waters, EUA).

4.2.3 Equipamentos

- Bomba peristáltica da marca Gilson modelo Minipuls Evolution (França).
- Fonte estabilizada de alta tensão para eletroforese, Fisher-Scientific, modelo FISH-FB3000Q (Malásia).
- Balança analítica Precisa, modelo XT 220A (Suíça).
- Purificador de água Millipore, modelo Milli-Q Academic (EUA).
- pH-metro Digimed, modelo DM-22 empregando um eletrodo de vidro combinado (Brasil).
- Condutivímetro Digimed, modelo DM-32 (Brasil).
- Multímetros Protek, modelo 506 com saída RS-232 (Coréia do Sul).
- Microcomputador Pentium (Intel, EUA) contendo: sistema operacional Microsoft Windows 95 (EUA), programa de aquisição de dados escrito em Visual Basic 3.0 da Microsoft (EUA), duas entradas RS-232 e uma interface de comunicação paralela.
- Interface de comunicação paralela Advantec, modelo 711-S (EUA) contendo um conversor analógico digital de 12 bits, 16 entradas e 16 saídas TTL (transistor-transistor-logic).
- Microcomputador Pentium 4 (Intel, EUA) contendo: sistema operacional Microsoft Windows XP (EUA), programas de processamento de dados Origin versão 6.1 (EUA) e Microsoft Excel 2003 (EUA).

- Sistema de análise constituído por: (1) cromatógrafo à líquido de alta eficiência da marca Waters (EUA), modelo 1525, composto por um sistema de bombeamento binário, injetor Rheodyne (EUA) modelo 7725, com amostradores ou de 5 ou de 10 μL ; (2) detector espectrofotométrico de arranjo de diodos Waters (EUA) modelo 2475; (3) microcomputador Pentium III (Intel, EUA) com software controlador Millennium³² da marca Waters (EUA).

4.2.4 Procedimentos

A) Modelos aniônicos: ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas

O ajuste das condições cromatográficas para os compostos modelo aniônicos foi realizado empregando uma mistura dos corantes amarelo tartrazina (E 102), amarantho (E 123), amarelo crepúsculo (E 110), vermelho 40 (E 129), verde rápido (E 143) e eritrosina (E 127) (Código “E” da União Européia e recomendado pelo Codex Alimentarius para aditivos alimentares).

Para os estudos com os modelos aniônicos, foi preparada uma solução com os seis corantes na concentração de 1 mg mL^{-1} em metanol:água (1:1, v/v) (solução estoque). As demais soluções utilizadas (soluções de trabalho) foram sempre obtidas pela diluição adequada da solução estoque. Todas as soluções aquosas foram preparadas empregando água purificada obtida no sistema Milli-Q.

A separação cromatográfica desses compostos foi realizada utilizando uma coluna de sílica-C18 PurospherStar[®] (50 x 4 mm, 3,0 µm) acoplada a coluna de guarda também de sílica-C18 PurospherStar[®] (10 x 4 mm, 3,0 µm). A otimização da separação cromatográfica dos corantes foi realizada variando a temperatura, concentração e tipo de sais na fase aquosa, vazão e quantidade de modificador orgânico da fase móvel, tanto nos modos isocrático como de gradiente de eluição. Nestes estudos foram utilizadas soluções de trabalho na concentração de 4,0 µg mL⁻¹ de cada corante, preparadas em metanol:água (1:1, v/v) e volumes de 5 µL dessas soluções foram injetados no sistema cromatográfico.

A detecção foi realizada empregando detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD)ⁱ nos comprimentos de máxima absorção no visível dos respectivos corantes: E 102 a 428 nm; E 123 a 524 nm; E 110 a 486 nm; E 129 a 506 nm; E 143 a 620 nm e E 127 a 530 nm.

Após o estabelecimento das condições cromatográficas foram preparadas soluções com a mistura dos corantes acima citados nas concentrações de 0,40; 0,80; 4,0; 8,0 e 9,6 µg mL⁻¹. Essas soluções foram preparadas em fase móvel e 5 µL foram injetados na coluna cromatográfica nas condições otimizadas.

Para as curvas analíticas, os valores das áreas dos picos obtidos das concentrações de cada corante foram inseridos em gráficos de concentração versus área para obtenção da equação da reta correspondente e do coeficiente de correlação linear (*r*) através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para esses cálculos foram utilizados os programas estatísticos Origin 6.1 ou Excel 2003.

B) Modelos aniônicos: condições gerais empregadas na avaliação dos parâmetros de extração

Para as extrações dos modelos aniônicos empregou-se o cartucho tipo 1 com o eletrodo inferior i6 e superior s9, descritos na secção 3.2.4 B (página 26), além do

82 ⁱDAD, do inglês *diode array detector*

sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos descrito na secção 3.2.4 A.

Todos os estudos de extração dos corantes aniônicos empregaram, durante a etapa de lavagem, a configuração de fluxo bidirecional descrito na secção 3.2.4 D, para um controle adicional do pH do meio e, portanto, os cartuchos foram montados como descrito naquela secção. Durante a etapa de lavagem, o fluxo bidirecional foi empregado com vazão de entrada duas vezes superior à vazão de saída.

O condicionamento dos cartuchos foi realizado aplicando na sequência: 2 mL de metanol, 2 mL de água e finalmente 2 mL de tampão em pH igual ao da solução da mistura dos corantes para o respectivo estudo. Na etapa de condicionamento foi utilizada vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Após a lavagem, a eluição dos corantes aniônicos extraídos foi realizada utilizando 5 mL de uma solução de dodecilsulfato de sódio 0,1% (m/v) em metanol com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Em todos os experimentos de extração, o volume do eluato final coletado foi completado em balão de 20 mL com solução de fosfato de amônio 10 mmol L^{-1} e, dessa forma, a concentração teórica final de cada corante foi de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Anterior à análise cromatográfica, as soluções foram filtradas com filtros de $0,22 \mu\text{m} \times 13 \text{ mm}$.

Com exceção dos estudos 4.2.4 (I) e 4.2.4 (J), onde foram empregados diferentes massas e tipos de materiais sorventes, todos os demais experimentos empregando os corantes aniônicos foram realizados com 500 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex.

Os estudos de SPE e E-SPE[®] empregaram sistemas tampão compostos pela mistura de soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico. Esses tampões foram preparados pela mistura de volumes adequados dessas duas soluções até a obtenção do pH desejado para os respectivos estudos. Os tampões receberam as seguintes denominações:

- tampão ACF 5/10, composto de ácido cítrico 5 mmol L^{-1} e fosfato de sódio bibásico 10 mmol L^{-1} ;
- tampão ACF 10/20, composto de ácido cítrico 10 mmol L^{-1} e fosfato de sódio bibásico 20 mmol L^{-1} ;

- tampão ACF 20/40, composto de ácido cítrico 20 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 40 mmol L⁻¹;

- tampão ACF 100/200, composto de ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 200 mmol L⁻¹.

Para cada condição dos parâmetros avaliados foram realizadas seis extrações: duas sem aplicação do campo elétrico SPE (-■-), duas com o eletrodo superior como cátodo e eletrodo inferior como ânodo E-SPE[®]_(-/+) (-●-), além de duas extrações com o eletrodo superior como ânodo e eletrodo inferior como cátodo E-SPE[®]_(+/-) (-▲-). Dessa forma, os resultados que serão apresentados correspondem à média de dois valores (n = 2). A cada extração foi utilizado um cartucho novo.

Empregando as condições acima, foram avaliados os parâmetros de extração descritos a seguir.

C) Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de modificador orgânico empregado na solução de lavagem

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de 80 µg mL⁻¹ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 20% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas nos cartuchos e, então, foi realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 10 mL das soluções tampão ACF 20/40, pH 4,0, contendo as seguintes porcentagens de metanol (v/v):

- 6% (condutividade da solução final: 1,791 mS cm⁻¹);
- 8% (condutividade da solução final: 1,785 mS cm⁻¹);
- 12% (condutividade da solução final: 1,659 mS cm⁻¹);
- 16% (condutividade da solução final: 1,533 mS cm⁻¹);
- 18% (condutividade da solução final: 1,299 mS cm⁻¹).

A etapa de lavagem foi realizada em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 7 mA.

D) Modelos aniônicos: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas nos cartuchos e, então, foi realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 10 mL das seguintes soluções ACF, pH 4,0, preparadas em diferentes concentrações e todas contendo 7% (v/v) de metanol:

- ACF 20/40 (condutividade da solução final: $1,546 \text{ mS cm}^{-1}$);
- ACF 10/20 (condutividade da solução final: $0,945 \text{ mS cm}^{-1}$);
- ACF 5/10 (condutividade da solução final: $0,465 \text{ mS cm}^{-1}$);

A etapa de lavagem foi realizada em vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

E) Modelos aniônicos: avaliação do pH do tampão empregado na solução de lavagem

Nesta avaliação foram realizados estudos com dois grupos distintos de solução tampão de lavagem: E.1) solução tampão ACF sem ajuste da condutividade e E.2) solução tampão ACF com ajuste da condutividade.

E.1) Tampão sem ajuste da condutividade

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200 nos pH 2,8; 4,0 e 6,5; todas contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol.

Para o condicionamento dos cartuchos foram empregados 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água deionizada e por fim 2 mL de tampão ACF 100/200 em pH adequado para o respectivo estudo (pH: 2,8; 4,0 e 6,5).

Após o condicionamento, frações de 1 mL das soluções dos corantes foram introduzidas nos cartuchos e, então, foi realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 10 mL de diferentes tampões ACF 10/20, todos contendo 7% (v/v) de metanol e preparados nos seguintes pH:

- pH 2,8 (condutividade da solução final: $0,721 \text{ mS cm}^{-1}$);
- pH 4,0 (condutividade da solução final: $1,113 \text{ mS cm}^{-1}$);
- pH 6,5 (condutividade da solução final: $2,171 \text{ mS cm}^{-1}$).

A etapa de lavagem foi realizada em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

E.2) Tampão com ajuste da condutividade

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200 em pH 2,8; 4,0 e 6,5, todas contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol.

Para o condicionamento dos cartuchos foram empregados 2 mL de metanol seguidos de 2 mL de água deionizada e por fim 2 mL do tampão ACF 100/200 em pH adequado para o respectivo estudo (pH: 2,8; 4,0 e 6,5).

Após o condicionamento, frações de 1 mL das soluções dos corantes foram introduzidas nos cartuchos e, então, foi realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 10 mL de diferentes tampões ACF 10/20, todos contendo 7% (v/v) de metanol e preparados nos seguintes pH:

- pH 3,0 (condutividade da solução final: 3,268 mS cm⁻¹);
- pH 4,0 (condutividade da solução final: 3,268 mS cm⁻¹);
- pH 6,0 (condutividade da solução final: 3,268 mS cm⁻¹);
- pH 8,0 (condutividade da solução final: 3,268 mS cm⁻¹).

Essas soluções tiveram suas condutividades ajustadas pela adição de pequenas quantidades de solução aquosa de NaCl 25% (m/v). A etapa de lavagem foi realizada em vazão de 1,5 mL min⁻¹ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 20 mA.

F) Modelos aniônicos: avaliação da corrente elétrica aplicada na etapa de lavagem

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de 80 µg mL⁻¹ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 20% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas nos cartuchos e, então, foi realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 10 mL da solução tampão ACF 20/40, pH 4,0, adicionados de 16% (v/v) de metanol (condutividade da solução final: 1,533 mS cm⁻¹). Esta etapa foi realizada em vazão de 1,5 mL min⁻¹ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 12, 18 e 24 mA.

G) Modelos aniônicos: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0 contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas nos cartuchos e, em seguida, iniciada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foi avaliado o emprego de 5, 10 e 15 mL da solução tampão ACF 10/20, pH 4,0, adicionados de 7% (v/v) de metanol (condutividade da solução final: $1,113 \text{ mS cm}^{-1}$). Esta etapa foi realizada em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

H) Modelos aniônicos: avaliação da vazão empregada na etapa de lavagem

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas no cartucho e, em seguida, iniciada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 10 mL da solução preparada pela mistura de tampão ACF 20/40, pH 4,0, adicionado de 7% (v/v) de metanol (condutividade da solução final: $1,546 \text{ mS cm}^{-1}$). Nesta etapa foram avaliadas vazões de 0,5; 0,75 e $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

I) Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de sorvente empregada no preparo do cartucho

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0 contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas nos cartuchos e, então, realizada a etapa de lavagem. Neste estudo foram utilizados cartuchos de 6 mL recheados com 300, 500 e 800 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex.

Na etapa de lavagem foram utilizados 5 mL da solução tampão ACF 10/20, pH 4,0, adicionado de 10% (v/v) de metanol (condutividade da solução final: $0,886 \text{ mS cm}^{-1}$).

A etapa de lavagem foi realizada em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

J) Modelos aniônicos: avaliação do material sorvente empregado no preparo do cartucho

Para esta avaliação foi utilizada uma solução de trabalho composta pela mistura dos corantes aniônicos: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada corante, preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas nos cartuchos e, então, realizada a etapa de lavagem.

Neste estudo foram utilizados cartuchos de 6 mL recheados com os seguintes sorventes:

- 500 mg de sílica-C18 Septra C18-E da marca Phenomenex.
- 500 mg de sílica-C18 BondElut da marca Varian.

- 500 mg de sílica-C18 da marca Applied Separations.
- 400 mg do sorvente polimérico HLB OASIS da marca Waters.

Na etapa de lavagem foram utilizados 5 mL da solução tampão ACF 10/20, pH 4,0, adicionados de 10% (v/v) de metanol (condutividade da solução final: 0,886 mS cm⁻¹). Esta etapa foi realizada em vazão de 1,0 mL min⁻¹ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

K) Modelo catiônico: ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas

Para os estudos com o modelo catiônico SAF, foi preparada uma solução do corante na concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol (solução estoque). As demais soluções utilizadas (soluções de trabalho) foram obtidas pela diluição adequada da solução estoque. Todas as soluções aquosas foram preparadas empregando água purificada obtida no sistema Milli-Q.

Neste estudo foi preparada uma solução de SAF na concentração de 5 µg mL⁻¹ em metanol:água (1:1, v/v) e 10 µL foram injetados na coluna cromatográfica.

Para a otimização da separação foi utilizada uma coluna de fase reversa a base de sílica híbrida quimicamente ligada com grupos C18, X-Bridge[®] (150 x 4,6 mm) acoplada com uma coluna de guarda X-Bridge[®] C18 (20 x 4,6 mm), ambas com partículas de 3,5 µm.

A otimização da separação foi realizada variando a temperatura, concentração e tipo de sais na fase aquosa, vazão e quantidade de modificador orgânico da fase móvel, tanto nos modos isocrático como de gradiente de eluição.

A detecção foi realizada empregando detector DAD no comprimento de máxima absorção no visível do corante SAF (526 nm).

Após o estabelecimento das condições cromatográficas foram preparadas soluções do corante SAF nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 µg mL⁻¹. Essas soluções foram preparadas em fase móvel e 10 µL foram injetados na coluna

cromatográfica nas condições otimizadas.

Para as curvas analíticas, os valores das áreas do pico do corante SAF obtidos das concentrações analisadas foram plotados em gráficos de concentração versus área para obtenção da equação da reta correspondente e do coeficiente de correlação linear (r), através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para esses cálculos foram utilizados os programas estatísticos Origin 6.1 ou Excel 2003.

L) Modelo catiônico: condições gerais empregadas na avaliação dos parâmetros de extração

Para as extrações do modelo catiônico foi empregado o cartucho tipo 1 com o eletrodo inferior i6 e superior s9 descritos na secção 3.2.4 B (página 26), além do sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos descrito na secção 3.2.4 A.

Todos os estudos de extração empregaram, durante a etapa de lavagem, o conceito do fluxo bidirecional descrito na secção 3.2.4 D para um controle adicional do pH do meio e, portanto, os cartuchos foram montados como descrito naquela secção. Durante a etapa de lavagem, o fluxo bidirecional foi empregado com vazão de entrada duas vezes superior à vazão de saída.

O condicionamento dos cartuchos foi realizado aplicando na sequência: 2 mL de brometo de cetiltrimetilamônio 0,1% (m/v) em metanol, 2 mL de água deionizada e finalmente, 2 mL de tampão, em pH 4,0. Na etapa de condicionamento foi utilizada vazão de 1,5 mL min⁻¹.

Após a lavagem, a eluição da SAF foi realizada utilizando 5 mL de uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio 0,5% (m/v) em metanol:acetonitrila (1:1, v/v) empregando vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Em todos os experimentos de extração o eluato coletado foi avolumado em balão volumétrico de 10 mL com água deionizada e, dessa forma, a concentração

teórica final do corante SAF foi de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Anterior à análise cromatográfica, as soluções foram filtradas com filtros de $0,22 \mu\text{m} \times 13 \text{ mm}$.

Os estudos de SPE e E-SPE[®] com a SAF empregaram sistemas tampões compostos pela mistura de soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico. Esses tampões foram preparados pela mistura de volumes adequados dessas duas soluções até a obtenção do pH desejado para os respectivos estudos. Os tampões receberam as seguintes denominações: tampão ACF 5/10; tampão ACF 10/20; tampão ACF 20/40 e tampão ACF 100/200, e foram preparados conforme descrito no item 4.2.4 B (página 77).

Para cada condição dos parâmetros avaliados foram realizadas seis extrações: duas sem aplicação do campo elétrico SPE (-■-), duas com o eletrodo superior como cátodo e eletrodo inferior como ânodo E-SPE[®]_{(-/+) (-●-), além de duas extrações com o eletrodo superior como ânodo e eletrodo inferior como cátodo E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-). Dessa forma, os resultados que serão apresentados correspondem à média de dois valores ($n = 2$). A cada extração foi utilizando um cartucho novo recheados com 500 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex.}}

Empregando as condições acima, foram avaliados os parâmetros de extração descritos a seguir.

M) Modelo catiônico: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem

Para esta avaliação foi preparada uma solução de trabalho do corante SAF na concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl, 10% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de 2-propanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas no cartucho e, então, realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foram utilizados 5 mL das seguintes soluções ACF, pH 4,0, preparadas em diferentes concentrações e todas contendo 35% (v/v) de 2-propanol:

- ACF 20/40 (condutividade da solução final: $0,597 \text{ mS cm}^{-1}$);
- ACF 10/20 (condutividade da solução final: $0,319 \text{ mS cm}^{-1}$);
- ACF 5/10 (condutividade da solução final: $0,168 \text{ mS cm}^{-1}$);

A etapa de lavagem foi realizada em vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

N) Modelo catiônico: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem

Para esta avaliação foi preparada uma solução de trabalho do corante SAF na concentração de $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl, 10% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de 2-propanol. Após o condicionamento, frações de 1 mL dessa solução foram introduzidas no cartucho e, então, realizada a etapa de lavagem.

Na etapa de lavagem foi avaliado o emprego de 3, 5 e 10 mL da solução tampão ACF 10/20, pH 4,0, adicionados de 35% (v/v) de 2-propanol (condutividade da solução final: $0,319 \text{ mS cm}^{-1}$). Esta etapa foi realizada em vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ com e sem a aplicação de campo elétrico. O campo elétrico foi aplicado com a fonte de eletroforese operando no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

4.3 Resultados e discussão

Para os primeiros estudos de E-SPE[®] foram selecionados seis corantes aniônicos de alimentos e um corante histoquímico catiônico que apresentam migração eletroforética significativa e afinidade adequada com o sorvente a base de sílica-C18. Corantes demonstram uma grande vantagem que é a capacidade de visualização “*in loco*” dos efeitos eletroforéticos, o que pode ajudar a direcionar os experimentos futuros e, ainda, revelar comportamentos não completamente conhecidos ou não esperados. Para avaliar com precisão o efeito do campo elétrico no processo de eluição desses corantes, os mesmos foram estudados em soluções livres de interferentes, porém tão desfavoráveis, em termos de condutividade, quanto as matrizes biológicas complexas. Dessa forma, para os estudos de extração foram empregadas soluções dos corantes, todas contendo 0,9% (m/v) de NaCl como matriz de estudo.

Nos estudos de extração foi escolhido utilizar sistemas tamponantes baseados nos tampões McIlvaine que são constituídos por misturas de soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico. Tampões McIlvaine possuem uma extensa e eficiente faixa tamponante e são largamente empregados em extrações em fase sólida em matrizes complexas como amostras biológicas e de alimentos [65].

Os estudos empregando os compostos modelo foram realizados empregando a SPE convencional (sem aplicação de campo elétrico) e com aplicação de campo elétrico (E-SPE[®]). Nestes estudos os eletrodos dos cartuchos foram avaliados em ambas as polaridades possíveis (eletrodo superior como cátodo ou ânodo) com o objetivo de ora tentar promover a maior permanência dos compostos no interior do cartucho e ora tentar facilitar a sua saída. O campo elétrico foi empregado sempre na etapa de lavagem, que é considerada, em muitos casos, o ponto crítico para obtenção de um eluato livre de interferentes sem que haja a perda significativa dos analitos.

Os valores de recuperação apresentados em todos os estudos de E-SPE[®] referem-se aos valores encontrados nos eluatos finais da extração. Esses valores foram obtido pela fórmula:

$$\text{(concentração encontrada/concentração esperada) } \times 100$$

Finalmente, neste grupo de experimentos, a fonte de eletroforese foi empregada no modo corrente elétrica constante uma vez que ficou demonstrado na secção 3.3.5 do capítulo 3 que essa abordagem é mais adequada para evitar um aquecimento excessivo no interior do cartucho.

4.3.1 Modelos aniônicos: condições cromatográficas e construção das curvas analíticas

Para a quantificação dos compostos modelo foi utilizada a técnica de HPLC-DAD, uma vez que, a separação cromatográfica e os espectros ultravioleta e visível poderiam dar indícios da degradação dos corantes devido ao potencial e a corrente elétrica empregados.

Após a otimização dos parâmetros cromatográficos ficaram estabelecidas as seguintes condições de separação: (a) vazão de 1 mL min⁻¹; (b) volume de injeção 5 µL; (c) temperatura da coluna de 35 °C; (d) fase móvel composta por fosfato de amônio bibásico 10 mmol L⁻¹, pH 7,8 (fase aquosa A) e metanol (fase orgânica B) no seguinte gradiente de eluição: A/B (9:1, v/v) por 3 minutos; 8 minutos de uma rampa linear para A/B (4:6, v/v); permanência dessa proporção por 2 minutos; retorno para a proporção A/B (9:1, v/v) em 2 minutos através de rampa linear; permanência dessa proporção por mais 4 minutos. Tempo total de corrida de 19 minutos.

Um cromatograma característico da separação de uma mistura dos seis corantes aniônicos, nestas condições, é apresentado na Figura 4.6 e os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico estão apresentados na Tabela 4.1.

Ao analisar a Figura 4.6 observa-se a seguinte ordem de eluição dos corantes na coluna cromatográfica a base de sílica-C18: E 102, E 123, E 110, E 129, E 143 e E 127. Essa também foi a ordem de eluição dos corantes do cartucho de extração. Para facilitar a interpretação dos ensaios de extração dos tópicos seguintes, a

sequência de apresentação dos resultados obtidos com os corantes aniônicos seguirá a mesma ordem da retenção da coluna cromatográfica do corante menos retido para o mais retido.

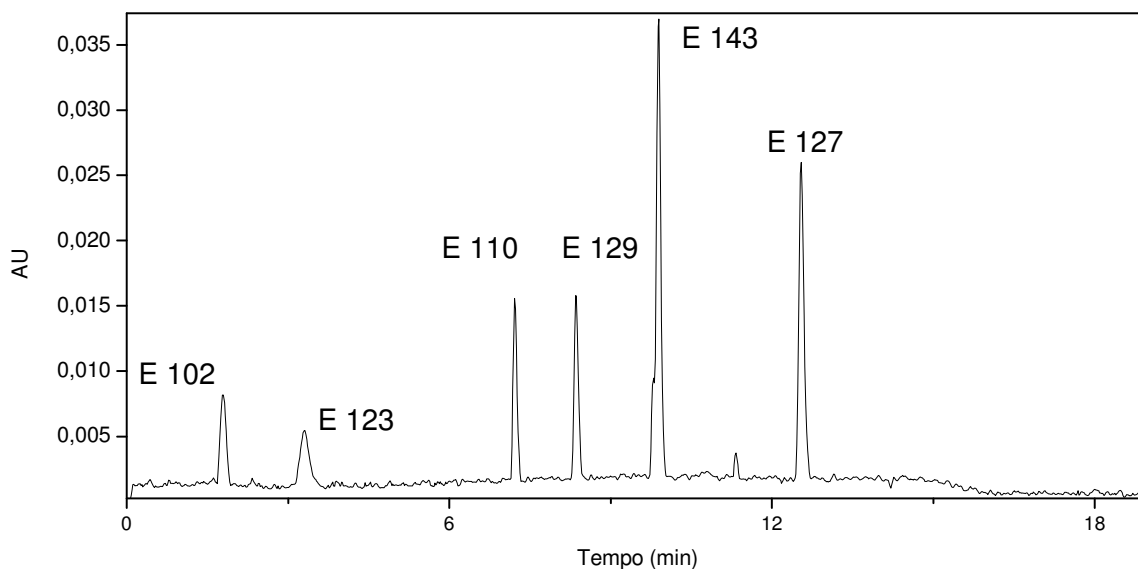


Figura 4.6. Separação cromatográfica dos corantes aniônicos por HPLC-DAD. Condições empregadas: coluna C18 (50 mm x 4 mm) acoplada a uma coluna de guarda C18 (10 mm x 4 mm), ambas PurospherStar[®] e com partículas de 3 μm ; eluição por gradiente empregando fosfato de amônio bibásico 10 mmol L^{-1} , pH 7,8, e metanol; 35 $^{\circ}\text{C}$; volume de injeção de 5 μL ; detecção apresentada nos máximos de absorção na região do visível dos respectivos corantes. E 102 a 428 nm ; E 123 a 524 nm; E 110 a 486 nm; E 129 a 506 nm; E 143 a 620 nm; E 127 a 530 nm. Concentração dos corantes: 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4.1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para os corantes aniônicos nas condições otimizadas.

