

Desenvolvimento de Métodos Analíticos Espectrofluorimétricos e Eletroanalíticos para Compostos de Interesse Farmacológico: Determinação de Azaarenos Básicos por Eletroforese Capilar de Zona.

Aluna: Renata Kelly Silva Martins

Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio

Introdução

Compostos nitrogenados em petróleo e derivados

Moléculas nitrogenadas estão frequentemente presentes em combustíveis fósseis, geralmente associadas à porção orgânica do material cru. Normalmente, o teor de nitrogênio no petróleo é baixo, variando entre 0,1 e 0,9% em massa, apesar de certos trabalhos indicarem que alguns óleos podem conter quantidades superiores a 2,0%. Os níveis de nitrogênio podem chegar a $15 \mu\text{g g}^{-1}$ em querosene usado como combustível de aviação, sendo a maior parte constituída de compostos nitrogenados básicos [1].

Nas refinarias, os compostos nitrogenados, principalmente os básicos, podem provocar o envenenamento de catalisadores nas unidades de craqueamento, contribuindo também para a formação de gomas em alguns produtos, tais como óleo combustível [2]. O nitrogênio ligado a compostos orgânicos causa sérios problemas durante a conversão do petróleo em derivados, especialmente quando os níveis excedem 0,5% em massa, como ocorre frequentemente no óleo pesado e betume. A titulação potenciométrica dessas amostras em meio não-aquoso mostra que o nitrogênio básico pode representar uma fração superior a 35% em massa do nitrogênio total contido no petróleo, óleo pesado e betume [2].

Os compostos nitrogenados são considerados como indesejáveis devido aos problemas que causam durante o refino do petróleo, além de afetar de

forma adversa a estabilidade do produto. Esses compostos causam envenenamento do catalisador, facilitam as reações de oxidação, formando gomas e causando mau cheiro, além de contribuírem para as emissões gasosas, causando poluição atmosférica. Compostos nitrogenados, especialmente as moléculas contendo nitrogênio básico, foram relatados por terem um impacto negativo na estabilidade da oxidação dos combustíveis de aviação e óleos lubrificantes [1] .

Os compostos nitrogenados podem ter caráter básico (piridinas, quinolinas, benzoquinolinas e acridinas), neutro (pirrois, indois e carbazois), e ácido (hidroxi-piridinas e ácidos carboxílicos de indois) [3] . Os azaarenos são classificados como substâncias com nitrogênio heterocíclico, onde um dos átomos de carbono na estrutura do hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) é substituído pelo nitrogênio. As substâncias nitrogenadas básicas encontradas no petróleo são, predominantemente, compostas pelas famílias das alquilpiridinas, alquilquinolinas, hidroxiquinolinas e acridinas. Várias das substâncias contendo nitrogênio heterocíclico e aminas primárias aromáticas são conhecidas ou suspeitas de serem carcinogênicas [4-7] . Um estudo detalhado do tipo e da concentração dos compostos nitrogenados presentes nos produtos do petróleo é claramente desejável para a otimização dos métodos para a sua remoção e para especificação de procedimentos de manipulação segura destes materiais. Os azaarenos têm sido difundidos no meio-ambiente através do uso extensivo de combustíveis fósseis e têm sido encontrados em um grande número de compartimentos ambientais, incluindo material particulado urbano [9-11] , sedimentos marinhos e de rios [12, 13] petróleo cru e seus derivados e solos. Vários métodos têm sido relatados para a determinação de nitrogênio total em petróleo e derivados, mas os métodos voltados para grupos funcionais e compostos específicos têm sido pouco explorados.

Numerosos estudos têm sido feitos sobre a ocorrência de azaarenos em combustíveis e amostras ambientais. Vários esquemas de separação e identificação desses compostos têm sido relatados. Como a co-eluição pode ser um problema devido ao grande número de isômeros, tanto de carbazois quanto de acridinas, uma separação entre as frações básica e neutra é necessária para amostras complexas onde essas duas famílias de substâncias

ocorrem juntas. Uma possibilidade para essa separação é a extração em fase sólida (SPE), pois é um método e de consumo de solvente baixo.

A determinação de azaarenos tem sido realizada, mais freqüentemente, por diferentes técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF) ou UV-Visível, cromatografia a gás (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM), e cromatografia a gás bidimensional com detector seletivo de nitrogênio-fósforo usado para a detecção específica de moléculas contendo nitrogênio e detecção por EM.