CORANTE	k*	RESOLUÇÃO**	FATOR DE ASSIMETRIA*	NÚMERO DE PRATOS*
E 102	4,3	-	1,09	1772
E 123	8,1	8,3	1,15	8703
E 110	13,6	16,2	1,30	47797
E 129	15,6	7,6	1,31	63103
E 143	18,1	9,1	0,90	80998
E 127	23,6	8,8	1,20	71268

*Valores segundo a USP; **calculados em função do pico que antecede o composto em avaliação; k = fator de retenção.

As curvas analíticas obtidas empregando as condições cromatográficas otimizadas apresentaram faixa linear entre 0,4 e 9,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação (r) maiores que 0,996 (Tabela 4.2). As curvas analíticas obtidas abrangem de 10 a 240% da concentração esperada para os seis corantes aniônicos após a extração.

Tabela 4.2. Parâmetros das curvas analíticas para os corantes aniônicos.

CORANTE	λ (nm)	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EQUAÇÃO DA RETA	r
E 102	428	0,4 – 9,6	$y = 17980x - 1592$	0,999
E 123	524	0,4 – 9,6	$y = 16679x - 320$	1,000
E 110	486	0,4 – 9,6	$y = 21410x - 355$	0,997
E 129	506	0,4 – 9,6	$y = 22117x - 345$	0,999
E 143	620	0,4 – 9,6	$y = 61603x - 404$	0,999
E 127	530	0,4 – 9,6	$y = 43559x - 387$	0,999

y = área do pico; x = concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$; λ = comprimento de onda de detecção.

As condições cromatográficas de separação dos corantes aniônicos foram otimizadas para obter requisitos mínimos de conformidade dos parâmetros cromatográficos como fator de retenção, resolução, fator de assimetria e número de

pratos.

Entretanto, não foi realizada uma otimização exaustiva dos parâmetros de separação uma vez que, neste estágio de desenvolvimento, não era pretendido validar um método empregando a E-SPE[®], mas sim, empregar uma técnica de quantificação adequada para os corantes aniônicos avaliados.

Apesar da otimização simplificada, todos os parâmetros de separação avaliados apresentaram valores adequados e em conformidade com a maioria dos protocolos de agências reguladoras que preconizam condições de análise por métodos cromatográficos [66, 67].

Empregando as condições cromatográficas acima descritas foram realizados os estudos de extração em fase sólida com e sem aplicação de campo elétrico.

4.3.2 Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de modificador orgânico empregado na solução de lavagem

Um dos principais parâmetros que deve ser avaliado em eletrocromatografia é a quantidade de modificador orgânico empregada na solução eluente. O uso de solventes miscíveis na solução aquosa pode alterar a viscosidade do meio, a afinidade do analito pela fase estacionária, a condutividade da solução, a força do campo elétrico, o potencial zeta da superfície do sorvente, o fluxo eletrosmótico, além do raio de solvatação dos analitos e, conseqüentemente, suas mobilidades eletroforéticas [1].

Na Figura 4.7 é possível observar o efeito da porcentagem do modificador orgânico metanol empregado na solução de lavagem, sobre a recuperação dos corantes aniônicos.

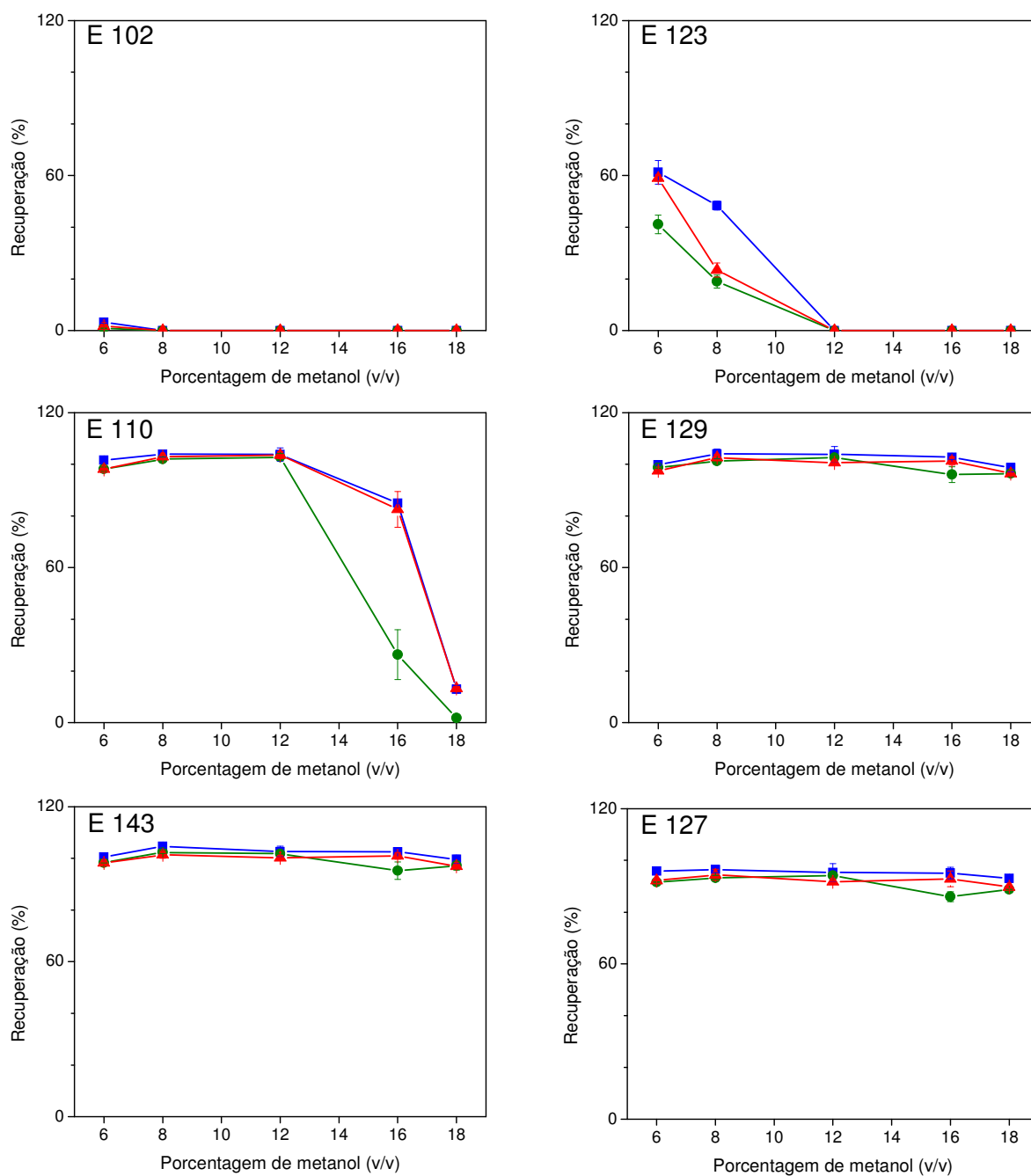


Figura 4.7. Efeito da porcentagem de metanol da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE^(+/-) (-●-) e E-SPE^(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 7 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 20% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 10 mL de tampão ACF 20/40, pH 4,0, contendo diferentes porcentagens de metanol em vazão de 1,0 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Para o corante E 123 pequenas porcentagens de solvente orgânico na solução aquosa de lavagem exerceram um efeito acentuado sobre a retenção desse composto. Ainda para o E 123, é possível observar que a aplicação do campo elétrico com polaridade negativa sobre o eletrodo superior, E-SPE[®]_{(-/+) (-●-), favoreceu sua eluição do cartucho e, conseqüentemente, reduziu sua recuperação quando comparado ao procedimento convencional sem campo elétrico, SPE (-■-).}

Um comportamento ainda mais pronunciado foi observado para o corante E 110. Para esse corante, o uso de 16% (v/v) de metanol resultou em uma diferença significativa entre os procedimentos de SPE (-■-) e E-SPE[®]_{(-/+) (-●-).}

Os resultados com os corantes E 123 e E 110 demonstram que ambos os processos eletroforéticos e cromatográficos são afetados pelo teor de metanol na etapa de lavagem.

A sorção desses corantes foi drasticamente reduzida com o aumento da quantidade de metanol na solução de lavagem o que é facilmente compreendido pelo aumento da solubilidade dos compostos do eluente (fase móvel) e redução da afinidade pelo sorvente (fase estacionária). Esse efeito ficou claramente evidenciado no procedimento de SPE (-■-).

Os efeitos eletroforéticos, por sua vez, também foram alterados pela presença de modificador orgânico, como observado nos resultados da E-SPE[®]_{(-/+) (-●-). O aumento de metanol no eluente de lavagem, facilitou a solubilização e a permanência dos corantes E 123 e E 110 na solução permitindo, desta forma, que o campo elétrico atuasse de forma mais intensa sobre a eluição desses compostos.}

Por outro lado, a aplicação do campo elétrico com polaridade positiva sobre o eletrodo superior, E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-), não apresentou um efeito significativo sobre as recuperações dos corantes E 123 e E 110 e os resultados obtidos com essa polaridade ficaram bastante próximos daqueles apresentados pela SPE (-■-). Esse resultado poderia estar associado ao processo de polarização de concentração induzida por campos elétricos, apresentada na seção 4.1. Esse fenômeno poderia estar favorecendo a exclusão dos corantes aniônicos, que são coíons dos silanóis, para fora do interior dos poros das partículas de sílica [44, 68].}

Os demais corantes avaliados, E 102, E 143 e E 127, não demonstraram

valores de recuperação dependentes da quantidade de metanol empregada.

Para o corante E 102, que não apresentou afinidade significativa pelo sorvente, os efeitos do campo elétrico não ficaram evidenciados, pois esse composto eluiu rapidamente do cartucho durante a etapa de lavagem, resultando em recuperações próximas de zero. Por outro lado, os corantes E 129, E 143 e E 127 demonstram, nas condições empregadas, forte afinidade pelo sorvente e, desta forma, suas recuperações foram pouco influenciadas pelo campo elétrico uma vez que esses compostos permaneceram, predominantemente, sorvidos nas partículas de sílica.

Outro ponto que deve ser destacado é a corrente e o potencial elétrico aplicados durante os experimentos. Neste estudo o potencial elétrico e a corrente elétrica foram monitorados durante a aplicação do campo elétrico e estão apresentados na Figura 4.8. Nas condições empregadas, foi observado que quanto maior a porcentagem de metanol utilizada maior o potencial elétrico registrado (Figura 4.8 A). Esse resultado pode ser atribuído às condutividades elétricas dos eluentes da lavagem, uma vez que as soluções com maior porcentagem de metanol apresentam os menores valores de condutividade elétrica elas necessitaram de maiores potenciais elétricos para atingir a corrente elétrica estabelecida.

As correntes elétricas registradas, no entanto, foram relativamente estáveis e com valores próximos entre si (Figura 4.8 B). Esse perfil indica que o sistema eletroforético foi estável durante todo o processo de aplicação do campo elétrico.

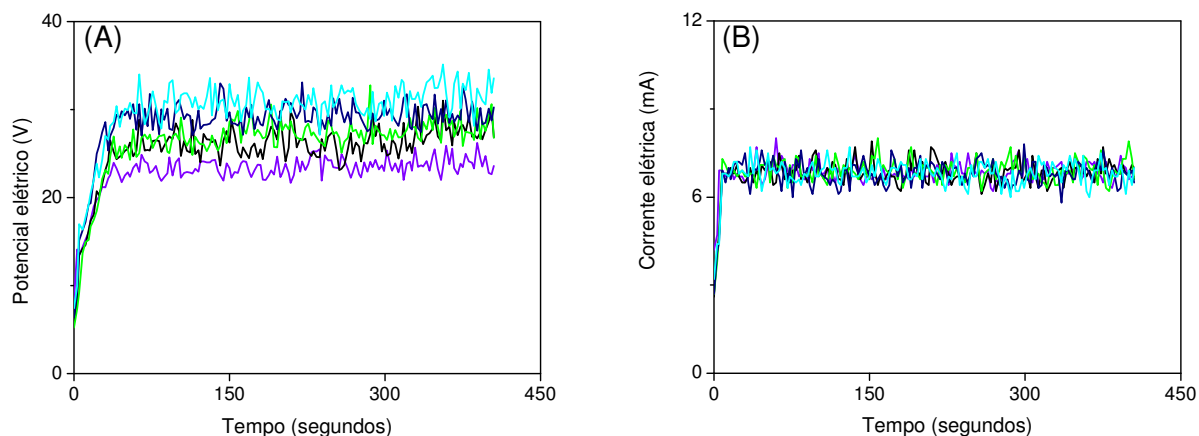


Figura 4.8. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito da porcentagem de metanol sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = 6%; (—) = 8%; (—) = 12%; (—) = 16% e (—) 18% (v/v) de metanol. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 7 mA.

4.3.3 Modelos aniônicos: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem

Um parâmetro importante, tanto para os processos cromatográficos quanto eletroforéticos, é a concentração iônica da solução de lavagem.

O efeito da concentração das soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico utilizadas no preparo do tampão de lavagem é apresentado na Figura 4.9.

Os gráficos da Figura 4.9 demonstram que o aumento da concentração dos íons na solução de lavagem exerceu forte influência na recuperação dos corantes E 123, E 110 e E 129, tanto nos procedimentos convencionais como naqueles com aplicação de campos elétricos. Esses resultados comprovam que ambos os efeitos cromatográficos, descritos pela SPE (-■-), como os processos eletroforéticos representados pela E-SPE[®]_(+/-) (-▲-) e E-SPE[®]_(-/+) (-●-), foram modificados pelo incremento dos íons em solução.

Para o corante E 123, o aumento da recuperação obtida com o aumento da concentração é basicamente o resultado de uma maior interação desse composto com o sorvente como demonstrou o processo de SPE (-■-). Por outro lado, os

processos eletroforéticos foram reduzidos pelo incremento de íons em solução, como observado pelo discreto aumento da recuperação do corante em E-SPE[®]_{(-/+) (-●-). Outro resultado que merece destaque do corante E 123 foi obtido empregando a E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-). Nessa condição, o campo elétrico não foi capaz de reduzir a eluição do corante mesmo com a menor concentração de tampão empregada (ACF 5/10). Esses resultados indicam que os processos eletroforéticos não foram suficientes para sobrepor-se ao movimento de convecção.}}

Com os corante E 110 e E 129 o único resultado diferenciado observado com o aumento da concentração de íons foi no procedimento de E-SPE[®]_{(-/+) (-●-). Nesta condição, a diminuição da concentração iônica resultou na redução da recuperação dos compostos pela combinação dos efeitos eletroforéticos aumentados com os efeitos cromatográficos diminuídos.}

Em eletrocromatografia, a dupla camada elétrica na superfície das partículas é inversamente proporcional à raiz quadrada da concentração iônica da solução [1]. Dessa forma, tanto o fluxo eletrosmótico quanto os efeitos de polarização de concentração são diminuídos com o aumento da concentração dos íons da solução de lavagem. O aumento da força iônica também eleva a viscosidade do meio, diminuindo a mobilidade eletroforética dos corantes [1].

Já nos processos cromatográficos de retenção, o aumento de íons em solução é responsável por uma maior interação dos corantes com o sorvente pelo efeito “salting-out” representado pela diminuição da água livre do meio [16].

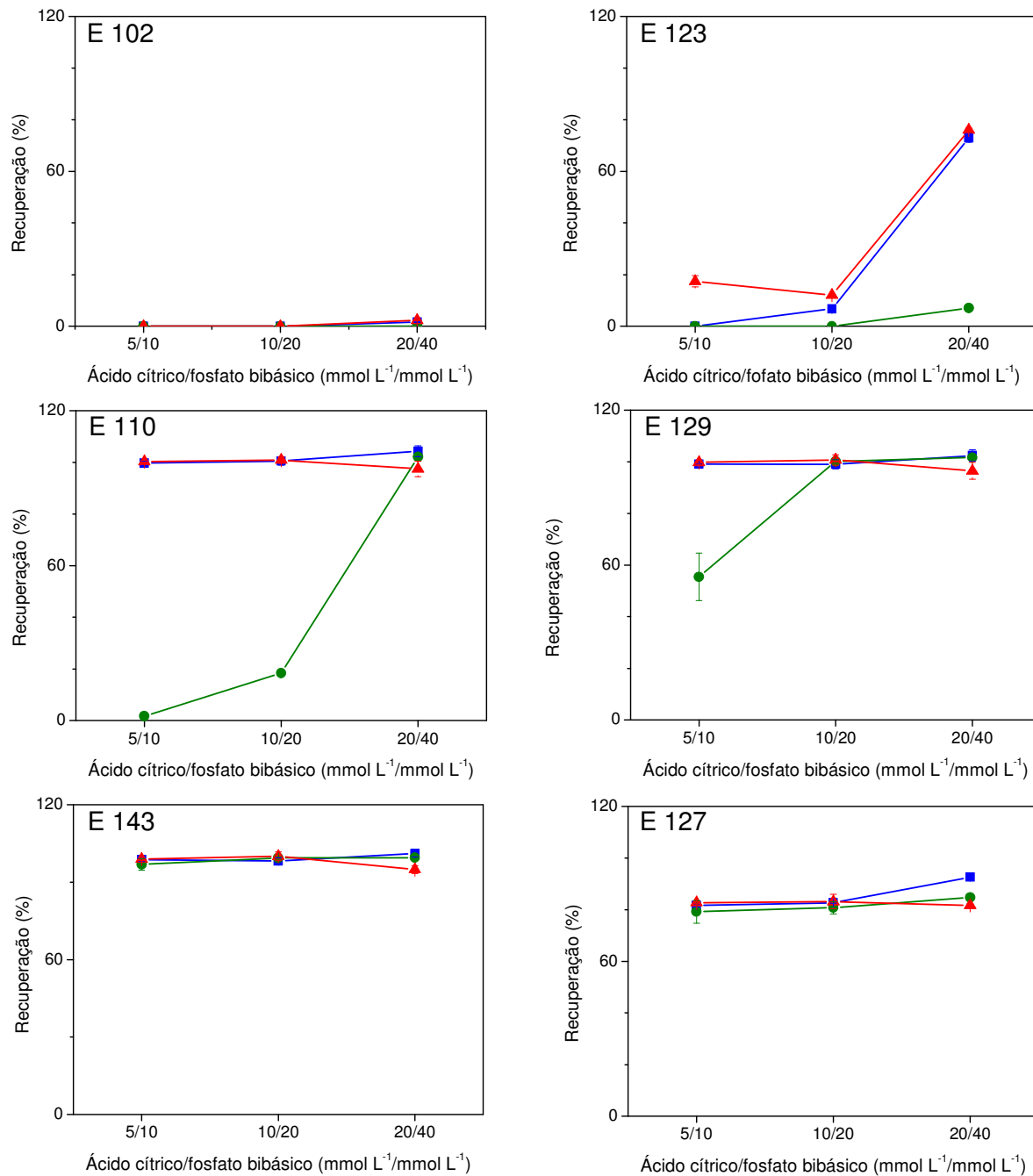


Figura 4.9. Efeito da concentração da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (■), E-SPE^(-/+) (●) e E-SPE^(+/-) (▲), com correntes elétricas constantes de 10 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 10 mL de tampão ACF, em diferentes concentrações, pH 4,0, todas contendo 7% (v/v) de metanol e em vazão de 0,7 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Finalmente, como os experimentos foram realizados com corrente elétrica constante, as soluções com maior força iônica apresentaram os menores valores de potencial elétrico associados, enquanto que os valores das correntes elétricas permaneceram relativamente constantes (Figura 4.10).

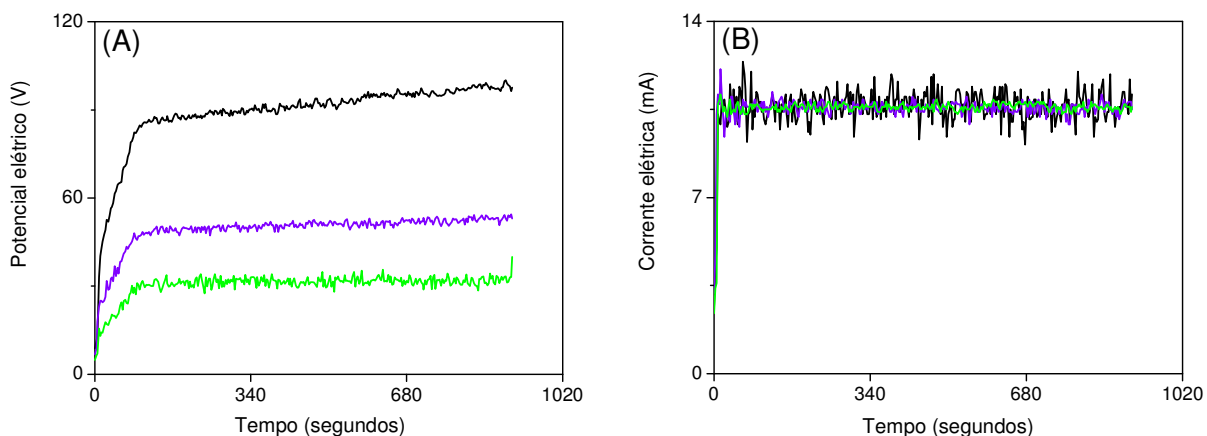


Figura 4.10. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito da concentração das soluções de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = ACF 20/40; (—) = ACF 10/20 e (—) = ACF 5/10. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

Vale lembrar que, em experimentos com correntes elétricas constantes, o aumento da concentração iônica acarreta também uma redução do potencial elétrico associado e o resultado é uma diminuição da força do campo elétrico.

4.3.4 Modelos aniônicos: avaliação do pH do tampão empregado na solução de lavagem

Neste estudo foram avaliados dois sistemas tamponantes diferentes, ambos formados pela mistura de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico. A faixa de pH avaliada variou entre 2,8 e 8,0 dependendo do sistema tampão empregado. Para obter as soluções tampão ACF nos valores de pH mais elevados, são necessárias

maiores quantidades de fosfato de sódio e, por esse motivo, essas soluções apresentaram condutividades superiores. Dessa forma, foi avaliado um conjunto de soluções tampão sem ajuste do pH e outro onde as condutividades foram igualadas pela adição de pequenas porções de NaCl 25% (v/v) às soluções.

Essa estratégia tinha como objetivo principal fazer com que os potenciais elétricos e, conseqüentemente os campos elétricos aplicados, fossem iguais para todos os tampões com o ajuste da condutividade. Essa abordagem também fez com que a retenção dos corantes provocada pelo efeito de “salting out” fosse praticamente igualada para esses tampões.

A) Tampão sem ajuste da condutividade

Para o sistema tampão ACF sem ajuste da condutividade, é possível observar que, a única influência significativa da variação do pH da solução de lavagem, ocorreu para a extração do corante E 110 empregando a E-SPE[®]_{(-/+) (-●-)} (Figura 4.11). Na extração deste corante, as soluções tampão em pH 2,8 e 4,0 apresentaram os menores valores de recuperação.

Sem a correção da condutividade, a força do campo elétrico diminuiu significativamente à medida que foram empregadas soluções de lavagem menos ácidas. Esse resultado pode ser explicado, em parte, aos efeitos cromatográficos de retenção do corante em função do aumento da concentração de íons em solução (“salting out”).