Eletroforese Capilar de Zona

O processo de eletroforese é definido como “o movimento ou migração diferenciada de espécies carregadas pela atração ou repulsão em um campo elétrico”. Para tanto, se aplica uma alta voltagem de modo que os analitos com diferentes mobilidades eletroforéticas possam ser separados. Esta técnica utiliza um capilar, geralmente de sílica fundida preenchido com um eletrólito.

A eletroforese capilar possui vantagens como baixo consumo de solventes, eficiência, seletividade, facilidade operacional, análise de amostras aquosas e não aquosas e, separação de enantiômeros também são citadas como vantagens da eletroforese capilar na literatura [14,15].

Esta técnica abrange também uma variedade de modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar, permitindo a separação de uma grande variedade compostos (espécies positivas, negativas e neutros). Neste trabalho será utilizada a Eletroforese Capilar de Zona (CZE).

A Eletroforese Capilar de Zona (CZE) é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados por sua facilidade de implantação e otimização das condições instrumentais. Em CZE o capilar é preenchido com um eletrólito e quando uma voltagem é aplicada, a amostra move através do capilar pela ação do fluxo eletrosmótico, desta forma os analitos são separados em zonas com diferentes velocidades de migração de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. A ordem de migração é determinada pela razão carga/raio dos analitos [17].

A detecção é realizada diretamente no capilar, onde é aberta uma janela óptica, desse modo [61]. No presente trabalho é utilizada a detecção espectrofotométrica de absorção na região do UV-vis.

Proposta do trabalho

A proposta do trabalho foi desenvolver um método analítico para a determinação seletiva de seis azaarenos básicos em querosene de aviação (QAV) utilizando como técnica analítica a eletroforese capilar por zona. Os azaarenos em questão são: 7,8-Benzoquinolina (78BQ), 7,9-Dimetilbenzoacridina (79DMBA), 9-Amino-1,2,3,4-tetraidroacridina (9ATHA), 9-Metilacridina (9MA), Acridina (A) e Dibenzoacridina (DBA), e estão apresentados na Figura 1. As condições instrumentais e experimentais para a separação dos azaarenos básicos foram otimizadas e um estudo foi realizado para aumentar a sensibilidade do método. O método foi aplicado em amostras reais, como os extratos de QAV.

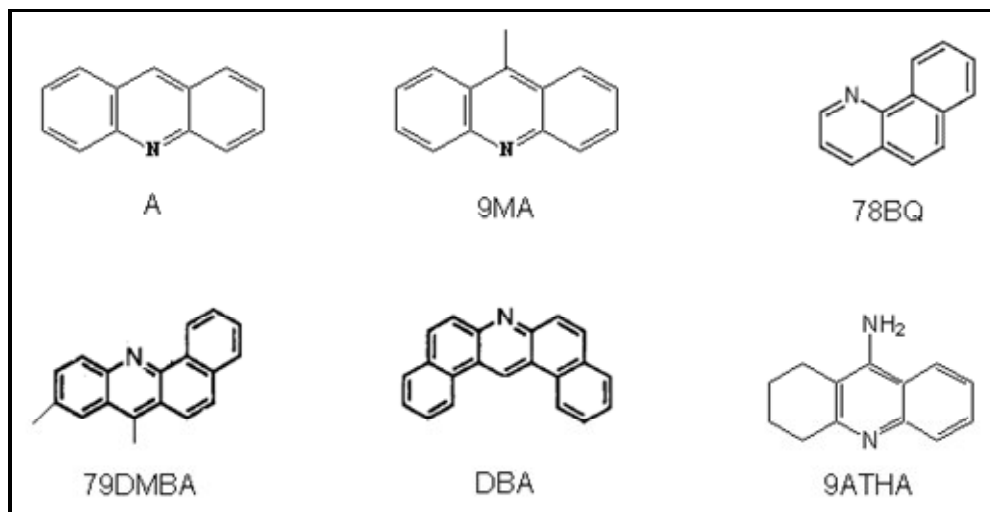


Figura 1 – Estruturas químicas dos azaarenos básicos em estudo.