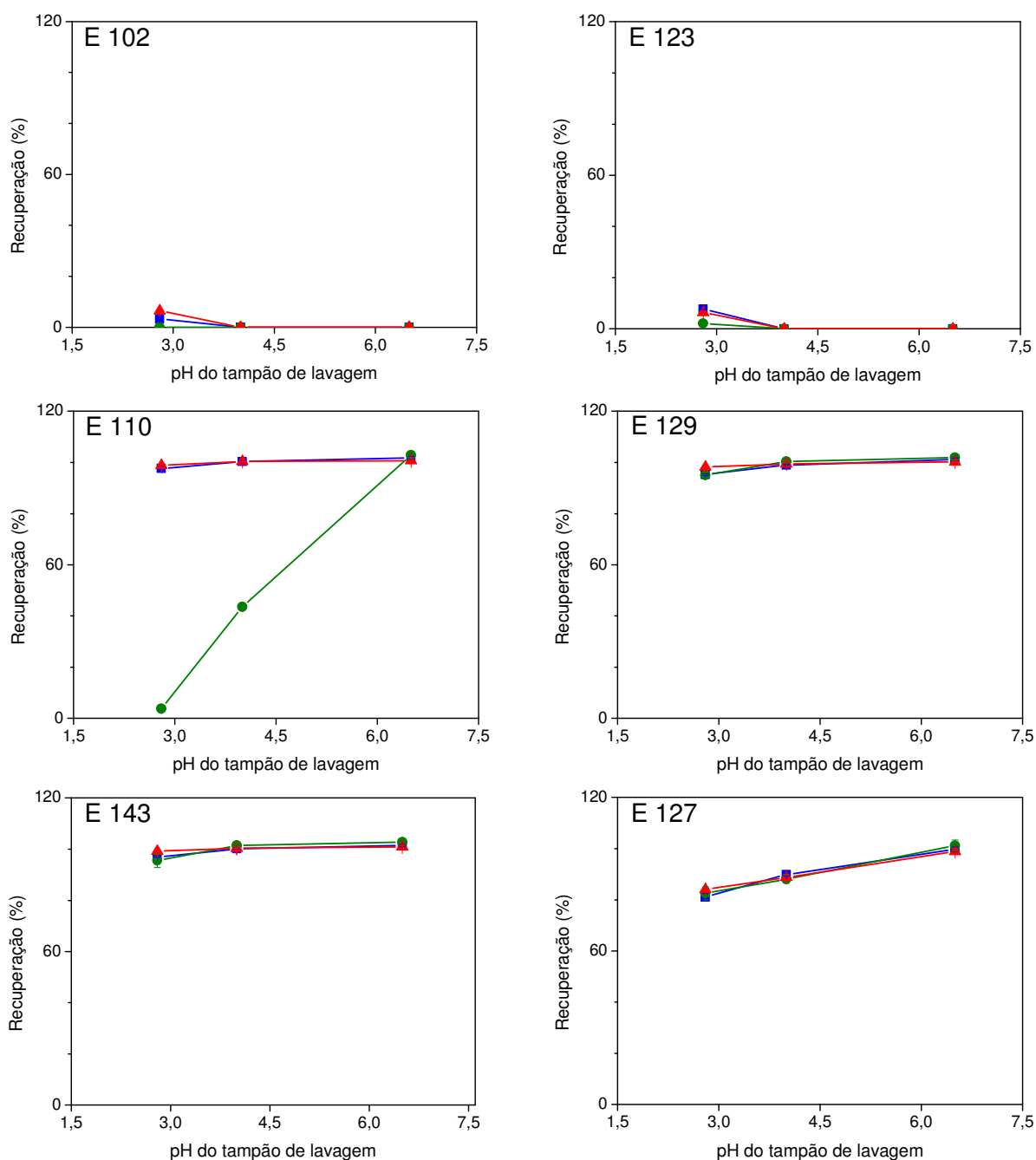


Figura 4.11. Efeito do pH da solução (sem ajuste da condutividade) empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (■-), E-SPE^(-/+) (●-) e E-SPE^(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 12 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 2,8; 4,0 e 6,5, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 10 mL de tampão ACF 10/20, pH 2,8; 4,0 e 6,5, todas contendo 7% (v/v) de metanol e em vazão de 1,0 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Uma outra explicação para esse comportamento seria à redução dos fenômenos eletroforéticos. Nesta avaliação as soluções de lavagem menos ácidas apresentam potenciais elétricos associados significativamente mais baixos (Figura 4.12 A).

Como consequência, as soluções de pH maior, mais condutoras, apresentaram campos elétrico e efeitos eletroforéticos menos intensos (Figura 4.12 A). Os perfis das correntes elétricas medidas, por outro lado, não demonstraram diferenças significativas (Figura 4.12 B).

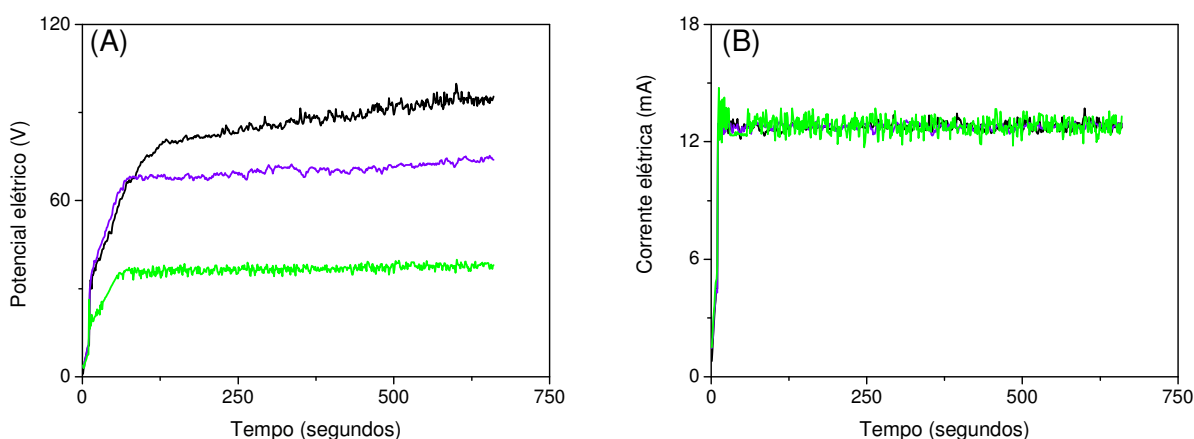


Figura 4.12. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito do pH do tampão de lavagem (sem ajuste da condutividade) sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE®. (—) = pH 2,8; (—) = pH 4,0 e (—) = pH 6,5. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

B) Tampão com ajuste da condutividade

Os resultados da extração empregando soluções tampão ACF, em diferentes valores de pH e com ajuste da condutividade são apresentados na Figura 4.13.

Com o ajuste da condutividade do tampão, os resultados de recuperação do corante E 110 apresentaram diferenças significativas em relação ao estudo anteriormente reportado.

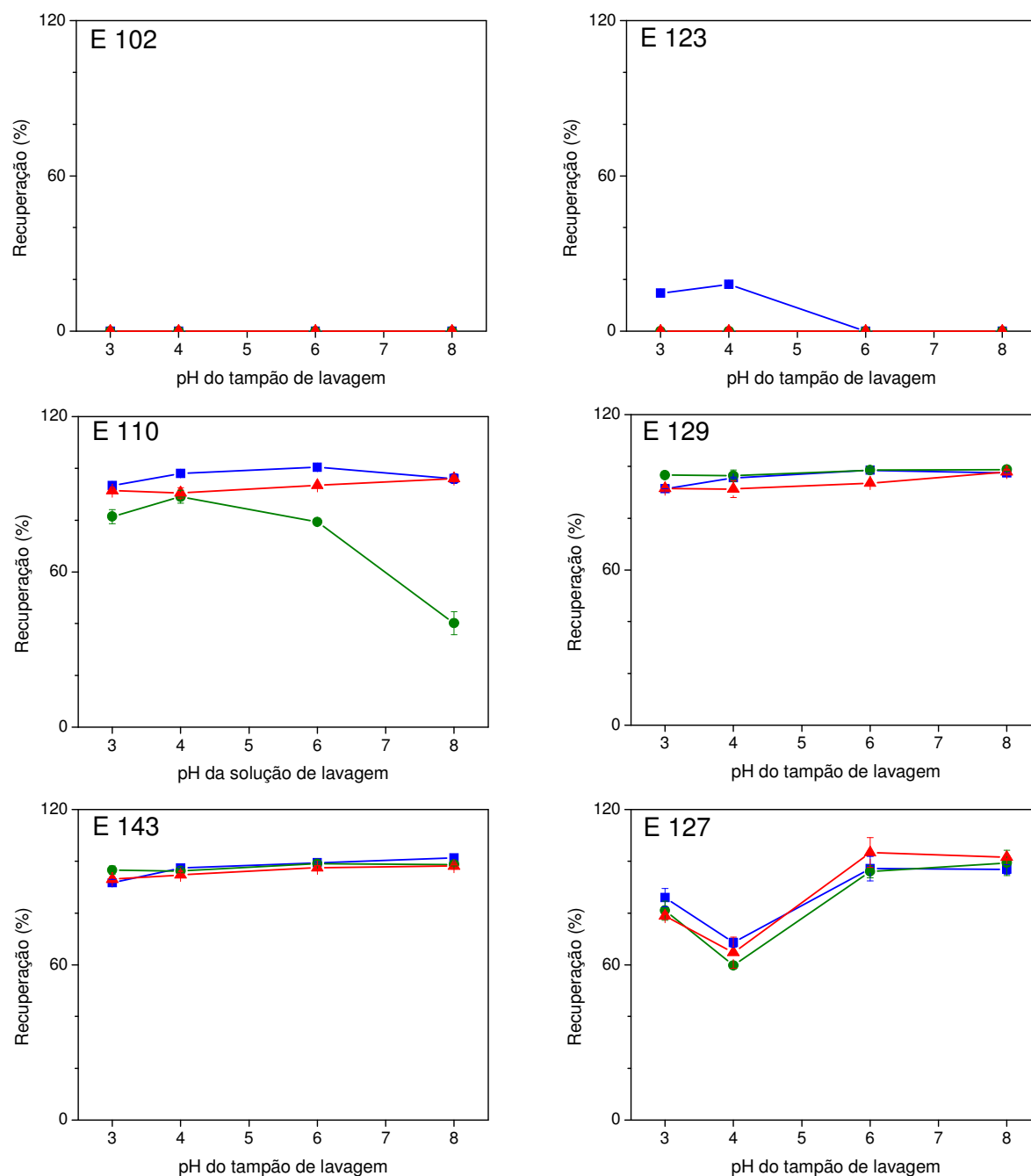


Figura 4.13. Efeito do pH da solução (com ajuste da condutividade) empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (■), E-SPE^(-/+) (●) e E-SPE^(+/-) (▲), com correntes elétricas constantes de 20 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 10 mL de tampão ACF 10/20, pH 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0, contendo 7% (v/v) de metanol e em vazão de 1,5 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Praticamente de forma oposta, a influência do campo elétrico sobre a recuperação do corante E 110 em procedimentos de E-SPE[®] (-/+) (-●-) foi mais intensa em soluções menos ácidas. Esses resultados demonstram que o efeito do campo elétrico é intimamente dependente do sistema tampão empregado.

Em CEC, CE e EC o pH exerce efeitos sobre o balanço carga/massa dos analitos, assim como na dissociação dos grupos silanóis nas paredes do capilar e das partículas de sílica. No caso do corante aniônico E 110 os principais grupos iônicos presentes na estrutura da molécula desse composto são os grupos sulfônicos que permanecem ionizados mesmo na solução mais ácida avaliada (pH 2,8). Uma mudança na relação carga elétrica/massa do corante não é esperada uma vez que a desprotonação da hidroxila fenólica (pK_a de 10,4), que é capaz de conferir uma carga negativa adicional à molécula, não é favorecida na faixa de pH avaliada (3,0 – 8,0) [48].

Em relação à dissociação dos grupos silanóis, ainda não se sabe a extensão do efeito do pH da solução sobre o processo de E-SPE[®]. As partículas de sílica empregadas possuem uma área superficial em torno de $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ com parte dessa área recoberta com grupos C18. Neste trabalho não foram obtidas informações sobre a porcentagem de silanóis que permanecem protonados em função do pH utilizado para esse tipo e marca de sílica modificada e, tão pouco, sobre o fluxo eletrosmótico resultante da aplicação de campos elétricos sobre esses grupos. Apesar dessas informações não estarem disponíveis, é provável que um número maior de silanóis livres esteja presente na superfície da sílica à medida que o valor do pH da solução se eleve. O aumento do número de cargas negativas no interior dos poros da sílica faz com que o fenômeno de polarização de concentração induzida por campos elétricos seja intensificado fazendo com que corante aniônico E 110, um coíon, seja mais intensamente excluído do interior das partículas.

Uma vez que as soluções tampões tiveram suas condutividades ajustadas, neste estudo, tanto os valores de potencial elétrico como os de corrente elétrica foram similares em toda a faixa de pH avaliada (Figura 4.14).

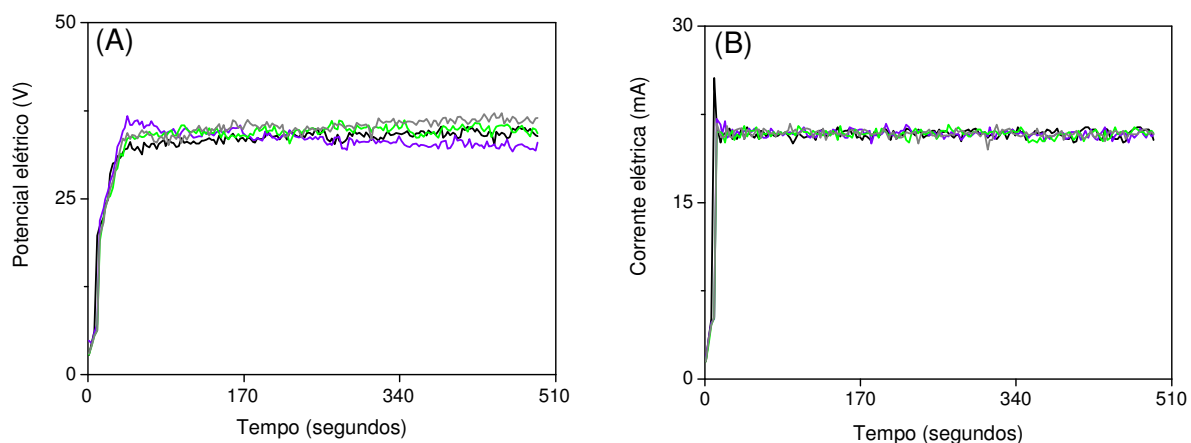


Figura 4.14. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito do pH do tampão de lavagem (com ajuste da condutividade) sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = pH 3,0; (—) = pH 4,0; (—) = pH 6,0 e (—) = pH 8,0. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 20 mA.

4.3.5 Modelos aniônicos: avaliação da corrente elétrica aplicada na etapa de lavagem

O efeito da variação da corrente sobre a recuperação dos corantes aniônicos nos procedimentos de E-SPE[®] é apresentado na Figura 4.15.

Em CEC, assim como em CE, o campo elétrico é a força motriz dos compostos em solução. Já em E-SPE[®], além do movimento proveniente do campo elétrico aplicado, existe também o processo convectivo de massa imposto pela vazão. Dessa forma, em E-SPE[®], a variação do potencial elétrico e/ou da corrente elétrica será responsável somente por parte do movimento gerado.

O uso de potenciais ou correntes elétricas tão altas quanto possíveis é necessário para obter campos elétricos fortes o suficiente para que os fenômenos eletroforéticos se manifestem, como foi observado para os corantes E 110 e E 129.

Empregando a E-SPE[®]_{(-/+) (-●-), a recuperação do corante E 129 demonstrou ser fortemente influenciada pela corrente elétrica aplicada. Uma dependência mais discreta também foi observada para o corante E 110. Para ambos os corantes o uso da E-SPE[®]_{(-/+) (-●-) reduziu os valores de recuperação.}}

Já com a polaridade da E-SPE[®]_(+/-) (-▲-), onde se esperava obter maiores valores de recuperação dos compostos aniônicos, não foi observado o efeito esperado e, até mesmo, um efeito contrário ocorreu para o corante E 110. Esse resultado pode estar relacionado ao aquecimento da solução que por sua vez diminuiu a retenção do corante E 110 no sorvente. Maiores valores de correntes elétricas são acompanhados por um aquecimento mais intenso como foi demonstrado na secção 3.3.5.

O fluxo eletroosmótico que ocorre em sentido oposto à eletromigração dos compostos aniônicos, assim como o efeito da polarização de concentração, que exclui esses compostos do interior dos poros, são diretamente proporcionais ao campo elétrico aplicado e, por esse motivo, também podem ter certa contribuição para os resultados do corante E 110 obtidos com a E-SPE[®]_(+/-) (-▲-).

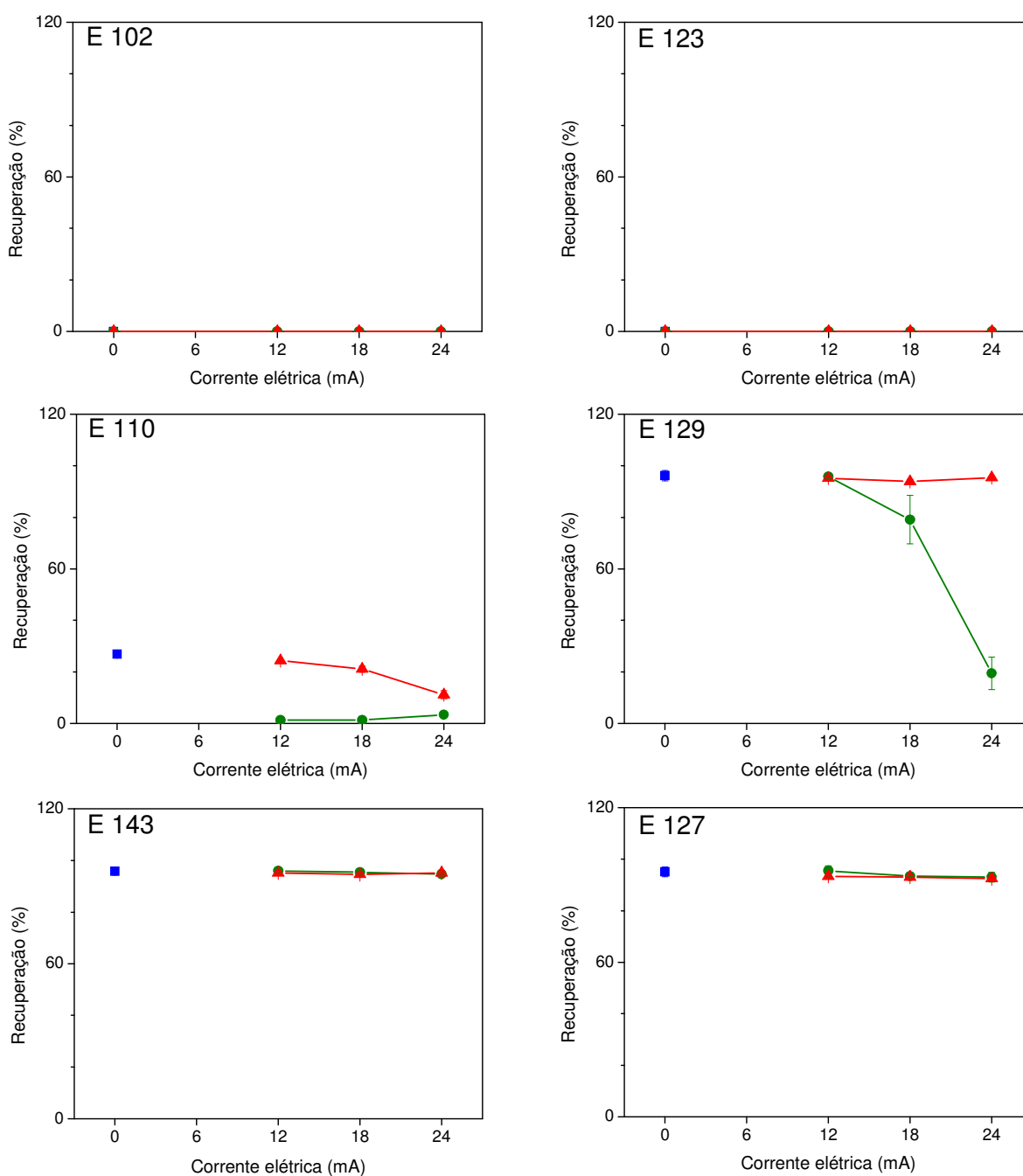


Figura 4.15. Efeito da corrente elétrica empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE^{(-/+) (-●-)} e E-SPE^{(+/-) (-▲-)}, com diferentes correntes elétricas. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 20% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 10 mL de tampão ACF 20/40, pH 4,0, contendo 16% (v/v) de metanol e em vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Sorvente: 500 mg de sílica -C18.

Na Figura 4.16 podemos observar que as maiores flutuações dos valores registrados estão associadas justamente as correntes e aos potenciais elétricos mais intensos.

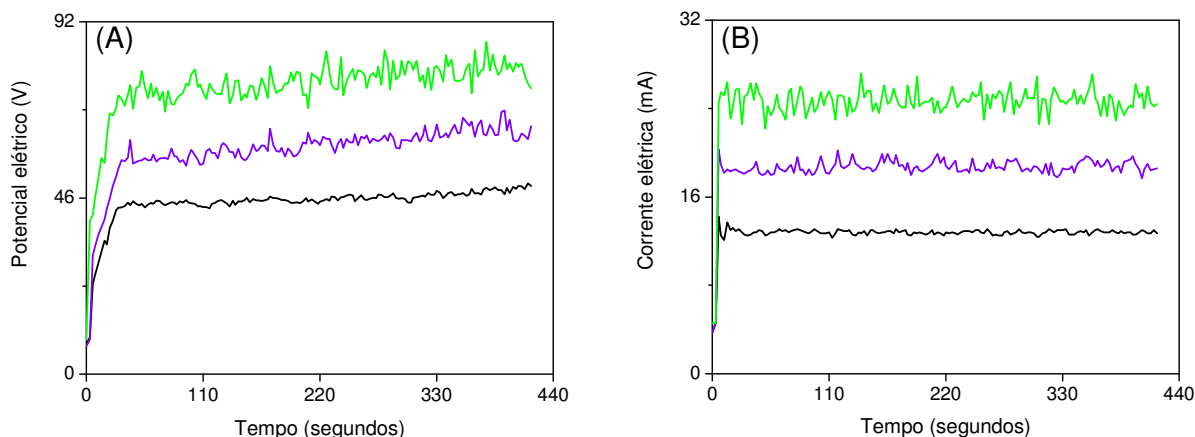


Figura 4.16. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito da corrente elétrica sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = 12 mA; (—) = 18 mA e (—) = 24 mA. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante.

4.3.6 Modelos aniônicos: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem

Nos gráficos da Figura 4.16 são apresentados os resultados da avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem.

Idealmente, a SPE convencional emprega, para a etapa de lavagem, o menor volume de solvente possível capaz de eluir a maioria dos interferentes sem que haja perda significativa dos analitos [6].

O solvente de lavagem desloca os analitos do sorvente para a solução e os transporta em direção a saída do cartucho como descrito pelos conhecidos processos cromatográficos de distribuição [16].

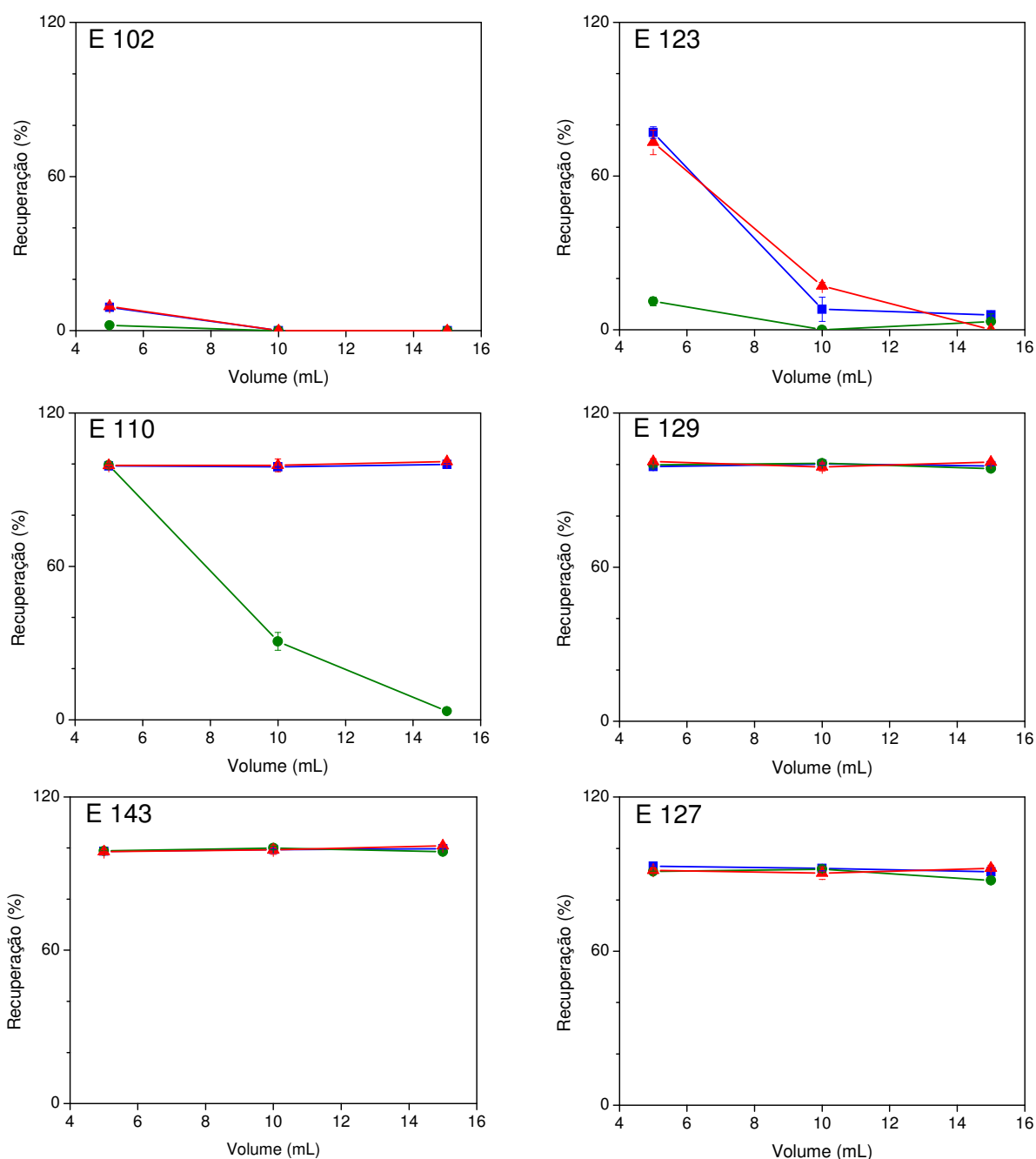


Figura 4.17. Efeito do volume da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE^(-/+) (-●-) e E-SPE^(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 12 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 5, 10 e 15 mL de tampão ACF 10/20, pH 4,0, contendo 7% (v/v) de metanol e em vazão de 1,0 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Em processos de E-SPE[®], por outro lado, a quantidade de solvente empregada não altera a intensidade dos fenômenos eletroforéticos, mas sim o tempo em que eles irão atuar, caso a vazão seja mantida em um valor fixo. Dessa forma, os efeitos cromatográficos e eletroforéticos podem ser alterados pelo volume de solução utilizado na etapa de lavagem, como foi observado nas recuperações dos corantes E 123 e E 110.

É possível observar que o aumento do volume de tampão de lavagem resultou na eluição mais intensa do corante E 123, nos procedimentos com e sem aplicação de campo elétrico. Os valores de recuperação do corante E 123, obtidos com a SPE (-■-), revelaram que o processo cromatográfico foi determinante quando o volume de eluente foi elevado de 5 para 10 mL. A E-SPE[®]_{(-/+) (-●-)} intensificou a eluição do corante E 123, enquanto que a E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)} não foi capaz de produzir recuperações superiores ao procedimento de SPE (-■-). De fato, os resultados de recuperação de SPE (-■-) e E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)} foram bastante semelhantes, indicando, mais uma vez, que os efeitos eletroforéticos com essa polaridade foram perfeitamente anulados pela convecção promovida pela vazão.

Para o corante E 110, por outro lado, volumes maiores de solução de lavagem alteraram somente as recuperações obtidas com os procedimentos de E-SPE[®]_{(-/+) (-●-)}. Neste caso, o maior tempo de atuação do campo elétrico permitiu que os efeitos eletroforéticos forçassem a saída do corante do cartucho. Já os efeitos cromatográficos, decorrentes da variação do volume de solução, foram pouco significativos sobre a recuperação desse corante uma vez que os valores obtidos com a SPE (-■-) ficaram todos próximos do limite máximo de 100%

Para os demais corantes que apresentaram ou retenções muito intensas ou muito fraca pelo sorvente, nenhuma diferença significativa entre os procedimentos de SPE e E-SPE[®] foi observada.

Os gráficos das correntes e dos potenciais elétricos monitorados demonstraram perfis com estabilidade similares, para os três volumes de tampão avaliados (Figura 1, A e B, do Anexo 1).

4.3.7 Modelos aniônicos: avaliação da vazão empregada na etapa de lavagem

O efeito da variação da vazão empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de extração com e sem aplicação do campo elétrico, é apresentado na Figura 4.18.

Em SPE convencional, a vazão geralmente não apresenta um efeito muito significativo sobre o rendimento do processo de extração desde que seja empregada dentro de uma faixa adequada. Para extrações empregando cartuchos recheados com 500 mg de sílica-C18, dependendo da composição da matriz e das características do analito analisado, vazões na ordem de 0,1 a 10 mL min⁻¹ são comumente aplicadas [3, 17]. A vazão ideal vai depender, fundamentalmente, do volume da amostra, da taxa de transferência de massa do analito para o material sorvente e da sua difusão em solução [17].

No caso da E-SPE[®], contudo, o efeito da vazão é mais pronunciado sobre a recuperação dos analitos extraídos. Os efeitos eletroforéticos dependem, entre outros fatores, do tempo em que o campo elétrico é aplicado. Sendo assim, vazões menores elevam o tempo do procedimento de extração e permitem que o campo elétrico exerça seu efeito por um período mais longo. Isso pode ser observado na recuperação do corante E 123 onde as menores vazões empregadas resultaram em uma eliminação mais intensa deste composto no procedimento de E-SPE[®]_{(-/+) (-●-).}

Por outro lado, mesmo em vazões de 0,5 mL min⁻¹ a polaridade positiva do eletrodo superior (-▲-) não foi capaz de superar o processo de convecção e por isso, as recuperações obtidas foram próximas aos valores apresentados de SPE (-■-). Vale salientar que, quando a vazão é interrompida, pelo desligamento da bomba peristáltica, é possível observar a migração dos corantes em direção ao eletrodo superior positivamente carregado. Assim, pode-se concluir que o fenômeno eletroforético com essa polaridade de fato ocorre. Contudo, de forma ainda não esclarecida, os seus efeitos sobre a recuperação não puderam ser evidenciados.

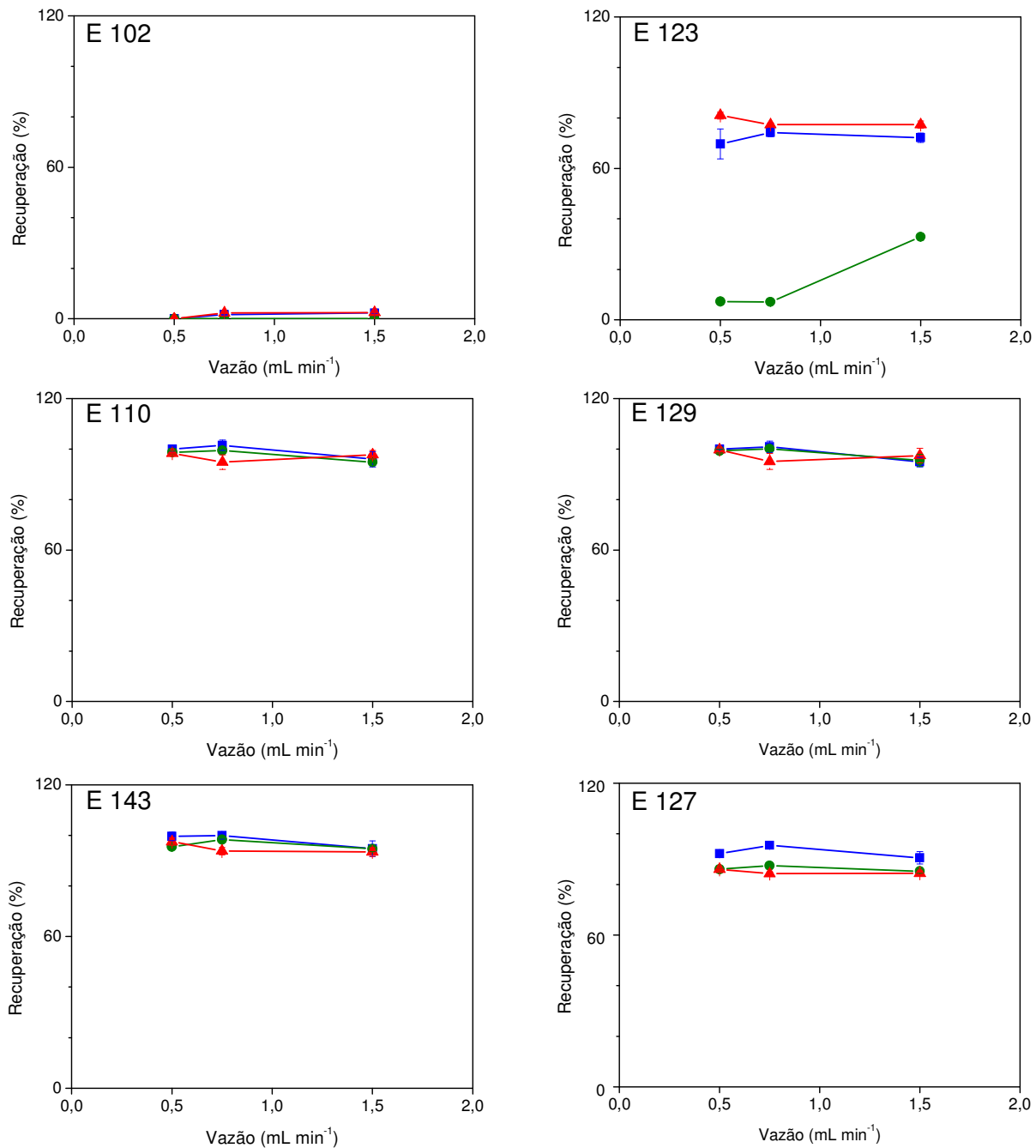


Figura 4.18. Efeito da vazão empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE^(-/+) (-●-) e E-SPE^(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 10 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 10 mL de tampão ACF 20/40, pH 4,0, contendo 7% (v/v) de metanol nas vazões de 0,5; 0,75 e 1,5 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Outra observação importante neste experimento é que o potencial e a corrente elétrica empregados mantiveram-se estáveis mesmo em vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, cujo tempo total de avaliação demorou cerca de 24 minutos (1483 segundos), demonstrando que os dispositivos eletroforéticos utilizados, como os cartuchos e eletrodos, estão sendo adequados para os estudos em questão (Figura 1 A e B do Anexo 2).

4.3.8 Modelos aniônicos: avaliação da quantidade de sorvente empregada no preparo dos cartuchos

Os resultados da avaliação da quantidade de sorvente empregada no preparo dos cartuchos de E-SPE[®], sobre a recuperação dos corantes aniônicos são apresentados nos gráficos da Figura 4.19.

A quantidade de sorvente empregada em cartuchos convencionais de SPE está relacionada, principalmente, à massa ou volume de amostra que será aplicada e à afinidade dos analitos que serão extraídos. Nesses cartuchos a massa de sorvente varia de algumas dezenas de miligramas a algumas dezenas de gramas [17]. Quanto mais sorvente um cartucho apresentar, maior o número de interações do analito com o sorvente e, conseqüentemente, maior a retenção tanto dos analitos como também dos interferentes. Cartuchos com maiores quantidades de sorvente são mais susceptíveis a sofrerem obstrução por materiais particulados da amostra. Um outro problema, não analítico, associado ao uso de maiores quantidades de sorvente é o custo mais elevado desses cartuchos.

Como mencionado, o processo cromatográfico é fortemente influenciado pela quantidade de sorvente. Entretanto, não é esperado que o aumento da quantidade de sorvente exerça uma influência semelhante sobre os fenômenos eletroforéticos, desde que o campo elétrico permaneça constante.

Ao avaliar os resultados dos corantes E 123 e E 110 é possível constatar que as intensidades das respostas de recuperação em função da quantidade de sorvente não foram iguais para os procedimentos de SPE e E-SPE[®].

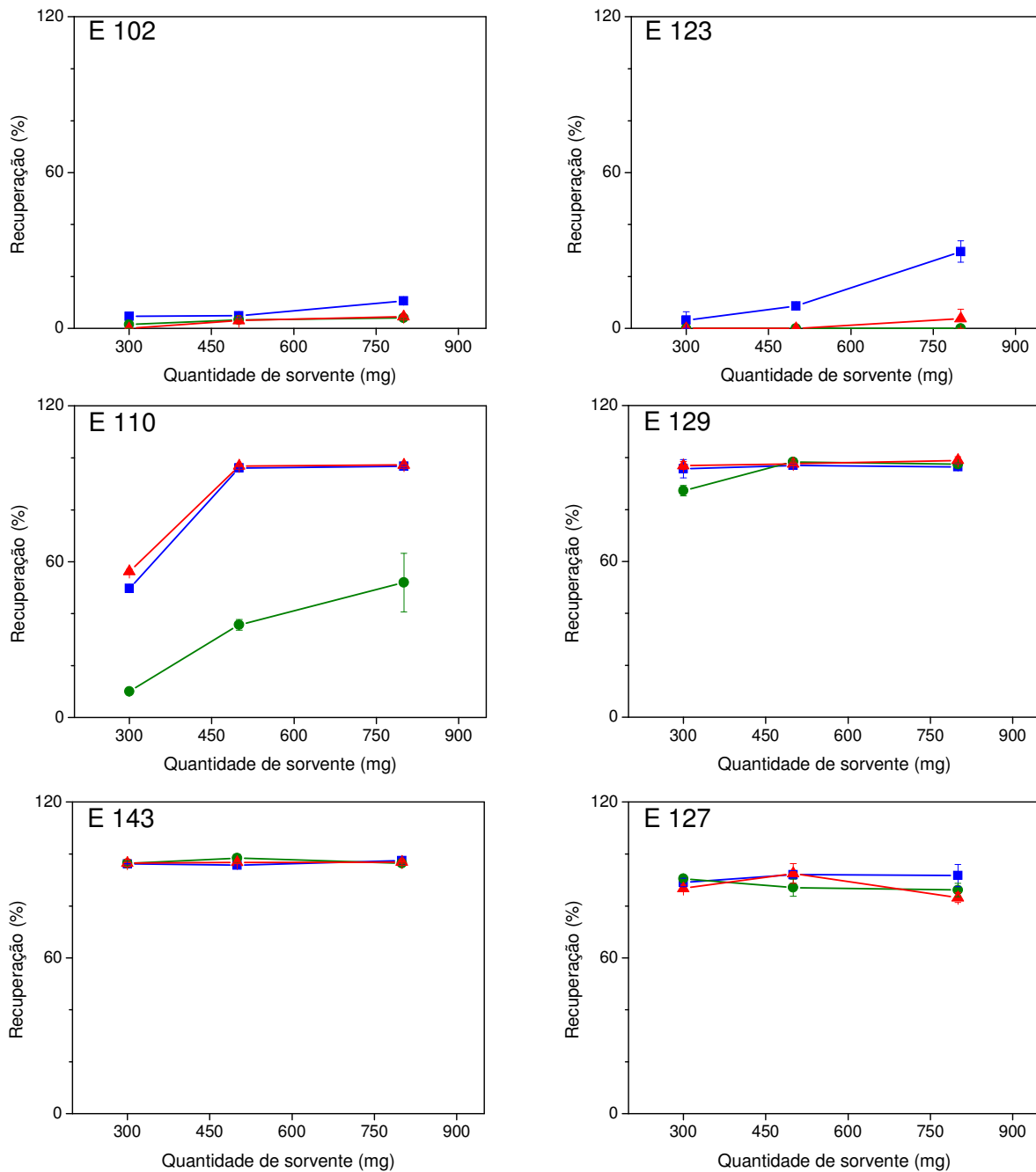


Figura 4.19. Efeito da quantidade de sorvente empregado no preparo do cartucho sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE^(-/+) (-●-) e E-SPE^(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 12 mA. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0 contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 5 mL de tampão ACF 10/20, pH 4,0, contendo 10% (v/v) de metanol e em vazão de 1,0 mL min⁻¹. Sorvente: 300, 500 e 800 mg de sílica-C18.

O corante E 123, por exemplo, apresentou para os procedimentos de SPE (-■-) um aumento da recuperação correspondente ao aumento da quantidade de sorvente empregada, enquanto que para o procedimento de E-SPE[®] em ambas as polaridades do eletrodo superior, (-●-) e (-▲-), as recuperações permaneceram próximas do mínimo em todas as situações avaliadas. Um efeito indireto nos processos cromatográficos e eletroforéticos em decorrência do incremento da quantidade de sorvente é o aumento da temperatura no interior do cartucho. Para manter o campo elétrico constante, é preciso intensificar os potenciais elétricos empregados quando a quantidade de sorvente é aumentada. Em consequência, maiores potências elétricas são geradas o que intensifica o aumento da temperatura da solução. Esse efeito pode ser um dos motivos dos baixos valores de recuperação obtidos com o corante E 123 no procedimento de E-SPE[®]_(+/-) (-▲-).

Para o corante E 110, a E-SPE[®]_(-/+) (-●-) foi capaz de favorecer a eliminação desse composto com todas as quantidades de sorvente avaliadas. Os valores de recuperação revelam que houve uma diminuição da intensidade de eliminação do corante em função da maior quantidade de sorvente utilizada o que deve estar associado ao aumento do efeito de retenção. A polaridade positiva, E-SPE[®]_(+/-) (-▲-) e o procedimento convencional, SPE (-■-), por outro lado, apresentaram valores de recuperação bastante próximos.

Neste estudo ficou evidenciado que os potenciais elétricos registrados foram mais intensos para os experimentos empregando maiores quantidades de sorvente ao passo que as correntes elétricas apresentaram perfis próximos (Figura 4.20).

É importante lembrar que a fonte de eletroforese foi utilizada no modo corrente constante e que, por este motivo, o potencial elétrico ajustou-se automaticamente em função da maior resistividade dos cartuchos com maiores quantidades de sorvente. Dessa forma, o campo elétrico permaneceu praticamente constante uma vez que o balanço de massa de sorvente/potencial elétrico ou altura do recheio/potencial elétrico não foi alterado.

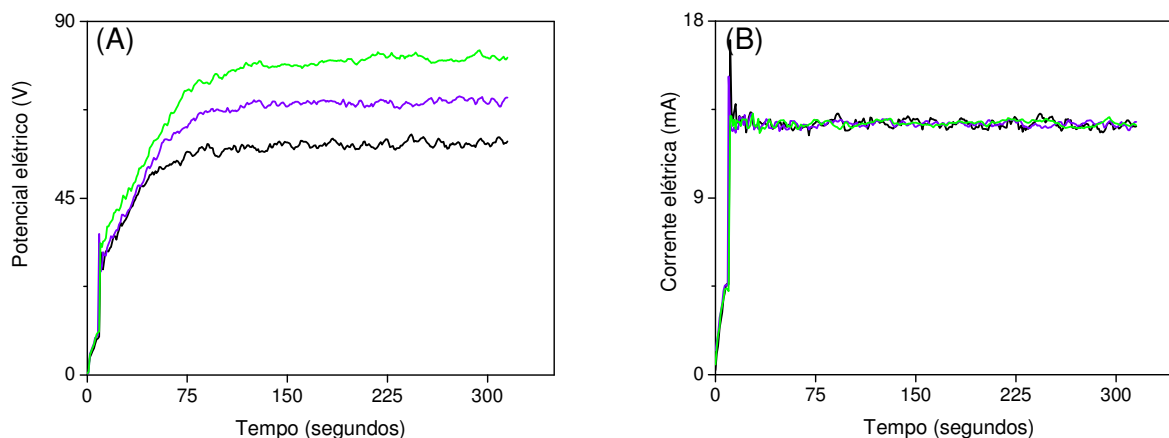


Figura 4.20. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito da quantidade de sorvente empregada no preparo dos cartuchos sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = 300 mg; (—) = 500 mg e (—) = 800 mg. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

4.3.9 Modelos aniônicos: avaliação do material sorvente empregado no preparo do cartucho

Para este estudo foram avaliadas três diferentes marcas de sorventes de sílica-C18 (A, B e C), além de uma marca de sorvente a base de um copolímero de n-vinilpirrolidona-divinilbenzeno (D).

Na Figura 4.21 são apresentados os valores de recuperação dos corantes aniônicos nestes sorventes.

O corante E 102 não apresentou recuperação apreciável em nenhum sorvente de sílica-C18. Entretanto, apresentou recuperado próxima de 100% empregando a SPE (-■-) com o sorvente polimérico D. Neste sorvente a E-SPE[®]_{(-/+) (-●-) foi capaz de favorecer a eliminação do corante. Apesar desse material não apresentar qualquer tipo de grupo silanol residual, seu comportamento em relação ao corante E 102 foi semelhante a do corante E 110 nos sorventes de sílica-C18 A e C.}

Os sorventes de sílica-C18 A e C apresentaram resultados de extração para o corante E 110 semelhantes, tanto no procedimento convencional (-■-) como nos procedimentos com aplicação de campo elétrico, E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-) e E-SPE[®]_{(-/+) (-●-).}}

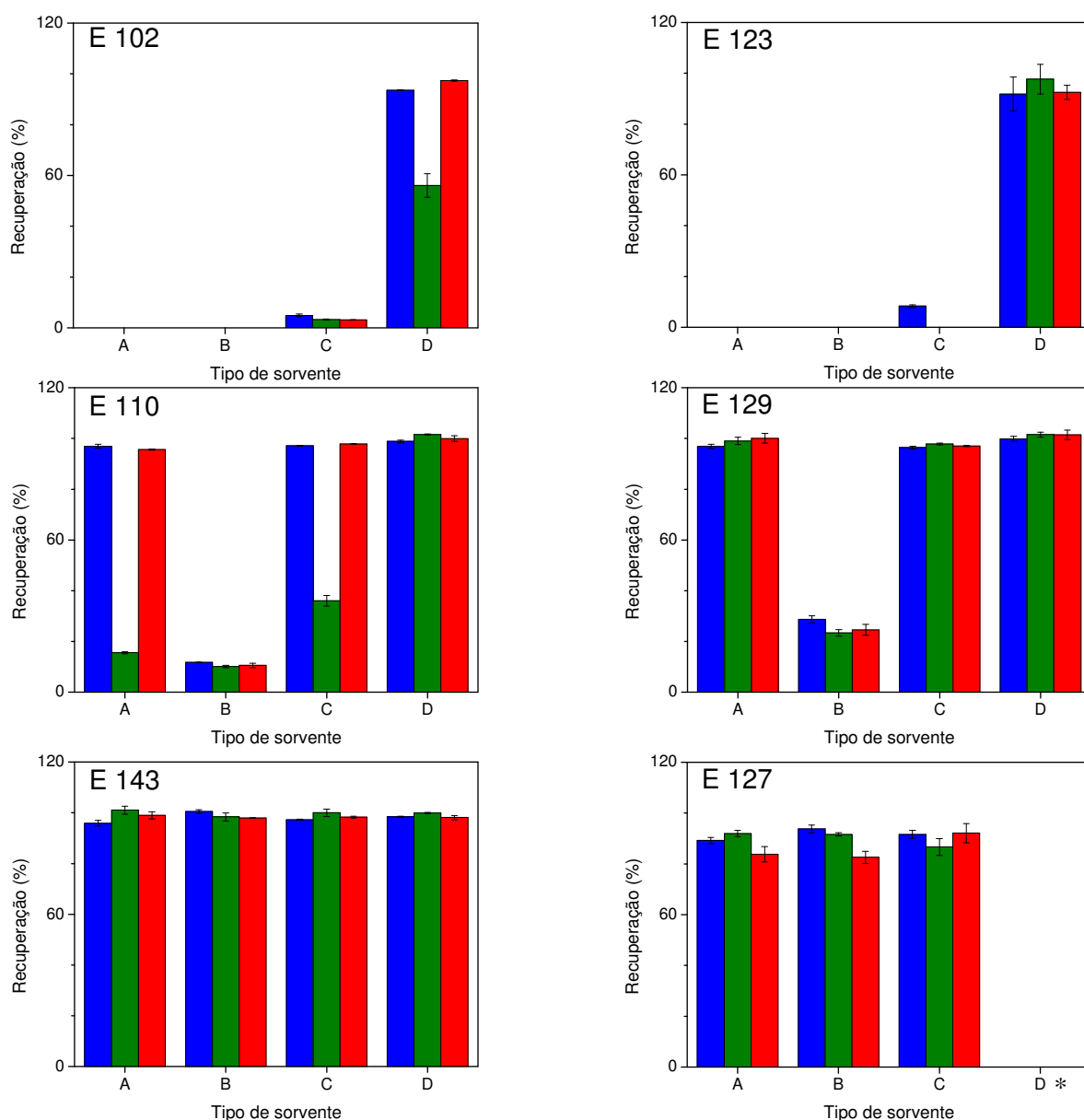


Figura 4.21. Efeito do tipo de material sorvente empregado no preparo do cartucho sobre a recuperação dos corantes aniônicos em procedimentos de SPE (■), E-SPE[®]_(-/+) (■) e E-SPE[®]_(+/-) (■), com correntes elétricas constantes de 12 mA. Sorventes a base de sílica-C18: A = Varian; B = Applied Separations; C = Phenomenex e a base de co-polímero: D = Waters. Amostra: 1 mL da mistura dos corantes (80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl e 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 5 mL de tampão ACF 10/20, pH 4,0, contendo 10% (v/v) de metanol e em vazão de 1,0 mL min^{-1} . Massa de sorvente: 500 mg dos sorventes de sílica-C18 e 400 mg do sorvente polimérico. D* = não foi quantificado devido a forte interação com o sorvente.

Para estes sorventes, observamos que o campo elétrico reduziu a recuperação do corante com a E-SPE[®]_{(-/+) (-●-)} ao passo que a E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)} praticamente não demonstrou qualquer efeito sobre a recuperação dos corantes, para as três marcas de sorventes de sílica-C18 avaliadas.

Já o sorvente B, também de sílica-C18, apresentou capacidade de retenção bastante inferior dos demais sorventes como pode ser observado nos resultados obtidos, sem aplicação de campo elétrico (-■-), com os corantes E 110 e E 129. Para esse sorvente, nenhuma diferença nas recuperações empregando a SPE e E-SPE[®], para os seis corantes, pode ser observada.

São vários os fatores que afetam a sorção de analitos em sorventes a base de sílica-C18, entre eles, a porcentagem de revestimento da superfície das partículas, o número de grupos silanóis residuais ativos, a área superficial por grama de sorvente, tamanho dos poros, entre outros [3, 17]. Todos os sorventes de sílica-C18 avaliados apresentam, pela especificação descrita pelos fabricantes, entre 0,51 a 0,56 mmols de grupos C18 recobrimo a superfície da partícula. Esses materiais também possuem tamanho médio de partícula (40-57 µm) e diâmetro médio dos poros (60-72 Å) similares.

Como não foi realizado nenhum tipo de caracterização e confirmação das propriedades desses materiais, não foi possível atribuir esses resultados a uma característica específica desses sorventes.

Neste estudo os potenciais elétricos registrados foram semelhantes tanto para os diferentes tipos de sorventes a base de sílica, como para o sorvente polimérico (Figura 1 A e B do Anexo 3).

4.3.10 Modelos catiônicos: ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas

Compostos catiônicos como a SAF apresentam forte interação com grupos silanóis residuais das partículas de sorvente [17, 69]. Por esse motivo, foi utilizada para determinação da SAF a coluna de sílica híbrida C18 de segunda geração X-Bridge[®] (Waters), que apresenta uma menor quantidade de grupos silanóis residuais

em sua superfície devido às pontes etano [70].