Os azaarenos são substâncias de caráter básico (com exceção dos derivados de carbazol e indol) e esta característica pode ser utilizada para a sua separação dos nitrogenados neutros e dos HPA, que estão presentes em muito maior quantidade nos combustíveis derivados de petróleo como o querosene de aviação. Com esse objetivo, um método de extração, adaptado

de WILHELM et al (2000) [16] foi utilizado. Nesse procedimento, os azaarenos básicos foram isolados por extração em fase sólida (SPE) usando um adsorvente forte trocador de cátions (ácido propilsulfônico ou PRS) que é muito polar e não apresenta nenhum grau apreciável de interações apolares. Como o valor do pKa do PRS é baixo, compostos catiônicos podem ser eluídos tanto por neutralização de suas cargas através de um eluente fortemente alcalino (uma solução de metanol-amônia neste caso) ou por uma solução de alta força iônica. Parâmetros analíticos de mérito foram determinados e a aplicabilidade do método foi avaliada.

Procedimento Experimental

Materiais e Reagentes

Indol, 3-Metilindol (3MI), 9-Metilacridina (9MA), 7,9-Dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA), 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina (9ATHA) e Carbazol (CBZ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); Acridina (A), 7,8-Benzoquinolina (78BQ), Pireno (PIR), Criseno (CRI) e Benzo[a]pireno (BaP) foram adquiridos da Acros Organics (New Jersey, EUA); Dibenzo[a,j]acridina (DBA) foi adquirida da Chem Service (West Chester, EUA). Soluções estoque 200 mg L^{-1} dessas substâncias, preparadas em Etanol, foram utilizadas no preparo das soluções de trabalho através de diluições posteriores. Acetonitrila (ACN) e metanol, ambos em grau HPLC, etanol, diclorometano (DCM), solução de amônia 25%, ácido fosfórico 85%, hidróxido de sódio, ácido bórico, dodecil sulfato de sódio e ácido clorídrico, todos em grau analítico, foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todas as soluções foram filtradas com filtros Millipore de $0,45 \mu\text{m}$ (membranas de PTFE) antes da injeção nos sistemas CLAE e eletroforese capilar. Cartuchos de ácido propilsulfônico (PRS, 500 mg) para extração em fase sólida foram obtidos da Varian (Austrália). As amostras de QAV foram fornecidas pela Petrobras. Gás nitrogênio 99,9% foi adquirido da AGA-Lynde (Rio de Janeiro, Brasil). O eletrólito de corrida contendo tampão fosfato (50 m mol L^{-1}) foi preparado diariamente e o pH ajustado com NaOH 1 mol L^{-1} para 2,65.

Instrumentação

As análises por eletroforese capilar foram realizadas em um equipamento comercial Hewlett-Packard (HP) CE – Agilent. O instrumento era equipado com um detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos de operação na faixa de 190 a 600 nm, um controlador de temperatura do tipo Peltier, um sistema automático de injeção de amostra e um programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent. As separações foram conduzidas em capilar de sílica fundida de 56 cm de comprimento total (47,5 cm até o detector) e 50 µm de diâmetro interno. Os eletroferogramas foram obtidos com detecção fotométrica em comprimentos de onda variados, dependendo do analito (230, 250, 260 e 300 nm). A diferença de potencial aplicada durante as análises foi de +25 kV e a temperatura mantida constante em 25 °C. As injeções das amostras foram realizadas em modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 150 segundos.

Com a finalidade de aumentar o sinal analítico dos analitos foi utilizado um capilar de caminho óptico estendido: capilar de sílica fundida de 64,5 cm de comprimento total (56 cm até o detector), 50 µm de diâmetro interno e 150 µm de caminho óptico. O diâmetro interno desse capilar é expandido três vezes no ponto da detecção, em forma de bulbo.

Procedimento de extração

Um volume de 25,00 mL de amostra foi aplicado ao cartucho PSR (500mg de ácido propilsulfônico), o qual foi previamente condicionado com 4 mL de diclorometano (DCM). Mais 4 mL de DCM foram passados pelo cartucho para eluir as substâncias neutras. Os azaarenos básicos, retidos no PSR, foram eluídos com 2 mL de Metanol:Amônia (9:1 em volume) em balão volumétrico de 5,00 mL depois de o cartucho ter sido seco com um fluxo suave de nitrogênio por 30 minutos. Com o objetivo de eliminar a presença de amônia, após a eluição com metanol:amônia, este solvente teve seu volume reduzido até 500 µL, aproximadamente, com um fluxo suave de nitrogênio. O volume foi completado a 1,0 mL com ACN (para corresponder a 20% de

solvente orgânico na amostra), 25 µL de solução de H₃PO₄ 0,4 mol L⁻¹ foi acrescentado (para concentração final de 1 mmol L⁻¹) e o frasco foi avolumado a 5,0 mL com água. A solução final foi filtrada e levada ao equipamento de eletroforese capilar. Esse procedimento de extração resultou em um fator de pré-concentração (FPC) de cinco vezes.