Após a otimização dos parâmetros cromatográficos ficaram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas: (a) vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; (b) amostrador de $10 \text{ }\mu\text{L}$; (c) temperatura da coluna de $35 \text{ }^\circ\text{C}$; (d) ácido fórmico $0,02\%$ (v/v) (fase aquosa A) e metanol:tetraidrofurano (1:1, v/v) (fase orgânica B) no seguinte gradiente de eluição: A/B (85:15, v/v) por 3 minutos; 2 minutos de uma rampa linear para A/B (7:3, v/v); permanência dessa proporção por 9 minutos; retorno para a proporção A/B (85:15, v/v) em 1 minutos através de uma rampa linear; permanência dessa proporção por mais 5 minutos. Tempo total de corrida de 20 minutos.

Um cromatograma característico para o corante SAF nestas condições é apresentado na Figura 4.22 e os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico na Tabela 4.3.

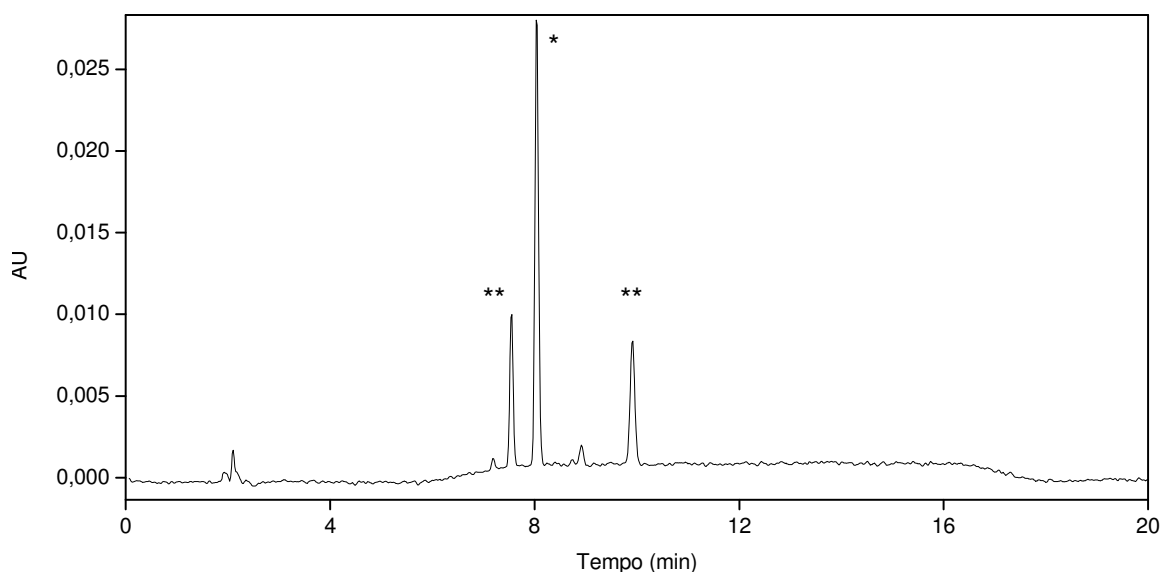


Figura 4.22. Cromatograma típico da análise do corante catiônico SAF. Condições empregadas: coluna C18 (150 mm x 4,6 mm) e coluna de guarda (20 mm x 4,6 mm), ambas X-Bridge® e com partículas de $3,5 \text{ }\mu\text{m}$; eluição por gradiente empregando ácido fórmico $0,02\%$ (v/v) e uma mistura de metanol:tetraidrofurano (1:1, v/v); $35 \text{ }^\circ\text{C}$; volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$; detecção a 526 nm . *Pico majoritário do padrão do corante e as respectivas **impurezas. Concentração do corante: $2 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Como pode ser observado na Figura 4.22, alguns picos de impurezas aparecem no cromatograma. Esse fato já era esperado uma vez que esse composto é comumente comercializado com pureza de 85%. Dessa forma, adotou-se como estratégia quantificar somente o pico majoritário (pico com sinal mais intenso) do respectivo corante nos ensaios de extração por SPE e E-SPE[®].

Tabela 4.3. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para o pico majoritário da SAF nas condições otimizadas.

CORANTE	k*	RESOLUÇÃO**	FATOR DE ASSIMETRIA*	NÚMERO DE PRATOS*
SAF	3,14	3,64	1,04	58280

*Valores segundo a USP, **calculado em relação ao pico majoritário com o pico de menor tempo de retenção; k = fator de retenção.

A curva analítica obtida, empregando as condições cromatográficas otimizadas para o pico majoritário do corante SAF, apresentou faixa linear e coeficiente de correlação (*r*) adequado ao estudo proposto (Tabela 4.4). A curva analítica abrange de 8,3 a 167% da concentração esperada para a SAF após a extração.

Tabela 4.4. Parâmetro da curva analítica para a SAF.

CORANTE	λ (nm)	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EQUAÇÃO DA RETA	<i>r</i>
SAF	526	0,25 - 5	$y = 85829x - 3009$	0,999

y = área do pico cromatografado; x = concentração de SAF em $\mu\text{g mL}^{-1}$; λ = comprimento de onda de detecção.

Com o método cromatográfico estabelecido e a faixa linear determinada, foram iniciados os estudos de extração com e sem aplicação de campo elétrico.

4.3.11 Modelo catiônico: avaliação da concentração da solução tampão empregada na etapa de lavagem

Os resultados de extração do corante SAF, variando-se a concentração das soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico utilizadas no preparo do tampão de lavagem, são apresentados na Figura 4.23.

Uma discussão geral do efeito da concentração da solução de lavagem sobre os processos cromatográficos e eletroforéticos foi apresentada anteriormente na secção 4.3.3, contudo, para o corante catiônico SAF alguns pontos merecem comentários adicionais.

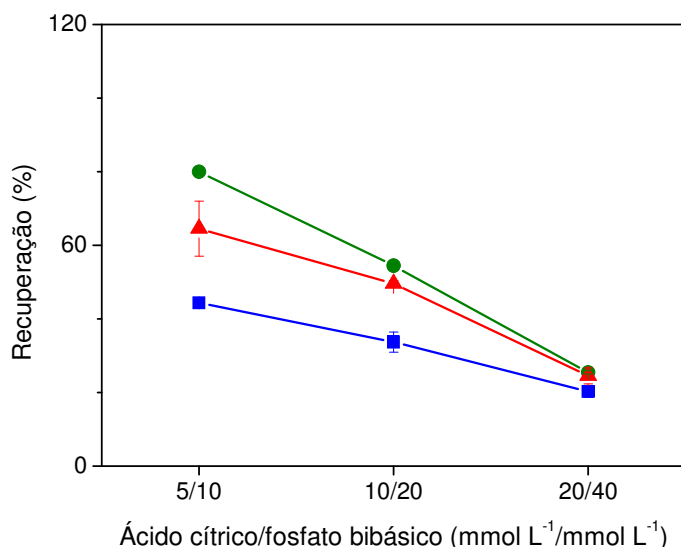


Figura 4.23. Efeito da concentração da solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE[®]_(+/-) (-●-) e E-SPE[®]_(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 10 mA. Amostra: 1 mL de solução do corante SAF (30 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl, 10% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de 2-propanol. Condições da lavagem: 5 mL de tampão ACF, pH 4,0, em diferentes concentrações, todas contendo 35% (v/v) de 2-propanol e em vazão de 1,3 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

O que foi observado para os corantes aniônicos, naquela ocasião, foi a diminuição da eluição (maior recuperação) desses compostos à medida que a força iônica aumentava nos procedimentos sem aplicação de campo elétrico SPE (-■-).

Esse efeito foi atribuído, parcialmente, ao efeito “salting-out” provocado pela maior concentração de íons e, conseqüentemente, menor solubilidade dos analitos em solução.

Já para o corante catiônico SAF esse efeito apareceu de forma oposta, com o aumento da força iônica, houve redução da recuperação desse corante. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que este composto, por apresentar carga residual positiva, interage fortemente com grupos silanóis residuais do sorvente por meio de um mecanismo misto de troca iônica e partição com os grupos silanóis e C18, respectivamente. Em mecanismos de troca iônica, o aumento da força iônica favorece a eluição dos analitos carregados, fato que está em concordância com os resultados observados [17, 69].

Neste estudo o uso da E-SPE[®] exerceu efeitos significativos sobre a eluição do corante SAF. Para este composto, a E-SPE[®]_{(-/+) (-●-)}, como esperado, fez com que a recuperação do corante aumentasse. Entretanto, a E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)}, com polaridade oposta, ao invés de favorecer a eliminação do corante, também elevou a eficiência de extração.

Esse resultado difere do comportamento observado com os corantes aniônicos. Para aqueles compostos, com a E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)}, esperava-se uma diminuição da eluição dos corantes aniônicos, mas foram observados resultados muito semelhantes aos obtidos com a SPE (-■-).

Esses comportamentos observados não podem ser atribuídos à migração eletroforética, nem para o corante catiônico, nem tão pouco para os aniônicos. Vale lembrar novamente que, ao aplicamos um campo elétrico em sorventes com grupos silanóis residuais em sua superfície, os compostos catiônicos apresentarão sua migração eletroforética no mesmo sentido da migração do fluxo eletrosmótico e os compostos aniônicos em sentido contrário. Contudo, se o fluxo eletrosmótico fosse o processo predominante, em E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)} teríamos uma diminuição da recuperação, tanto dos corante catiônicos como aniônicos, o que não foi observado.

Outra importante contribuição para esse resultado deve estar associada ao efeito de polarização de concentração induzida por campo elétrico (CP). Esse efeito, como mencionado na secção 4.1, promove uma concentração dos contra-íons no

interior dos poros da partícula e uma exclusão de coíons. Assim, independentemente da polaridade dos eletrodos empregada, a retenção de cátions é favorecida e dos ânions diminuída.

Neste experimento, os potenciais e correntes elétricas monitorados, foram estáveis ao longo do tempo de aplicação. Já os potenciais elétricos medidos foram menores para as soluções tampão menos concentradas devido a maior condutividade dessas soluções (Figura 4.24).

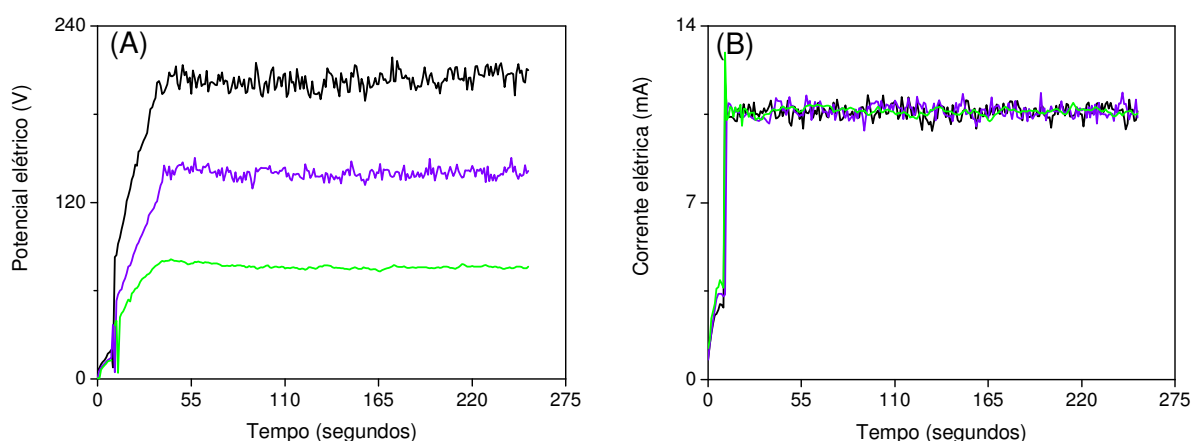


Figura 4.24. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito da concentração das soluções de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = ACF 20/40; (—) = ACF 10/20 e (—) = ACF 5/10. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

4.3.12 Modelo catiônico: avaliação do volume de tampão empregado na etapa de lavagem

O efeito do volume de tampão empregado nas extrações com e sem aplicação de campo elétrico para o corante catiônico SAF está representado na Figura 4.25.

Assim, como ocorreu com os corantes aniônicos (secção 4.3.6) ao elevar o volume da solução de lavagem a recuperação obtida da SAF foi reduzida, tanto nos procedimentos de SPE e E-SPE[®].

Novamente, ambas as polaridades dos eletrodos, (-▲-) e (-●-), resultaram em recuperações superiores ao procedimento convencional SPE (-■-).

Esse resultado pode estar relacionado, mais uma vez, ao maior tempo de aplicação do campo elétrico que permite que os efeitos eletroforéticos se desenvolvam por um período maior.

Neste estudo, assim como ocorreu em todas as avaliações envolvendo os corantes aniônicos, nenhum tipo de alteração que sugerisse a degradação do corante SAF foi observada.

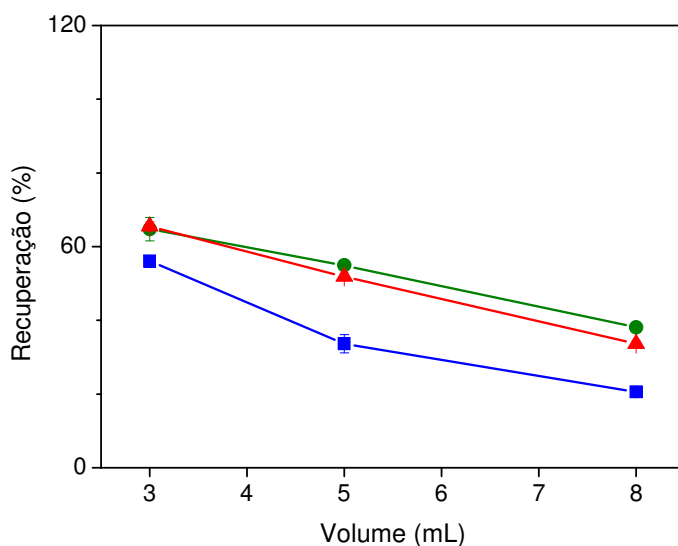


Figura 4.25. Efeito do volume de solução empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF em procedimentos de SPE (-■-), E-SPE^(+/+) (-●-) e E-SPE^(+/-) (-▲-), com correntes elétricas constantes de 10 mA. Amostra: 1 mL de solução do corante SAF (30 µg mL⁻¹) preparada em tampão ACF 100/200, pH 4,0, contendo 0,9% (m/v) de NaCl, 10% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de 2-propanol. Condições da lavagem: 3, 5 e 8 mL de tampão ACF 10/20, pH 4,0, em diferentes concentrações, todas contendo 35% (v/v) de 2-propanol e em vazão de 1,3 mL min⁻¹. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Para estes experimentos os potenciais elétricos aplicados e as respectivas correntes permaneceram estáveis e praticamente iguais uma vez que as soluções utilizadas em todos os testes apresentavam a mesma condutividade elétrica (Figura 1 A e B do Anexo 4).

4.4 Conclusão

Para cada parâmetro de extração estudado a E-SPE[®] demonstrou ser capaz de influenciar significativamente a eluição de pelo menos um dos seis compostos modelo aniônicos.

Os modelos E 102 e E 123 apresentaram fraca afinidade pelo sorvente baseado em sílica nas condições experimentais empregadas e, por isso, em poucas ocasiões foram adequados aos estudos propostos. Os corantes E 143 e E 127, por outro lado, demonstraram retenção excessiva pelo sorvente e esse foi o principal motivo da recuperação desses compostos não ter sido influenciada pela aplicação do campo elétrico.

Os principais modelos para esta etapa do trabalho foram os corantes E 110 e E 129 que demonstraram, para a maioria dos parâmetro estudados, que campos elétricos podem ser utilizados para promover seletividade ao processo de extração.

Os efeitos mais significativos do uso de campos elétricos foram obtidos com o emprego do eletrodo superior carregado negativamente E-SPE[®]_{(-/+) (-●-). Nesta condição o uso do campo elétrico foi capaz, em duas ocasiões, de promover a eliminação quase completa do corante E 110.}

Esses resultados poderiam ser atribuídos a uma degradação do corante por eletrólise, contudo nenhuma mudança nos espectros de absorção, tempos de retenção, distorção do formato dos picos ou aparecimento de novos picos foram observados.

O eletrodo superior atuando como ânodo E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-), por outro lado, não demonstrou, para nenhum parâmetro avaliado, a capacidade de elevar a recuperação dos modelos aniônicos. Somente quando foram utilizadas soluções de lavagem com baixos teores de eletrólitos (Anexo 5), foi possível observar o aumento da recuperação de um corante aniônico com a E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-).}}

Vários fatores podem estar associados aos resultados de E-SPE[®]_{(+/-) (-▲-)} obtidos com os corantes aniônicos como o fluxo eletrosmótico em direção oposta à eletromigração, a exclusão dos corantes aniônicos do interior dos poros da sílica em

decorrência do efeito da polarização de concentração e, até mesmo, o aquecimento gerado durante a aplicação do campo elétrico.

Dentre esses fenômenos, é possível que a polarização de concentração possa estar atuando de forma significativa sobre o processo de retenção dos corantes ao diminuir sua concentração no interior dos poros do sorvente. Nestas condições, os efeitos da migração eletroforética dos compostos em direção ao eletrodo superior seria anulada pela diminuição da sorção no sorvente e nenhum efeito significativo sobre a recuperação dos corantes seria manifestado.

Na extração de contra-íons da sílica, como por exemplo o corante catiônico SAF, o efeito da polarização de concentração seria exatamente o oposto.

Com este modelo catiônico foram avaliados o volume e a concentração da solução utilizada na etapa de lavagem. Nos dois estudos, o corante SAF apresentou eficiências de extração com a E-SPE[®] cerca de duas vezes superior a SPE convencional. Contudo, em ambos os estudos e independentemente da polaridade empregada sobre os eletrodos, foi observado unicamente o incremento da eficiência de extração do corante.

Somente quando foram utilizadas soluções de lavagem com baixos teores de eletrólitos (Anexo 6), foi possível observar a redução da recuperação de um outro modelo catiônico (azul de metileno) com a E-SPE[®]_{(-/+) (-●-)}.

Entre os efeitos eletroforéticos possíveis, como fluxo eletrosmótico, eletromigração e polarização de concentração, o último parece ser o mais condizente com o resultado observado para a SAF.

**CAPÍTULO V – APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM
EXTRAÇÕES EM FASE SÓLIDA DE ANTIMICROBIANOS
SULFONAMÍDICOS EM LEITE**

5.1 Considerações gerais

A última avaliação experimental deste trabalho consistiu na aplicação da E-SPE[®] para a extração dos antimicrobianos sulfonamídicos sulfadiazina (SDA), sulfametoxazol (SMX) e sulfaquinoxalina (SQX) em amostras de leite (Figura 5.1).

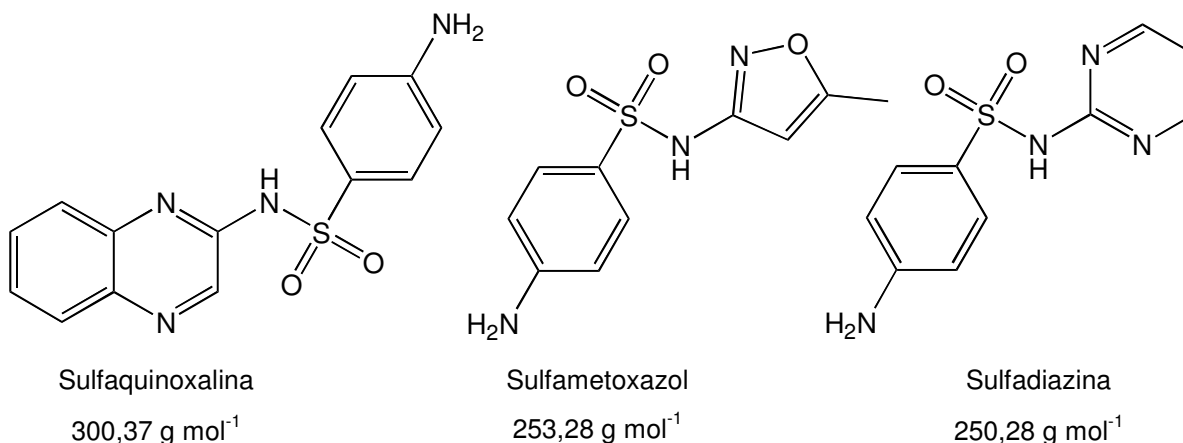


Figura 5.1. Estrutura química dos antimicrobianos sulfonamídicos empregados nos estudos de extração e suas respectivas massas molares.

Sulfonamidas são antimicrobianos sintéticos amplamente utilizados em várias doenças infecciosas, tanto em humanos quanto em animais de corte como aves e bovinos [71, 72].

Diversos efeitos colaterais associados ao uso desses antimicrobianos são relatados, incluindo porfiria, desordens hematopoiéticas e urinárias, hipersensibilidade entre outros, o que resultou na regulamentação ou mesmo na proibição do emprego de sulfonamidas em animais destinados ao consumo humano em muitos países [65, 71, 72].

Devido às restrições de uso, assim como aos efeitos indesejados provocados por esses compostos, os antimicrobianos sulfonamídicos foram e ainda são extensivamente analisados por técnicas cromatográficas e eletroforéticas em diversas matrizes biológicas como sangue, urina, plasma, além de alimentos de origem animal como ovos, leite, carne de frango, suínos e bovinos [65, 73-78].

As sulfonamidas são, em sua maioria, compostos anfotéricos que apresentam geralmente dois pK_a , sendo um em torno de 2,5, associado à protonação do grupo amina, e outro que pode variar entre 5 e 11, relacionado a desprotonação do grupo sulfonamida (Figura 5.2). Isso faz com que muitas sulfonamidas tenham ponto isoelétrico (pI) próximo de 4 [79]. As propriedades anfotéricas permitem a análise de sulfonamidas por CE tanto em sua forma catiônica como aniônica [81-84].

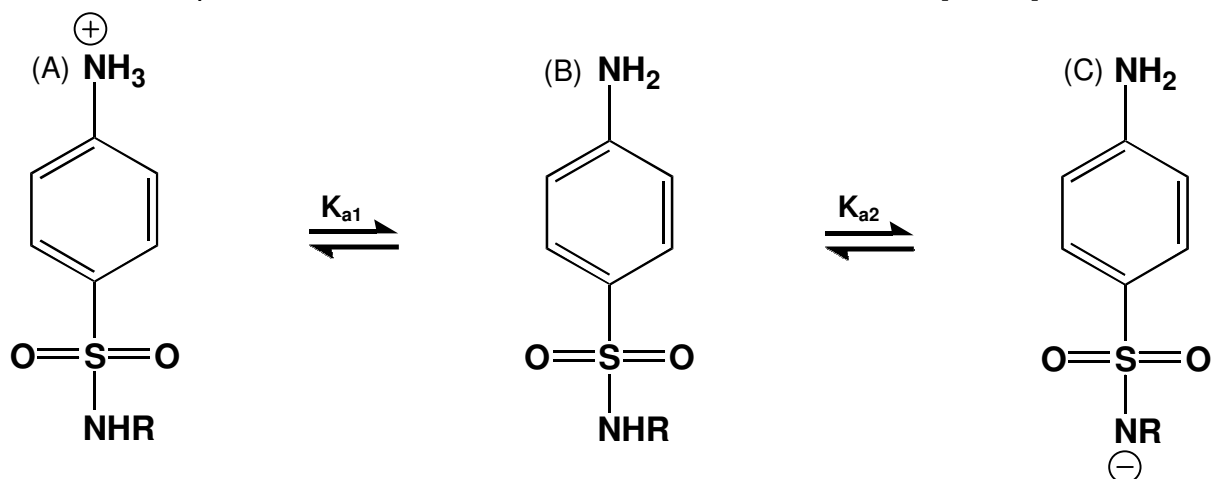


Figura 5.2. Equilíbrio de dissociação das sulfonamidas com sua configuração catiônica, (A), neutra (B) e aniônica (C).

O uso da SPE no preparo de amostras de leite para determinação de sulfonamidas é reportada em muitos métodos na literatura [65, 80, 85-87]. Na maioria desses trabalhos a extração é realizada com uma etapa inicial de precipitação protéica e/ou extração em meio fortemente ácido seguido de lavagem do precipitado com tampão McIlvaine em pH 4,0 para que o sobrenadante seja posteriormente submetido a SPE. Para a etapa de SPE, o tampão McIlvaine em pH 4,0 é novamente empregado para a remoção de interferentes retidos ao sorvente geralmente a base de sílica-C18 ou polimérico.

A SPE tem demonstrado eficiências de extração que variam geralmente entre 20 e 80%, dependendo da sulfonamida analisada e das condições de extração, em especial, do material sorvente empregado [65]. A remoção de interferentes nesses procedimentos é outro parâmetro que oscila consideravelmente de acordo com as condições do método.

Todas as características descritas anteriormente fazem da extração de sulfonamidas em leite uma ótima oportunidade de demonstrar a capacidade da E-SPE[®] em aumentar a eficiência de extração e, ao mesmo tempo, conferir uma remoção de interferentes diferenciada.

5.2 Parte experimental

5.2.1 Reagentes e solventes

- Ácido cítrico (Merck, Brasil), fosfato de sódio dibásico (Merck, Brasil), ácido fórmico (Nuclear, Brasil) e ácido tricloroacético (Merck, Brasil) todos com grau de pureza analítico ou superior.
- Solvente: metanol (Tedia, Brasil), com grau HPLC de pureza.
- Padrões dos antimicrobianos sulfonamídicos: sulfaquinoxalina (95%, Sigma, EUA), sulfadiazina (99,0%, Sigma-Aldrich, EUA) e sulfametoxazol (> 98,0% Sigma-Aldrich, EUA).
- Sorvente de sílica-C18 Septra C18-E para SPE da marca Phenomenex (65^oA X 50 µm, 485 m² g⁻¹) (EUA).

5.2.2 Material

- Cartuchos para SPE de polipropileno com capacidade de 6 mL da marca Varian (EUA).
- Discos de PTFE (politetrafluoretileno) sinterizado (frit) de 20 µm de poro para cartuchos de SPE de 6 mL da marca Varian (EUA).
- Tela de aço inoxidável de 80 mesh (diâmetro do fio de 0,080 mm e abertura da malha de 0,131 mm) (Steelmesh, Brasil).
- Fio de aço inoxidável de 0,35 mm de diâmetro (Steelmesh, Brasil).
- Filtros de fluoreto de polivinilideno de 0,22 µm x 13 mm (Millipore).
- Colunas cromatográficas analítica e de guarda de sílica-C18 PurospherStar[®] (50 mm x 4 mm) (10 mm x 4 mm), ambas com partículas de 3,0 µm (Merck, Alemanha).

5.2.3 Equipamentos

- Bomba peristáltica da marca Gilson modelo Minipuls Evolution (França).
- Fonte estabilizada de alta tensão para eletroforese, Fisher-Scientific, modelo FISH-FB3000Q (Malásia).
- Balança analítica Precisa, modelo XT 220A (Suíça).
- Bomba de vácuo Fanem, modelo 089-CAL (Brasil).
- Centrífuga Hettich, modelo Rotofix 32A (Alemanha).
- Purificador de água Millipore, modelo Milli-Q Academic (EUA).
- pH-metro Digimed, modelo DM-22 empregando um eletrodo de vidro combinado (Brasil).
- Condutivímetro Digimed, modelo DM-32 (Brasil).
- Multímetros Protek, modelo 506 com saída RS-232 (Coréia do Sul).
- Microcomputador Pentium (Intel, EUA) contendo: sistema operacional Microsoft Windows 95 (EUA), programa de aquisição de dados escrito em Visual Basic 3.0 da Microsoft (EUA), duas entradas RS-232 e uma interface de comunicação paralela.
- Interface de comunicação paralela Advantec, modelo 711-S (EUA) contendo um conversor analógico digital de 12 bits, 16 entradas e 16 saídas TTL (transistor-transistor-logic).
- Microcomputador Pentium 4 (Intel, EUA) contendo: sistema operacional Microsoft Windows XP (EUA), programas de processamento de dados Origin versão 6.1 (EUA) e Microsoft Excel 2003 (EUA).
- Sistema de análise composto por: (1) cromatógrafo à líquido de alta eficiência da marca Waters (EUA), modelo 1525, composto por um sistema de bombeamento binário, injetor Rheodyne (EUA) modelo 7725, com amostrador de 10 μ L; (2) detector espectrofotométrico de arranjo de diodos Waters (EUA) modelo 2475; (3) microcomputador Pentium III (Intel, EUA) com software controlador Millennium³² da marca Waters (EUA).

5.2.4 Procedimentos

A) Ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas

Para os estudos com os antimicrobianos SDA, SMX e SQX, foi preparada uma solução dessas sulfonamidas na concentração de 1 mg mL^{-1} em metanol (solução estoque). As demais soluções utilizadas (soluções de trabalho) foram sempre preparadas pela diluição adequada da solução estoque com metanol:água (1:1, v/v). Todas as soluções aquosas foram preparadas empregando água purificada obtida no sistema Milli-Q.

Para a otimização da separação desses compostos foi utilizada uma coluna PurospherStar[®] (50 mm x 4 mm) acoplada a coluna de guarda PurospherStar[®] (10 mm x 4 mm) ambas com partículas de $3,0 \mu\text{m}$ de sílica-C18. A otimização da separação foi realizada variando a temperatura, concentração e tipo de sais na fase aquosa, vazão e quantidade de modificador orgânico da fase móvel, tanto nos modos isocrático como de gradiente de eluição. A detecção foi realizada empregando detector DAD em comprimento de onda de 270 nm para as três sulfonamidas. Neste estudo foram utilizados volumes de $10 \mu\text{L}$ de uma solução composta pela mistura dos antimicrobianos na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e preparada em metanol:água (1:1, v/v).

Após o estabelecimento das condições cromatográficas foram preparadas soluções com a mistura das sulfonamidas citadas nas concentrações de 1, 2, 5,0, 10,0 e $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Essas soluções foram preparadas na fase móvel e $10 \mu\text{L}$ foram injetados na coluna cromatográfica nas condições otimizadas.

Para as curvas analíticas, os valores das áreas dos picos obtidos das concentrações de cada sulfonamida foram plotados em gráficos de concentração versus área para obtenção da equação da reta correspondente e do coeficiente de correlação linear (r) através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Para esses cálculos foram utilizados os programas estatísticos Origin 6.1

ou Excel 2003.

Para a determinação das sulfonamidas foram construídas somente curvas no solvente já que o objetivo foi avaliar e comparar a eficiência de extração dos procedimentos de SPE e E-SPE®.

B) Extração das sulfonamidas em leite

Para o teste de extração de antimicrobianos em leite foram utilizadas amostras de leite integral UHT, comercializada na região de Campinas, São Paulo.

As extrações da amostra de leite foram realizadas empregando um procedimento de SPE baseado no método apresentado por Mamani (2007) (Figura 5.3).

Os estudos de extração das amostras de leite empregaram sistemas tampões compostos pela mistura de soluções de ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico. Esses tampões foram preparados pela mistura de volumes adequados dessas duas soluções até a obtenção do pH desejado para os respectivos estudos. Os tampões receberam as seguintes denominações:

- tampão ACF 10/20, composto de ácido cítrico 10 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 20 mmol L⁻¹;
- tampão ACF 100/200, composto de solução de ácido cítrico 100 mmol L⁻¹ e fosfato de sódio bibásico 200 mmol L⁻¹.

Neste método, as primeiras etapas descritas na Figura 5.3 consistem em uma precipitação protéica de 5 mL de leite empregando solução de ácido tricloroacético e tampão ACF 100/200 com a separação do sobrenadante que continham em média 15 mL de líquido sobrenadante. Como essa etapa não era de interesse do procedimento a ser avaliado, várias alíquotas de 5 mL de leite foram submetidas a esse procedimento e as diversas alíquotas de 15 mL de sobrenadante obtidas foram reunidas para obter, deste modo, uma amostra homogênea em termos de composição total.

Essa amostra homogênea foi dividida em duas porções e uma dessas porções foi subdividida novamente em alíquotas de 15 mL para serem submetidas ao

procedimento de SPE e E-SPE[®]. Essas alíquotas foram extraídas sem a fortificação (adição) de sulfonamidas à amostra e dessa forma foram consideradas amostras branco de leite.

A segunda porção de amostra homogênea foi fortificada com SDA, SMX e SQX a fim de obter uma solução contendo $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada sulfonamida. Essas amostras fortificadas foram, então, separadas novamente em alíquotas de 15 mL para serem submetidas ao procedimento de extração.

Para o procedimento de condicionamento e lavagem a vazão empregada foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e para a eluição de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Os procedimentos de extração foram realizados empregando a SPE convencional e a E-SPE[®]. Nos procedimentos de E-SPE[®] o campo elétrico foi empregando tanto durante a aplicação da amostra como durante a etapa de lavagem.

Durante a aplicação da amostra foram utilizados campos elétricos com corrente elétrica constante de 30 mA. Já para a etapa de lavagem foram empregados campos elétricos com correntes elétricas constantes de 18 mA.

Após o processo de extração e ressuspensão a concentração teórica das sulfonamidas seria de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Neste estudo foram realizadas seis extrações: duas sem aplicação do campo elétrico SPE (■) ou (—), duas com o eletrodo superior como cátodo e eletrodo inferior como ânodo E-SPE[®]_{(-/+) (■) ou (—), além de duas extrações com o eletrodo superior como ânodo e eletrodo inferior como cátodo E-SPE[®]_{(+/-) (■) ou (—). Dessa forma, os resultados apresentados correspondem à média de dois valores (n = 2). A cada extração foi utilizando um cartucho novo preparado com 500 mg de sílica-C18 da marca Phenomenex.}}

Para as extrações empregou-se o cartucho tipo 1 com o eletrodo inferior i6 e superior s9, descritos na secção 3.2.4 B (página 26), além do sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos descrito na secção 3.2.4 A.

Para as extrações das sulfonamidas em amostras de leite não foi utilizado o sistema de fluxo bidirecional.

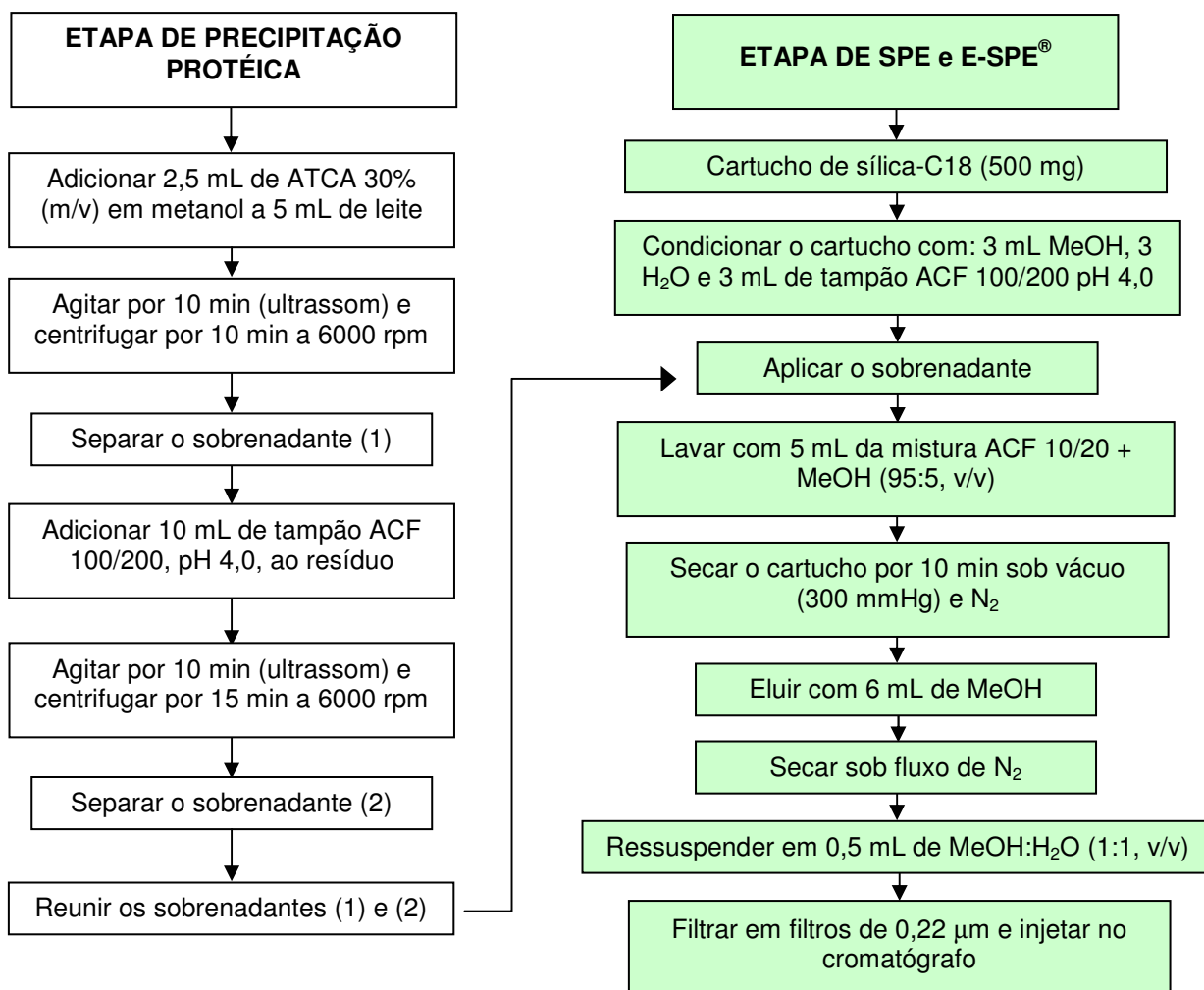


Figura 5.3. Etapas e condições do método empregado para extração de sulfonamidas em leite. ATCA = ácido tricloroacético; ACN = acetonitrila; MeOH = metanol.

Os valores de recuperação apresentados nos estudos de SPE e E-SPE® referem-se ao valor encontrado no eluato final da extração. Esse valor foi obtido pela fórmula:

$$(\text{concentração encontrada}/\text{concentração esperada}) \times 100$$

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Ajuste das condições cromatográficas e construção das curvas analíticas

Após a otimização dos parâmetros cromatográficos, ficaram estabelecidas as seguintes condições de separação para determinação das sulfonamidas em leite: (a) vazão de 1,0 mL min⁻¹; (b) amostrador de 10 µL; (c) temperatura da coluna de 40 °C; (d) fase móvel composta de: ácido fórmico 0,1% (v/v) (fase aquosa A) e ácido fórmico 0,1% (v/v) em metanol (fase orgânica B) no seguinte gradiente de eluição: A/B (95:5, v/v) por 4,5 minutos; 2 minutos de uma rampa linear para A/B (62:38, v/v); permanência dessa proporção por 4 minutos; 1 minuto de uma rampa linear para A/B (1:9, v/v); permanência dessa proporção por mais 13,5 minutos; 1 minuto de uma rampa linear para A/B (95:5, v/v); permanência dessa proporção por mais 4 minutos. Tempo total de corrida de 30 minutos.

Um cromatograma característico da separação de uma mistura das três sulfonamidas nestas condições é apresentado na Figura 5.4 e os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para os antimicrobianos sulfonamídicos nas condições otimizadas.

ANTIMICROBIANOS	k*	RESOLUÇÃO**	FATOR DE ASSIMETRIA*	NÚMERO DE PRATOS*
SDA	6,9	-	1,06	1191
SMX	13,6	11,5	1,13	55880
SQX	16,5	9,7	1,21	43075

*Valores segundo a USP, **calculados em função do pico que antecede o composto em avaliação; k = fator de retenção.

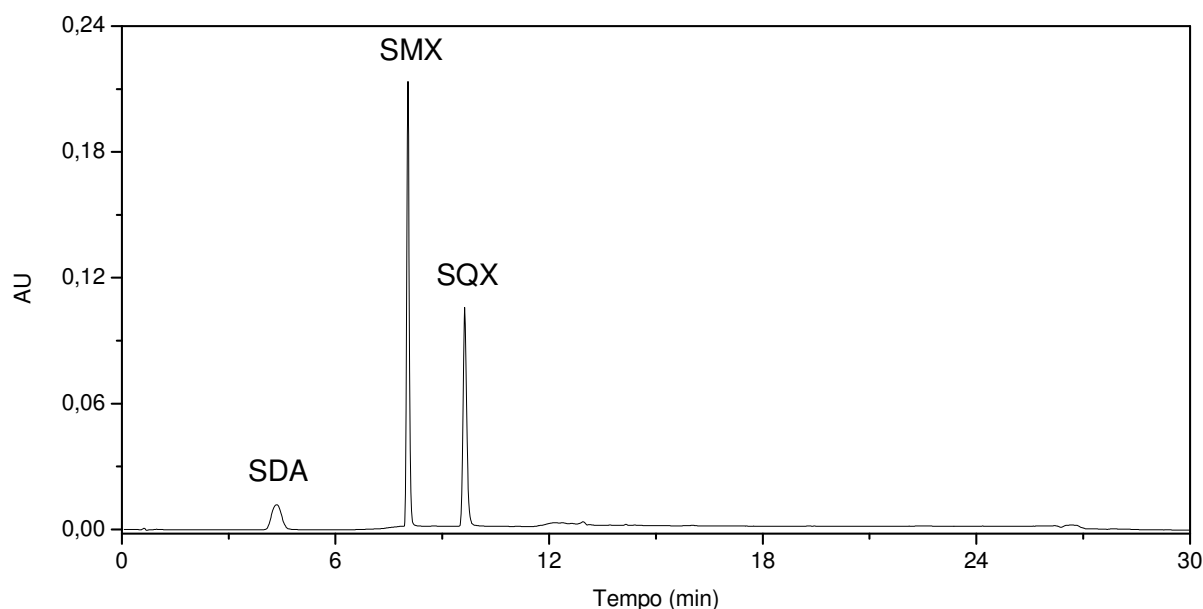


Figura 5.4. Separação cromatográfica das sulfonamidas por HPLC-DAD. Condições empregadas: coluna analítica (50 mm x 4 mm) acoplada a uma coluna de guarda (10 mm x 4 mm), ambas de sílica-C18 PurospherStar® e com partículas de 3 μm ; eluição por gradiente empregando ácido fórmico 0,1% (v/v) em água deionizada e ácido fórmico 0,1% (v/v) em metanol; volume de injeção de 10 μL ; detecção a 270 nm para as três sulfonamidas. Concentração das sulfaquinoxalinas: 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As curvas analíticas no solvente, obtidas empregando as condições cromatográficas otimizadas, apresentaram faixa linear entre 1,0 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação maiores que 0,999 (Tabela 5.2). A curva analítica obtida abrange de 10 a 100% da concentração esperada para as sulfonamidas no leite após a extração.

Para a determinação das sulfonamidas foi construída somente a curva no solvente já que o objetivo desta etapa foi avaliar somente a eficiência de extração dos procedimentos de SPE e E-SPE®.

Tabela 5.2. Parâmetros das curvas analíticas para os antimicrobianos sulfonamídicos.

ANTIMICROBIANOS	λ (nm)	FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EQUAÇÃO DA RETA	r
SDA	270	1 – 15	$y = 15432x - 370$	0,999
SMX	270	1 – 15	$y = 69260x - 651$	0,999
SQX	270	1 – 15	$y = 49070x + 169$	0,999

y = área do pico cromatografado; x = concentração do analito em $\mu\text{g mL}^{-1}$; λ = comprimento de onda de detecção.

Com o método cromatográfico estabelecido e a curva analítica determinada, foram iniciados os estudos de extração das sulfonamidas em leite com e sem aplicação de campo elétrico.

5.3.2 Extração de amostras branco de leite com e sem aplicação de campos elétricos

A primeira etapa das extrações dos antimicrobianos sulfonamídicos em amostras de leite compreendeu a avaliação de amostras branco, ou seja, amostras onde espera-se não encontrar os analitos de interesse. Como não é possível afirmar, com certeza, que as amostras não continham nenhum tipo de antimicrobiano, considerou-se branco aquelas que não apresentaram picos significativos nos tempos de retenção das sulfonamidas estudadas. Vale lembrar que, além da contaminação das amostras por antimicrobianos, as amostras de leite estão naturalmente repletas de outros interferentes provenientes da própria matriz como vitaminas, aminoácidos, peptídeos, lipídeos diversos, além de vários sais minerais [88]. Portanto, antes mesmo de determinar as sulfonamidas no leite foi preciso avaliar se outros componentes da matriz não iriam interferir na quantificação desses analitos, principalmente quando são empregados detectores pouco seletivos como o arranjo de diodos utilizado no presente método. Por esse mesmo motivo, foi empregado um gradiente mais longo que o necessário para a eluição das sulfonamidas (30 minutos) para permitir que todos interferentes eluissem da coluna antes de iniciar uma nova análise.

Outro fator importante a considerar da matriz branco é que a corrente elétrica durante a aplicação do campo elétrico possui, teoricamente, a capacidade de degradar compostos da matriz por eletrólise o que levaria ao surgimento de novos compostos ou mesmo a destruição dos analitos de interesse. Os resultados da aplicação do campo elétrico nas amostras de branco de leite são apresentados na Figura 5.5.

Ao analisarmos a Figura 5.5 podemos verificar a concordância entre os perfis dos cromatogramas das duplicatas de extração. Em quase todos os picos observados, nota-se as semelhanças tanto nos tempos de retenção, quanto na intensidade dos sinais de absorvância o que demonstra que a aplicação do campo elétrico em E-SPE[®] é um procedimento preciso. Isso também foi confirmado pelo perfil das correntes e dos potenciais elétricos monitorados nas duplicatas de extração (Figura 5.6).

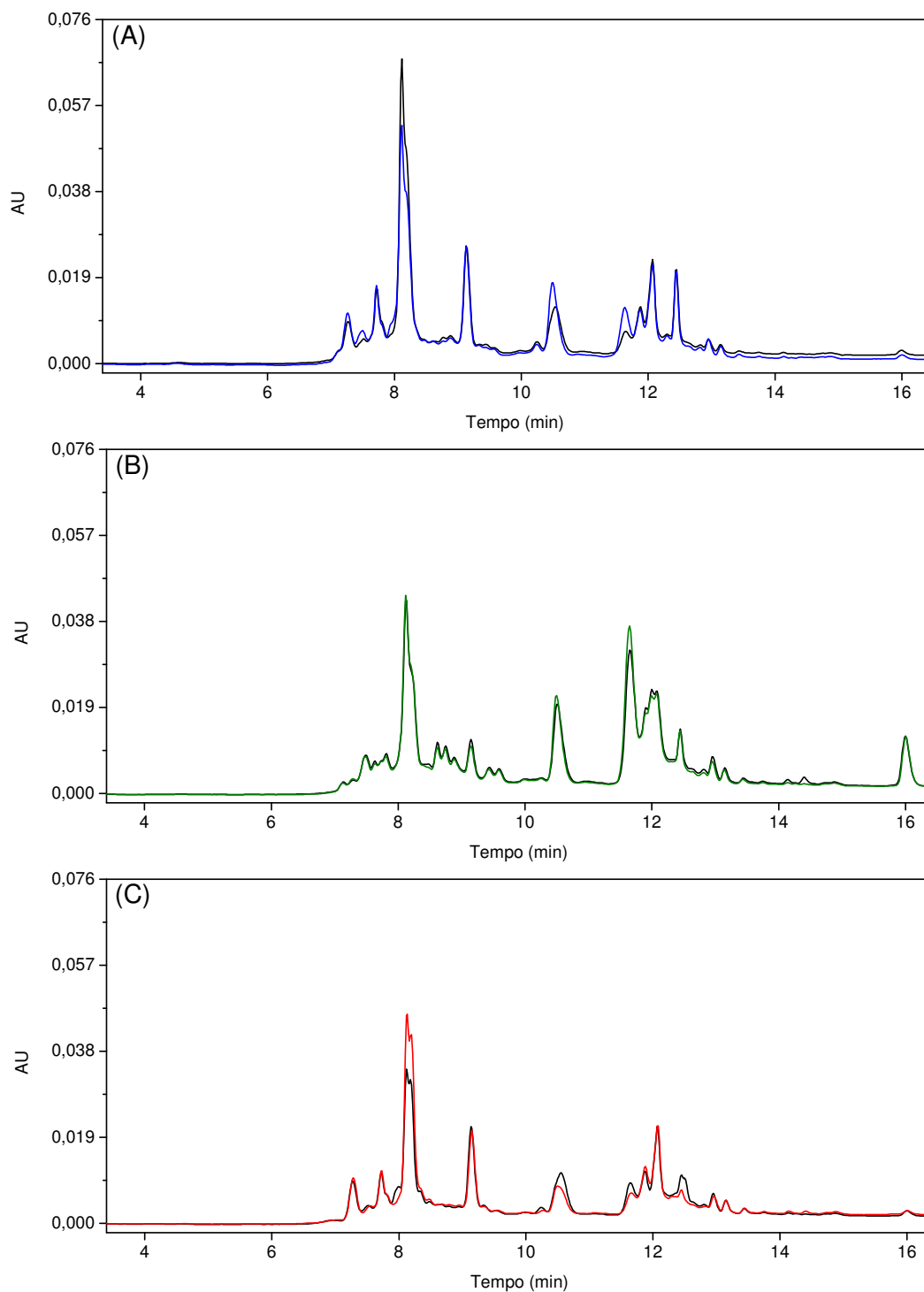


Figura 5.5. Cromatogramas das análises em duplicata ($n = 2$) de amostras branco de leite extraídas empregando os procedimentos de SPE (—) (A), E-SPE[®]_(-/+) (—) (B) e E-SPE[®]_(+/-) (—) (C). Detecção a 270 nm com os cromatogramas apresentados apenas para a região de detecção das sulfonamidas e dos principais interferentes.

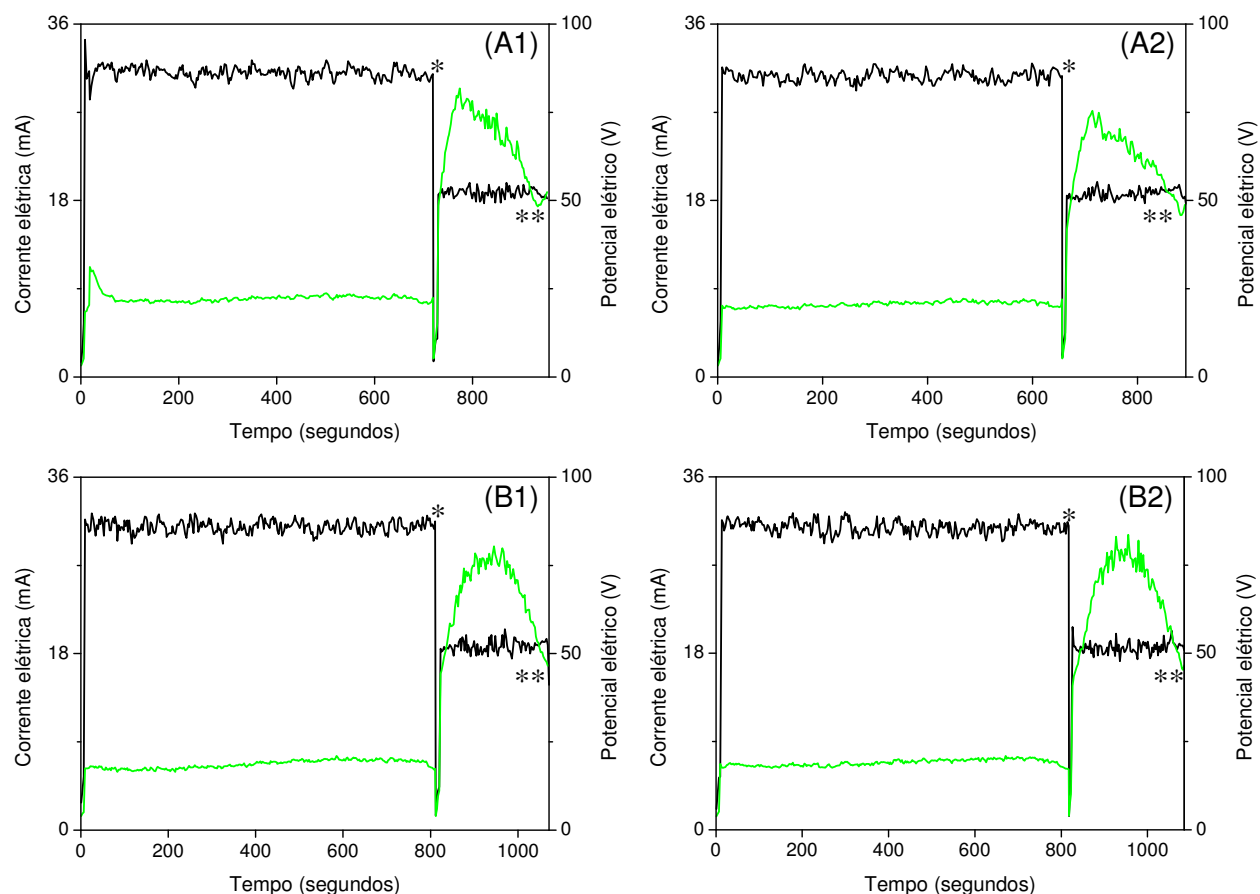


Figura 5.6. Perfil das correntes (—) e dos potenciais elétricos (—) monitorados durante a extração por E-SPE[®] de amostras branco de leite. Amostras analisadas em duplicada (n = 2) empregando a E-SPE[®]_{(-/+) (A1 e A2) e a E-SPE[®]_{(+/-) (B1 e B2) com a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante. * = fim da etapa de aplicação da amostra e início da etapa de lavagem; ** = fim da etapa de lavagem.}}

Além da repetibilidade das extrações das amostras branco de leite é importante ressaltar também a seletividade conferida pelo campo elétrico. Ao sobrepor os cromatogramas das extrações com e sem aplicação do campo elétrico podemos notar o incremento ou a diminuição da intensidade do sinal analítico de vários picos nos cromatogramas (Figura 5.7).

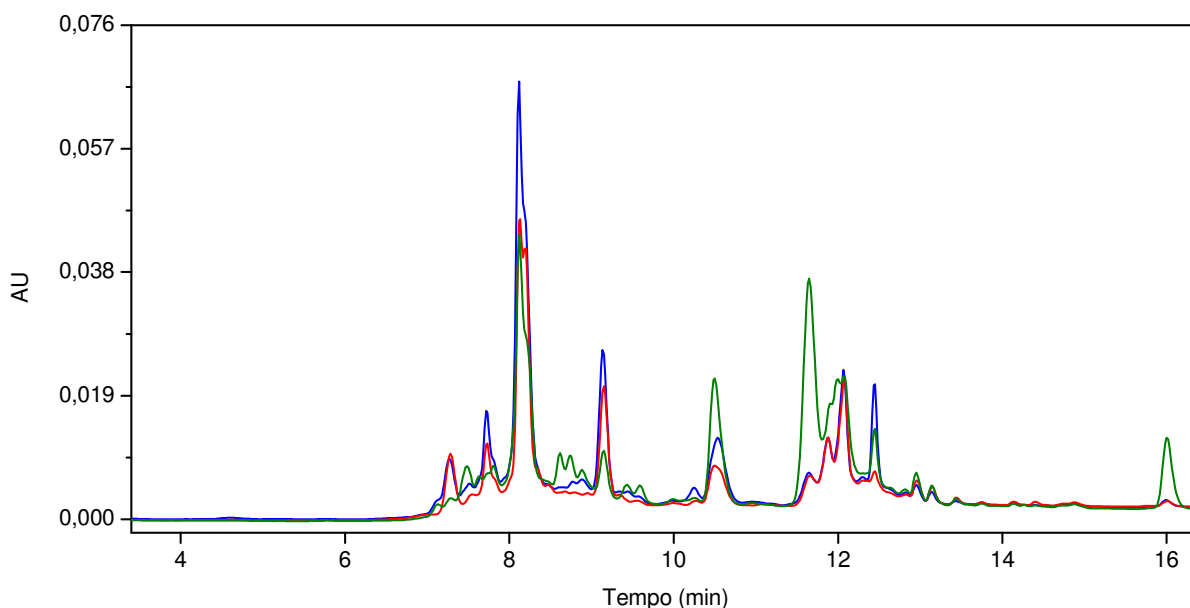


Figura 5.7. Comparação de três cromatogramas das análises de amostras branco de leite empregando os procedimentos de SPE (—), E-SPE[®]_(-/+) (—) e E-SPE[®]_(+/-) (—). Detecção a 270 nm com os cromatogramas apresentados apenas para a região de detecção das sulfonamidas e dos principais interferentes.

É importante destacar que os picos apresentados na Figura 5.7 tiveram seus sinais aumentados ou diminuídos em função da aplicação do campo elétrico, mas os tempos de retenção foram bastante coincidentes, o que indica que os mesmos não são provenientes de degradação provocada por eletrólise.

Todos os brancos das amostras apresentaram interferentes na região da detecção da sulfonamida SMX (8,0 minutos) e, por esse motivo, esse antimicrobiano não foi quantificado nos testes de extração em amostra de leite fortificado (Figura 5.8). Por outro lado, a sulfonamida SDA não apresentou, nas extrações em amostras de leite, recuperação significativa capaz de ser quantificada através das condições analíticas empregadas. Dessa forma, somente a sulfonamida SQX pôde ser determinada em amostras de leite fortificado com o procedimento experimental empregado.

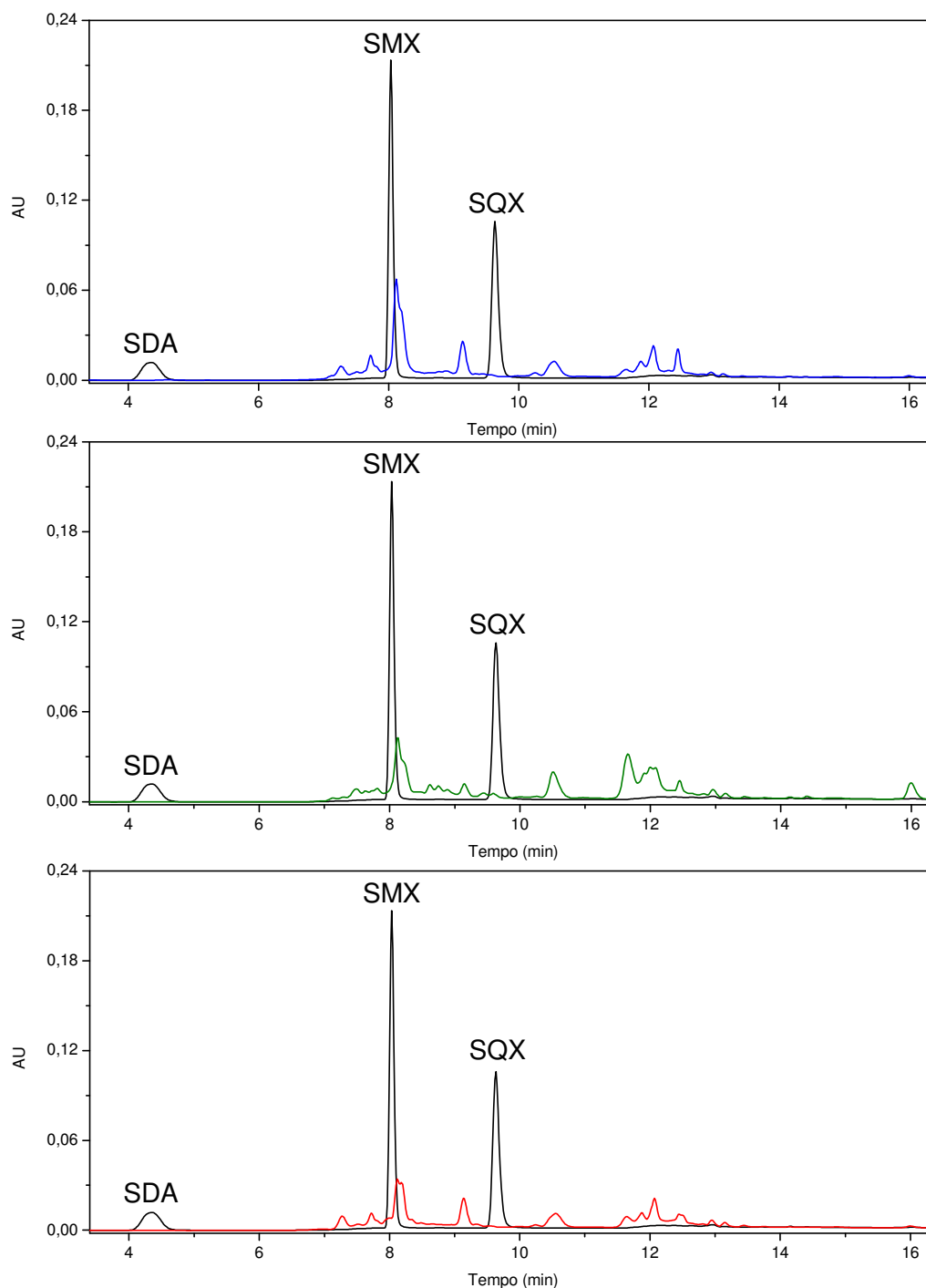


Figura 5.8. Sobreposição dos sinais analíticos provenientes da injeção direta no cromatógrafo de solução das sulfonamidas (—), com outros obtidos pela extração de amostras branco de leite empregando os procedimentos de SPE (—) (A), E-SPE[®] (-/+) (—) (B) e E-SPE[®] (+/-) (—) (C). Detecção a 270 nm com os cromatogramas somente para a região de detecção das sulfonamidas e dos principais interferentes. Concentração das sulfonamidas: $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondente a uma recuperação teórica de 100%.

5.3.3 Extração de sulfaquinoxalina em amostras de leite com e sem aplicação de campos elétricos

Empregando as mesmas condições de extração e análise das amostras branco de leite, foram realizadas extrações em amostras de leite fortificada com o antimicrobiano sulfaquinoxalina (SQX). Os resultados dessas extrações realizadas em duplicata ($n = 2$) são apresentados na Figura 5.9.

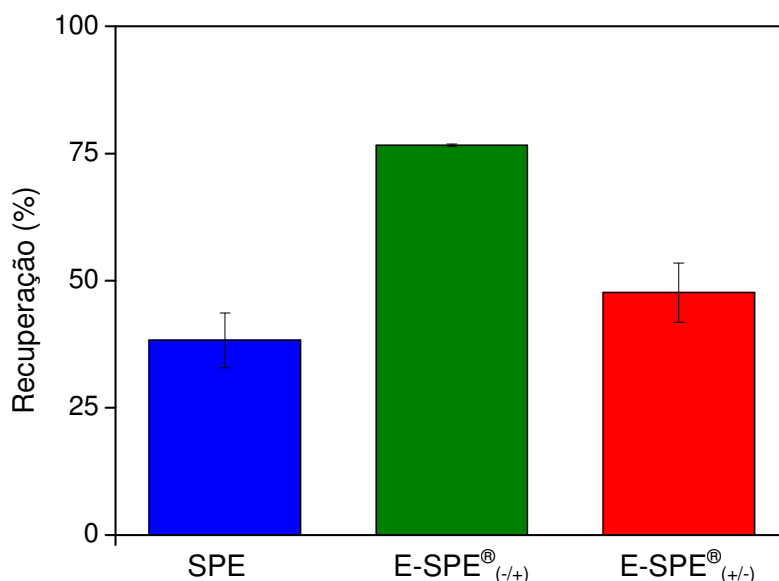


Figura 5.9. Recuperações médias ($n = 2$) da sulfonamida SQX extraída em amostra de leite. Amostra: 15 mL de extraído de leite fortificado com SQX ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições da lavagem: 5 mL de tampão ACF 10/20, pH 4,0, contendo 5% (v/v) de metanol, em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Assim como ocorreu na extração do corante catiônico safranina em solução tampão (Figuras 4.23 e 4.25, seções 4.3.11 e 4.3.12), o uso da E-SPE[®] resultou em maiores recuperações com aplicação da polaridade negativa (■) sobre o eletrodo superior. Como já foi mencionado, a SQX em pH 4,0, apresenta balanço de carga nulo e, dessa forma, não demonstra mobilidade eletroforética significativa. Contudo, outros possíveis fenômenos associados a E-SPE[®], como a polarização de concentração, que ainda não

são conhecidos ou descritos para compostos anfotéricos, poderiam atuar no processo de sorção da SQX no sorvente.

Além disso, é importante considerar que a solução extraída de leite possui uma série de compostos carregados como proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos e ácidos graxos que podem alterar o recobrimento da superfície da sílica e assim, anular ou, até mesmo, inverter a dupla camada elétrica. Esses interferentes podem também complexar-se com a sulfa, alterando o balanço de carga das mesmas. Esses fatos podem estar associados aos resultados de extração obtidos com a sulfonamida SQX nas amostras de leite.

Do mesmo modo como foi observado para as amostras branco, os perfis das correntes e dos potenciais elétricos monitorados nas replicatas de extração foram similares (Figura 1, Anexo 7).

Vale destacar aqui a diferença do perfil das correntes e dos potenciais elétricos apresentados na Figura 5.5 e na Figura 1 do anexo 7, em relação às demais avaliações por E-SPE[®]. Nos estudos com as amostras de leite o campo elétrico foi empregado tanto durante a etapa de aplicação da amostra no cartucho, quanto durante a etapa de lavagem. Durante a etapa de aplicação da amostra o campo elétrico foi aplicado no modo corrente constante de 30 mA ao passo que na etapa de lavagem a corrente foi reduzida para 18 mA. Essa estratégia foi adotada por dois motivos: o primeiro foi que a perda das sulfonamidas poderia estar ocorrendo durante a própria aplicação da amostra uma vez que o volume da mesma era alto (15 mL). O segundo motivo foi que a amostra aplicada, proveniente do sobrenadante da precipitação protéica do leite e composta por uma mistura complexa de sais, apresentava alta condutividade. Dessa forma, foi preciso empregar uma corrente elétrica relativamente alta (30 mA) para obter um potencial elétrico significativo. Já quando se iniciou a etapa de lavagem a condutividade da solução decaiu acentuadamente o que fez com que o potencial elétrico associado fosse maior, mesmo para a corrente elétrica de 18 mA empregada nesta etapa. Dessa forma, para que não houvesse um campo elétrico muito fraco durante a aplicação da amostra e/ou um aquecimento exagerado durante a lavagem, foram aplicadas correntes elétricas diferentes para cada etapa.

5.4 Conclusão

A E-SPE[®] foi aplicada na extração de amostras branco de leite e leite fortificado com os antimicrobianos SDA, SMX e SQX.

Neste estudo o campo elétrico conferiu seletividade diferenciada para diversos tipos de interferentes em ambas as polaridades aplicadas. Além disso, as replicatas de extrações resultaram em cromatogramas com perfis bastante semelhantes o que demonstra que, tanto o procedimento quanto os dispositivos empregados são capazes de produzir resultados precisos. O mesmo pode ser dito sobre a corrente e o potencial elétrico monitorados durante as extrações.

Entre as sulfonamidas estudadas, somente a SQX pôde ser quantificada. As extrações desse antimicrobiano em leite empregando a E-SPE[®] resultaram em recuperações até duas vezes superiores àquelas obtidas com o procedimento convencional.

Os resultados apresentados pela E-SPE[®] foram obtidos sem nenhuma otimização das condições eletrocromatográficas de extração e, dessa forma, resultados ainda melhores poderiam ser alcançados com testes adicionais.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

6. Conclusões

A fim de promover a aplicação de campos elétricos em procedimentos de SPE, foi necessário desenvolver diversos dispositivos que não se encontram disponíveis comercialmente, incluindo os eletrodos, os cartuchos, o sistema para monitoramento e controle dos parâmetros eletrocromatográficos e o “manifold” para múltiplas extrações. Todos esses dispositivos demonstraram ser adequados aos objetivos propostos e foram capazes de produzir campos elétricos estáveis e com repetibilidade adequada.

O estudo do efeito do campo elétrico sobre o pH da solução eluente evidenciou que pode haver uma mudança significativa da acidez e basicidade do meio decorrente da eletrólise do solvente, mas que esse problema é prontamente solucionado com o tamponamento adequado da solução ou, de forma alternativa, com o emprego da proposta do fluxo bidirecional.

O estudo do aumento da temperatura no interior do cartucho durante a aplicação do campo elétrico comprovou que, em E-SPE[®], este fenômeno é aceitável e não representa uma limitação ou uma fonte de erros ao sistema.

Os experimentos de extração com compostos modelo diversos demonstraram, em todas as situações avaliadas, que o campo elétrico é capaz de promover, dependendo das condições utilizadas e das características dos analitos, a redução ou o favorecimento da eluição dos compostos em solução, o que pode ser explorado para elevar a recuperação dos analitos de interesse e/ou promover a retirada mais eficiente de interferentes.

De forma geral, os modelos aniônicos E 102, E 123, E 110 e E 129 revelaram que o uso do campo elétrico com o eletrodo superior catódico é capaz de forçar a eluição dos compostos do cartucho. Em contrapartida, o uso do campo elétrico com o eletrodo superior anódico, onde se esperava favorecer a recuperação destes compostos, não apresentou em nenhum momento, nas condições empregadas, o resultado esperado.

Um efeito oposto aos apresentados pelos compostos aniônicos foi observado para o modelo catiônico SAF durante os estudos do volume e da concentração da solução empregada na etapa de lavagem. Nestas ocasiões ambas as polaridades

dos eletrodos ocasionaram maiores recuperações desse analito catiônico.

A E-SPE[®] também foi avaliada em uma aplicação com amostra de leite que é considerada uma matriz complexa. Nesta oportunidade o uso do campo elétrico demonstrou influenciar tanto a recuperação do antimicrobiano SQX adicionado a matriz como também, a eliminação de interferentes. Mesmo com a SQX apresentando mobilidade eletroforética teórica nula nas condições estudadas, a eficiência de extração dessa sulfonamida foi duplicada com a aplicação do campo elétrico em comparação ao procedimento convencional.

A recuperação obtida com a E-SPE[®] empregada na etapa de lavagem é uma combinação dos processos cromatográficos e eletroforéticos que atuam simultaneamente e incluem: convecção, difusão, migração eletroforética e fluxo eletrosmótico. Além desses, existe também a possibilidade de ocorrer o chamado efeito de polarização da concentração que ocasiona a exclusão de coíons e inclusão de contra-íons no interior dos poros das partículas.

Os resultados de recuperação de E-SPE[®], em função da polaridade dos eletrodos, apresentados neste trabalho, são indícios de que, além dos fenômenos de migração eletroforética e fluxo eletrosmótico, possivelmente, efeitos de retenção, que podem estar associados à polarização de concentração no interior das partículas, devem contribuir ao processo.

CAPÍTULO VII – PERSPECTIVAS FUTURAS

7. Perspectivas futuras

A E-SPE[®] é um procedimento que, teoricamente, não está limitado a um tipo de matriz ou classe de analito e sua aplicação pode ser estendida para extração de compostos inorgânicos, macromoléculas (proteínas, peptídeos, polímeros) ou mesmo compostos quirais, tanto em matrizes de alimentos como matrizes biológicas como solos, plantas, tecidos e secreções diversas.

A princípio, outros materiais sorventes como os MIP, RAM, de imunoafinidade e poliméricos também podem apresentar respostas superiores empregando campos elétricos.

O uso da E-SPE[®] abre perspectivas também em relação à redução do uso de solventes, assim como a diminuição do tempo de extração. Ela é capaz de proporcionar tanto uma diminuição da quantidade de sorvente empregado, em função do aumento da eficiência de extração obtida, como também permite a utilização de cartuchos com leitos mais longos uma vez que o aquecimento diminui a viscosidade das amostras. O aquecimento ocasionado durante o processo pode também ser explorado para proporcionar seletividade diferenciada, tanto de compostos iônicos como de compostos neutros.

Além das outras aplicações da E-SPE[®] descritas acima, existe também a necessidade de estudos dos mecanismos eletrocromatográficos envolvidos no processo. Como a E-SPE[®] possui características operacionais distintas, como força do campo elétrico, vazão, tipos de materiais, densidade de recheio, tamanho dos poros e distribuição espacial do sorvente, modelos próprios ou no mínimo ajustados a essa nova técnica de extração precisarão ser propostos.

Finalmente, será preciso também que dispositivos simplificados e de baixo custo sejam desenvolvidos e estejam disponíveis comercialmente para que a E-SPE[®] possa se tornar acessível e seja avaliada e utilizada por outros grupos de pesquisa.

CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências bibliográficas

- [1] KRULL, I.S.; MISTRY, K.; STEVENSON, R.L.; SWARTZ, M.E. *Capillary electrochromatography and pressurized flow capillary electrochromatography : an introduction*, Editora HMB, Nova York, 2000.
- [2] MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. ***Química Nova***, v.32, p.214-222, 2009.
- [3] HENNION, M-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. ***Journal of Chromatography A***, v.856, p.3-54, 1999.
- [4] VERAART, J.R.; LINGEMAN, H.; BRINKMAN, U. A. TH. Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis. ***Journal of Chromatography A***, v.856, p.483-514, 1999.
- [5] QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. ***Química Nova***, v.24, p.68-76, 2001.
- [6] LANÇAS, F. M. *Extração em fase sólida*. Editora Rima, São Carlos, SP, 2004.
- [7] GOSETTI, F.; MAZZUCCOA, E.; ZAMPIERIA, D.; GENNAROA, M .C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. ***Journal of Chromatography A***, v.1217, p.3929-3937, 2010.
- [8] GIL, E.S. *Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos*. 2° ed., Editora Pharmabooks, São Paulo, SP, 2007.
- [9] SMITH, G. A.; LLOYD, T. L. Automated solid-phase extraction and sample preparation – Finding the right solution for your laboratory. ***LC GC-Magazine of Separation Science***, v. 22, 1998.
- [10] MAJORS, R. E. An overview of sample preparation. ***LC GC-Magazine of Separation Science***, v.9, p.16, 1991.
- [11] PAWLISZYN, J. Sample preparation: quo vadis? ***Analytical Chemistry***, v.75, p.2543-2558, 2003.
- [12] KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. ***Trac-Trends in Analytical Chemistry***, v.22, p.232-244, 2003.
- [13] MARTIN, G.; M.; BOUVIER, E.S.P.; COMPTON, B.J. Advances in sample

preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods. **Journal of Chromatography A**, v.909, p.111-135, 2001.

[14] NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v.656, p.8-35, 2009.

[15] AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. **Trac-Trend Analytical Chemistry**, v.21, p.428-438, 2002.

[16] TELEPCHAK, M. J.; AUGUST, T.F.; CHANEY, G. *Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction*. Humana Press, Totowa, NJ, 2004.

[17] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2. ed., John Wiley Professional, New York, 1997.

[18] SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J-L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. **Journal of Chromatography A**, v.801, p.141-156, 2004.

[19] MOLDOVEANU, S.C.; DAVID, V. *Sample Preparation in Chromatography*. Elsevier Science, Amsterdam, 2002.

[20] FONTANALS, N.; MARCÉ, R.M.; BORRULL, F. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v.1152, p.14-31, 2007.

[21] BOOS, K. S.; GRIMM, C. H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings. **Trac-Trend Analytical Chemistry**, v.18, p.175-180, 1999.

[22] CASSIANO N.M.; BARREIRO, J.C.; MORAES, M.C.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. **Bioanalysis**, v.1, p.577-594, 2009.

[23] TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v.28, p.1076-1086, 2005.

[24] FRITZ, J.S.; MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v.902, p.137-166, 2000.

[25] ROSSI, D. T.; ZHANG, N. Automating solid-phase extraction: current aspects and

future prospects. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.97-113, 2000.

[26] MORALES-CID, G.; CÁRDENAS, S.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Sample treatments improved by electric fields. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v.29, p. 158-165, 2010.

[27] GBATU, T.P.; CEYLAN, O.; SUTTON, K.L.; RUBINSON, J.F.; GALAL, A.; CARUSO, J.A.; MARK, H.B. Electrochemical control of solid phase microextraction using unique conducting polymer coated fibres. **Analytical Communication**, v.36, p.203-205, 1999.

[28] YATES, B.J.; TEMSAMANI, K.R.; CEYLAN, Ö.; ÖZTEMİZ, S.; GBATU, T.P.; LARUE, R.A.; TAMER, U.; MARK, H.B. Electrochemical control of solid phase microextraction: conducting polymer coated film material applicable for preconcentration/analysis of neutral species. **Talanta**, v.58, p.739-745, 2002.

[29] LILJEGREN, G.; PETTERSSON, J.; MARKIDES, K.E.; NYHOLM, L. Electrochemical solid-phase microextraction of anions and cations using polypyrrole coatings and an integrated three-electrode device. **The Analyst**, v.127, p.591-597, 2002.

[30] LILJEGREN, G.; NYHOLM, L. Electrochemically controlled solid-phase microextraction and preconcentration using polypyrrole coated microarray electrodes in a flow system. **The Analyst**, v.128, p.232-236, 2003.

[31] LILJEGREN, G.; FORSGARD, N.; ZETTERSTEN, C.; PETTERSSON, J.; SVEDBERG, M.; HERRANEN, M.; NYHOLM, L. On-line electrochemically controlled solid-phase extraction interfaced to electrospray and inductively coupled plasma mass spectrometry. **The Analyst**, v.130, p.1358-1, 2005.

[32] MORALES-CID, G.; SIMONET, B.M.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Electrical field-assisted solid-phase extraction coupled on-line to capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v.29, p.2033-40, 2008.

[33] KEIM, C.; LADISCH, M. New system for preparative electrochromatography of proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v.70, p.72-81, 2000.

[34] COLE, K.D.; CABEZAS, H.JR. Improved preparative electrochromatography column design. **Journal of Chromatography A**, v.760, p.259-263, 1997.

[35] LIU, Z.; YIN, G.; FENG, S.; WANG, D.; DING, F.; YUAN, N. Oscillatory electroosmosis-enhanced intra/inter-particle liquid transport and its primary applications in the preparative electrochromatography of proteins. **Journal of Chromatography A**, v.921, p.93-98, 2001.

[36] TAN, G.; SHI, Q.; SUN, Y. Retention behavior of proteins in size-exclusion

electrochromatography with a low-voltage electric field perpendicular to the liquid phase streamline. **Electrophoresis**, v.26, p.3084-93, 2005.

[37] TAN, G-M.; SHI, Q-H.; SUN, Y. Oscillatory transverse electric field enhances mass transfer and protein capacity in ion-exchange electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1098, p.131-137, 2005.

[38] RATHORE, A.S. Joule heating and determination of temperature in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography columns. **Journal of Chromatography A**, v.1037, p.431-443, 2004.

[39] ALFENAS, A.C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Editora UFV, Viçosa, MG, 1998.

[40] ATKINS, P. *Fundamentos de físico-química*, 3° ed., Editora LTC, Rio de Janeiro, RJ, 2003.

[41] ORLANDO, R. M.; RATH, S. Dispositivo com válvulas e vias para controle do sistema de extração em fase sólida manifold. 2009. BR Pat. 18090056725, 2009.

[42] ORLANDO, R. M.; RATH, S. Dispositivo com uma pluralidade de válvulas e vias para controle do sistema de extração em fase sólida manifold. BR Pat. 18090056147, 2009.

[43] ORLANDO, R. M.; RATH, S.; ROHWEDDER, J. J. R. Dispositivo tipo “manifold” para extração em fase sólida com câmaras e válvulas individualizadas para controle por bomba peristáltica e/ou por vácuo total, do eluato. BR Pat. 18110005366; 2011.

[44] NISCHANG, I.; SPANNMANN, K.; TALLAREK, U. Key to analyte migration and retention in electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v.78, p.3601-3608, 2006.

[45] THOMPSON, C. O.; TRENERRY, V. C. Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.704, p.195-202, 1995.

[46] FRAZIER, R.A.; INNS, E.L.; DOSSI, N.; AMES, J.M.; NURSTEN, H.E. Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. **Journal of Chromatography A**, v.876, p. 213-220, 2000.

[47] PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J.L. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.898, p.271-275, 2000.

[48] PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J.L. Determination of the dissociation constants of sulfonated azo dyes by capillary zone electrophoresis and spectrometry

methods. **Journal of Chromatography A**, v.917, p.331-336, 2001.

[49] HUANG, H-Y.; SHIH, Y-C.; CHEN, Y-C. Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.959, p.317-325, 2002.

[50] DOSSI, N.; PICCIN, E.; BONTEMPELLI, G.; CARRILHO, E.; WANG, J. Rapid analysis of azo-dyes in food by microchip electrophoresis with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v.28, p.4240-4246, 2007.

[51] RYVOLOVÁ, M.; TÁBORSKÝ, P.; VRÁBEL, P.; KRÁSENSKÝ, P. PREISLER, J. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1141, p.206-211, 2007.

[52] PRADO, M.A.; GODOY, H.T. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó de gelatina. **Química Nova**, v.27, p.22-26, 2004.

[53] MA, M.; LUO, X.; CHEN, B.; SU, S.; YAO, S. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1103, p.170-176, 2006.

[54] MINIOTI, K.S.; SAKELLARIOU, C.F.; THOMAIDIS, N.S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Analytical Chimica Acta**, v.583, p.103-110, 2007.

[55] VACHIRAPATAMA, N.; MAHAJAROENSIRI, J.; VISESSANGUAN, W. Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by high performance liquid chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.16, p.77-82, 2008.

[56] ALVES, S. P.; BRUM, D. M.; ANDRADE, E. C. B.; NETTO, A. D. P. Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. **Food Chemistry**, v.107, p.489-496, 2008.

[57] YOSHIOKA, N.; ICHIHASHI, K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. **Talanta**, v.74, p.1408-1413, 2008.

[58] KIERNAN, J.A. *Histological and histochemical methods*. 4ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY, 2008.

[59] NEUMANN, M.G.; GESSNER, F.; CIONE, F.G.A.P.P.; SARTORI, R.A.;

CAVALHEIRO, C.C.S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, v.23, p.818-824, 2000.

[60] RAUF, M.A.; ASHRAF, S.S. Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. **Chemical Engineering Journal**, v.151, p.10-18, 2009.

[61] FERNÁNDEZ, C.; LARRECHI, M.S. CALLAO, M.PILLAR. An analytical overview of processes for removing organic dyes from wastewater effluents. **Trends in Analytical Chemistry**, v.29, p.1202-1211, 2010.

[62] GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Effect of the density of the C18 surface coverage on the adsorption mechanism of a cationic compound and on the silanol activity of the stationary phase in reversed phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1132, p.51-66, 2006.

[63] KANETA, T.; TANAKA, S. TAGA, M. Effect of cetyltrimethylammonium chloride on electroosmotic and electrophoretic mobilities in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.653, p.313-319, 1993.

[64] GALCERAN, M.T.; PUIGNOU, L.; DIEZ, M. Comparison of different electroosmotic flow modifiers in the analysis of inorganic anions by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.732, p.167-174, 1996.

[65] KOESUKWIWAT, U.; JAYANTA, S.; LEEPIPATPIBOON, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A**, v.1149, p.102-111, 2007.

[66] FDA. Food and Drug Administration. Disponível em:< <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2010.

[67] USP XXVIII, THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. The National Formulary, 28th ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2005.

[68] LEINWEBER, F.C.; PFAFFERODT, M.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; TALLAREK, U. Electrokinetic effects on the transport of charged analytes in biporous media with discrete ion-permselective regions. **Analytical Chemistry**, v.77, p.5839-5850, 2005.

[69] COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 2006.

- [70] MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v.33, p.1559-1568, 2010.
- [71] HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RAYMOND, W. R.; GILMAN, A. G. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9. ed., McGraw-Hill, New York, 1996.
- [72] ZANINI, A. C.; BASILE, A. C.; FOLLADOR, W.; OGA, S. *Guia de medicamentos*. 2^o ed, Editora Ipex, São Roque, SP, 1997.
- [73] POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; MITROWSKA, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1087, p.259-264, 2005.
- [74] HELLER, D.N.; NOCHETTO, C.B.; RUMMEL, N.G.; THOMAS, M.H. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and β -lactam residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.5267-5278, 2006.
- [75] GRANELLI, K.; BRANZELL, C. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.586, p.289-295, 2007.
- [76] JUAN-GARCÍA, A.; FONT, G.; PICÓ, Y. Simultaneous determination of different classes of antibiotics in fish and livestock by CE-MS. **Electrophoresis**, v.28, p.4180–4191, 2007.
- [77] LI, C., JIANG, H-Y., ZHAO, S-J., ZHANG, S-X., DING, S-Y., LI, J-C., LI, X.W.; SHEN, J-Z. Simultaneous Determination of fluoroquinolones and sulfonamides in chicken muscle by LC with fluorescence and UV detection. **Chromatographia**, v.68, p.117-121, 2008.
- [78] FORTI, A.F.; SCORTICHINI, G. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.637, p.214-219, 2009.
- [79] MARTÍNEZ, F.; GÓMEZ, A. Thermodynamic Study of the solubility of some sulfonamides in octanol, water, and the mutually saturated solvents. **Journal of Solution Chemistry**, v. 30, p. 909-923, 2001.
- [80] MAMANI, M.C.V. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Tese de doutorado, UNICAMP.

Campinas, SP, 2007.

[81] MAMANI, M.C.V.; AMAYA-FARFAN, J.; REYES, F.G.R.; SILVA, J. A. F.; RATH, S. Use of experimental design and effective mobility calculations to develop a method for the determination of antimicrobials by capillary electrophoresis. **Talanta**, v.76, p.1006-1014, 2008.

[82] LIN, C-E.; CHANG, C-C.; LIN, W.C. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis I. Influence of buffer pH and electrolyte modifier. **Journal of Chromatography A**, v.755, p. 261-269, 1996.^c

[83] LIN, C-E.; CHANG, C-C.; LIN, W.C. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis III. Citrate buffer as a background electrolyte. **Journal of Chromatography A**, v.768, p. 105-112, 1997.^b

[84] LIN, C-E.; CHANG, C-C.; LIN, W.C. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis II. Positively charged species at low pH. **Journal of Chromatography A**, v.759, p.203-209, 1997.^a

[85] MAMANI, M.C.V, REYES, F.G.R.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v.117, p.545–552, 2009.

[86] ORTELLI, D., COGNARD, E., JAN, P.; EDDER, P. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.2363–2374, 2009.

[87] TURNIPSEED, S.B., WENDY C. ANDERSEN, W.C., KARBIWNYK, C.M., MADSON, M.R.; MILLER, K.R. Multi-class, multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.22, p.1467–1480, 2008.

[88] ROSSI, D.T.; WRIGHT, D.S. Analytical considerations for trace determinations of drugs in breast milk. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, p.495-504, 1997.

ANEXOS

Anexo 1

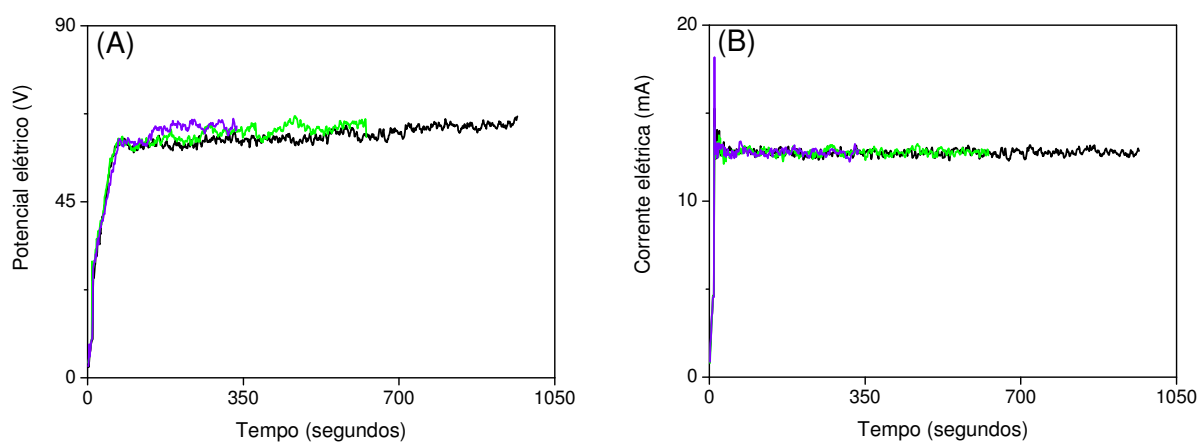


Figura 1. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito do volume de solução de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = 5 mL; (—) = 10 mL e (—) = 15 mL. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

Anexo 2

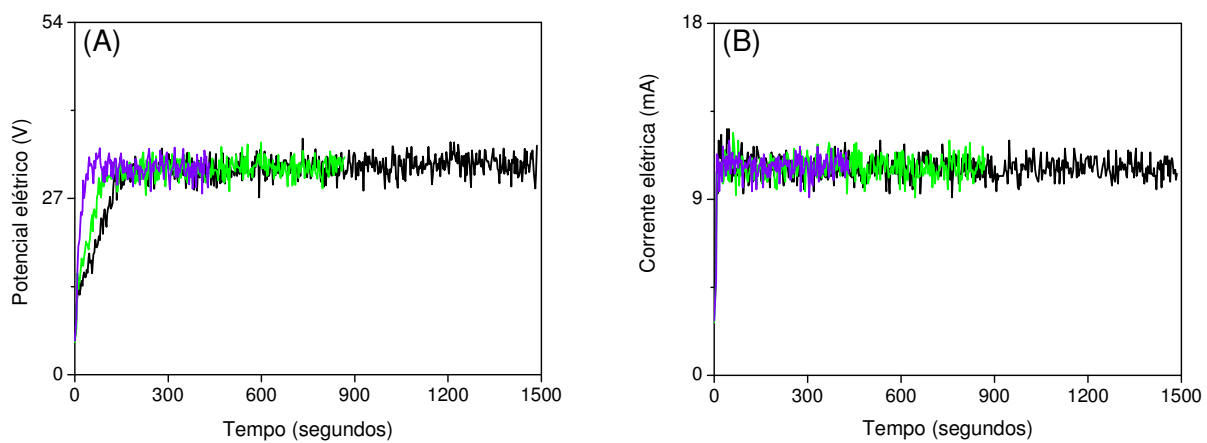


Figura 1. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito da vazão empregada na etapa de lavagem sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE®. (—) = 0,5 mL min⁻¹; (—) = 0,75 mL min⁻¹ e (—) 1,5 mL min⁻¹. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

Anexo 3

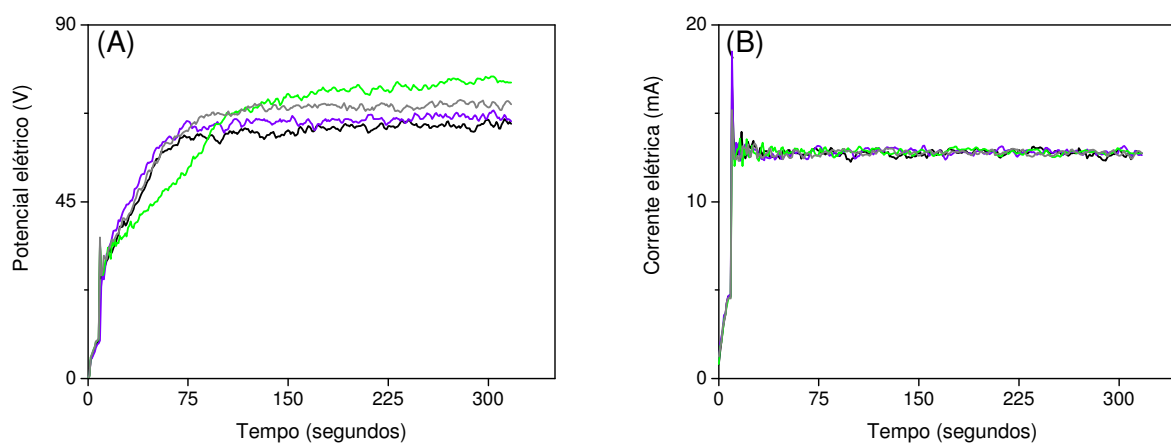


Figura 1. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito do material sorvente empregado no preparo dos cartuchos sobre a recuperação dos corantes aniônicos, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = Varian; (—) = Applied; (—) = Phenomenex e (—) = Waters . Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 12 mA.

Anexo 4

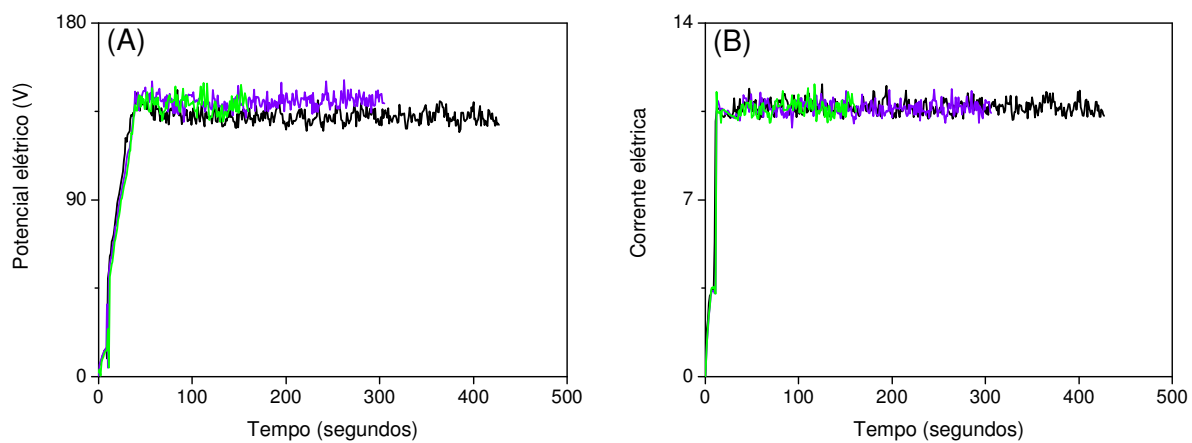


Figura 1. Potenciais (A) e correntes elétricas (B) típicos, monitorados durante o estudo do efeito do volume de solução de lavagem sobre a recuperação do corante catiônico SAF, em procedimentos de E-SPE[®]. (—) = 3 mL; (—) = 5 mL e (—) = 8 mL. Fonte de eletroforese empregada no modo corrente elétrica constante de 10 mA.

Anexo 5

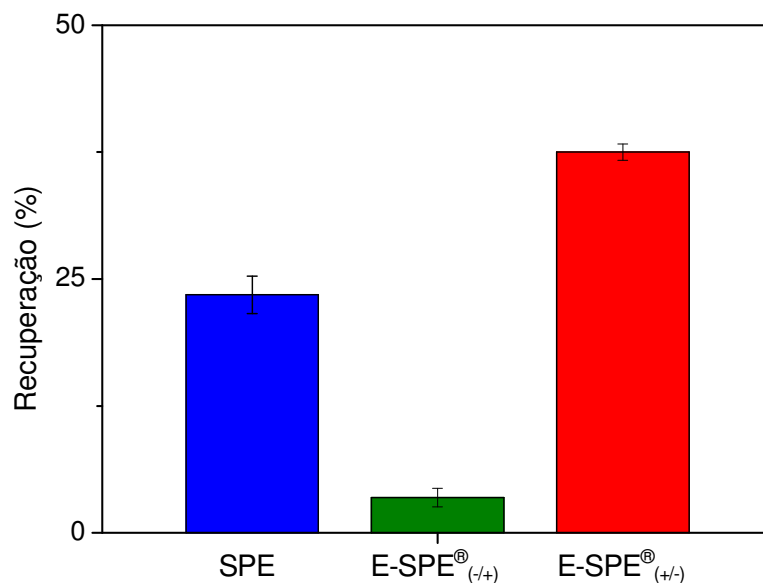


Figura 1. Recuperação média ($n = 2$) do corante aniônico E 110 (amarelo crepúsculo) em extrações empregando a SPE e a E-SPE[®] com potenciais elétricos de 115 V. Amostra: 1 mL de solução do corante ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão ACF 2/4, contendo 10% (v/v) de metanol. Condições da lavagem: 5 mL de tampão ACF 2/4, pH 4,0, contendo 10% (v/v) de metanol e em vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Anexo 6

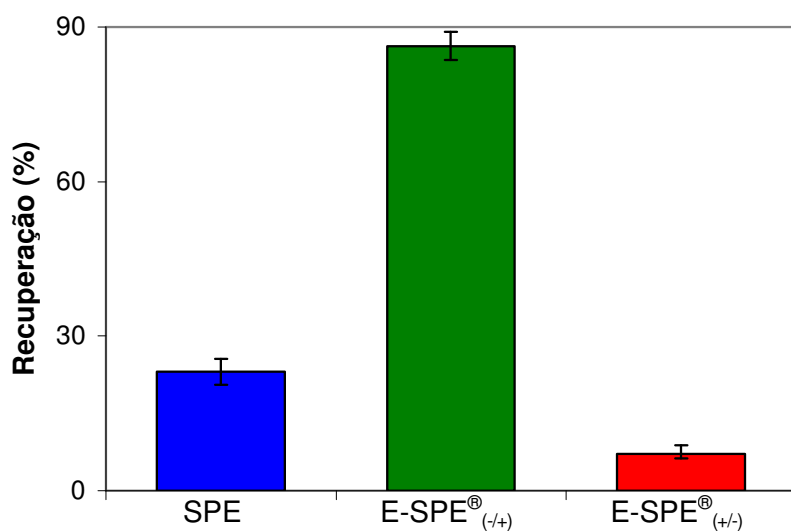


Figura 1. Recuperação média ($n = 3$) do corante catiônico azul de metileno em extrações empregando a SPE e a E-SPE[®] com potenciais elétricos de 200 V. Amostra: 2 mL de solução do corante ($5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão citrato 10 mmol L^{-1} , pH 4,7, contendo 0,9% (m/v) e 15% (v/v) de 2-propanol. Condições da lavagem: 5 mL de tampão citrato $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 4,68 adicionado de 30% de 2-propanol, e em vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. Sorvente: 500 mg de sílica-C18.

Anexo 7

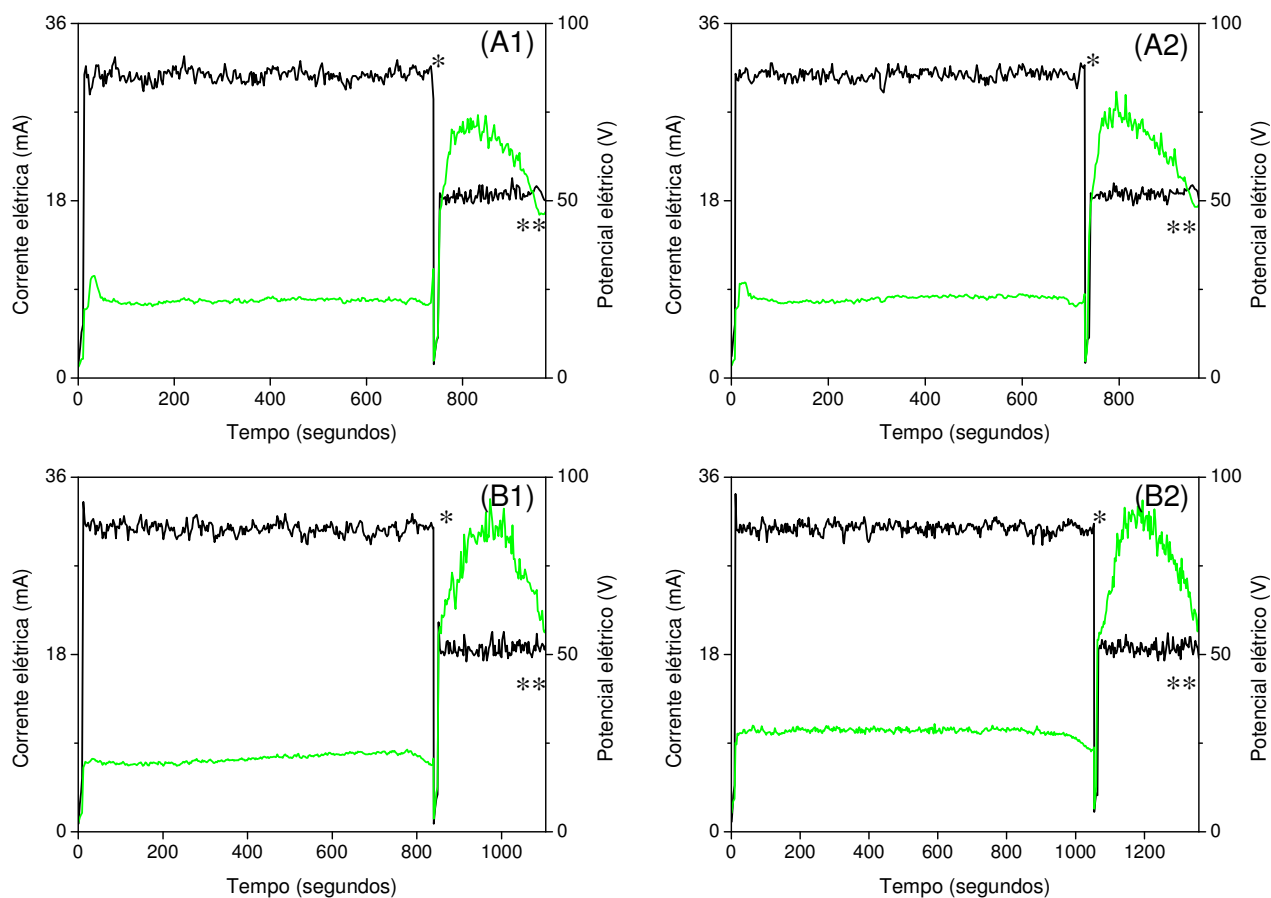


Figura 1. Perfil das correntes elétricas (—) e dos potenciais elétricos (—) monitorados durante a extração por E-SPE[®] de amostras de leite fortificadas com a SQX. Amostras analisadas em duplicada ($n = 2$) empregando a E-SPE[®]_{(-/+) (A1 e A2) e a E-SPE[®]_{(+/-) (B1 e B2) com a fonte de eletroforese no modo corrente elétrica constante. * = fim da etapa de aplicação da amostra e início da etapa de lavagem; ** = fim da etapa de lavagem.}}