Resultados e Discussão

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

Nos primeiros testes realizados com CZE para a separação dos seis azaarenos básicos de interesse, três soluções foram preparadas, cada uma em um solvente diferente: (i) metanol:amônia (9:1)/água 40/60% v/v; (ii); metanol/água 40/60% v/v; e (iii) água. Os eletroferogramas obtidos estão apresentados na Figura 2. O objetivo de usar o solvente contendo amônia seria o de aproveitar diretamente, sem modificações, a solução obtida após o procedimento de extração, sem que fosse necessária a evaporação após a eluição. No entanto, pode-se verificar na Figura 2 que quando esse solvente foi utilizado, apenas dois picos apareceram no eletroferograma. Quando os resultados obtidos com os outros dois solventes, metanol:água (40:60) e água, são comparados, observa-se que ambos proporcionaram o surgimento de quatro picos, sendo que com metanol:água estes picos foram mais intensos.

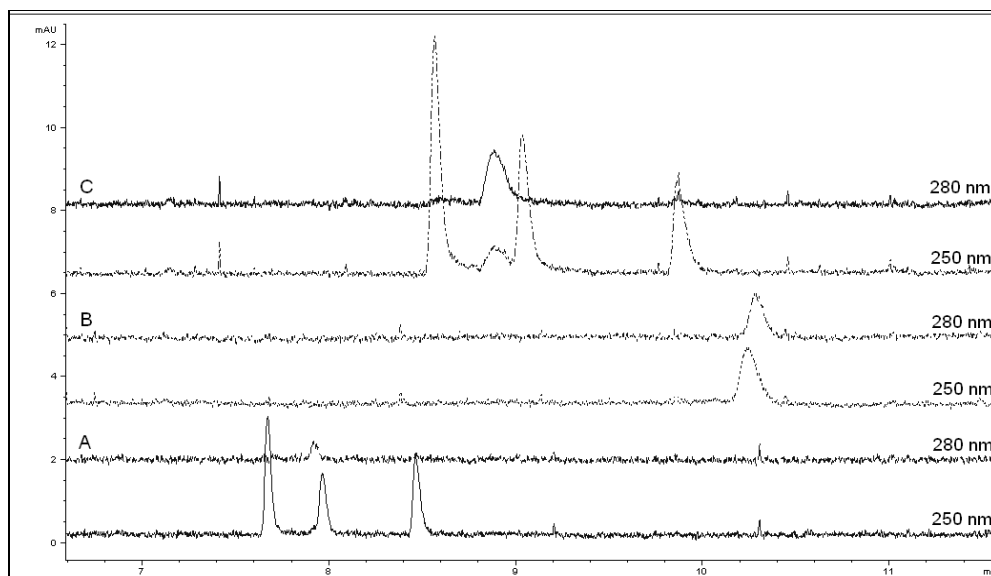


Figura 2 - Efeito do solvente da amostra sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 3,0. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 e 280 nm. Solução padrão: 0,5 mg L⁻¹ de A, 9MA,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

Foram realizados testes nas mesmas condições acima com o objetivo de identificar os picos e de verificar se os dois picos que faltavam estavam co-migrando com os outros ou, simplesmente, não tinham sido detectados. Os eletroferogramas das soluções sem DBA e sem 79DMBA não foram apresentados, pois foram idênticos ao da solução contendo todos os analitos, indicando que estes analito não foram detectados.

Um breve estudo sobre a influência do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos foi realizado e estão apresentados na Figura 3. Nesse estudo, uma solução padrão contendo 2,0 mg L⁻¹ de cada analito em água, e uma faixa de pH de 2,3 (pH original da solução) a 5,0 foi utilizada. Pôde-se observar que o pico da 78BQ deslocou-se para a direita com o aumento do pH de 2,30 para 3,00 e que, para os valores de pH mais altos (4,10 e 5,00), apenas três picos foram observados. O pH original da solução foi escolhido para a realização dos experimentos seguintes, pois, nas condições testadas até este momento, foi o que proporcionou melhor resolução num menor tempo de análise.

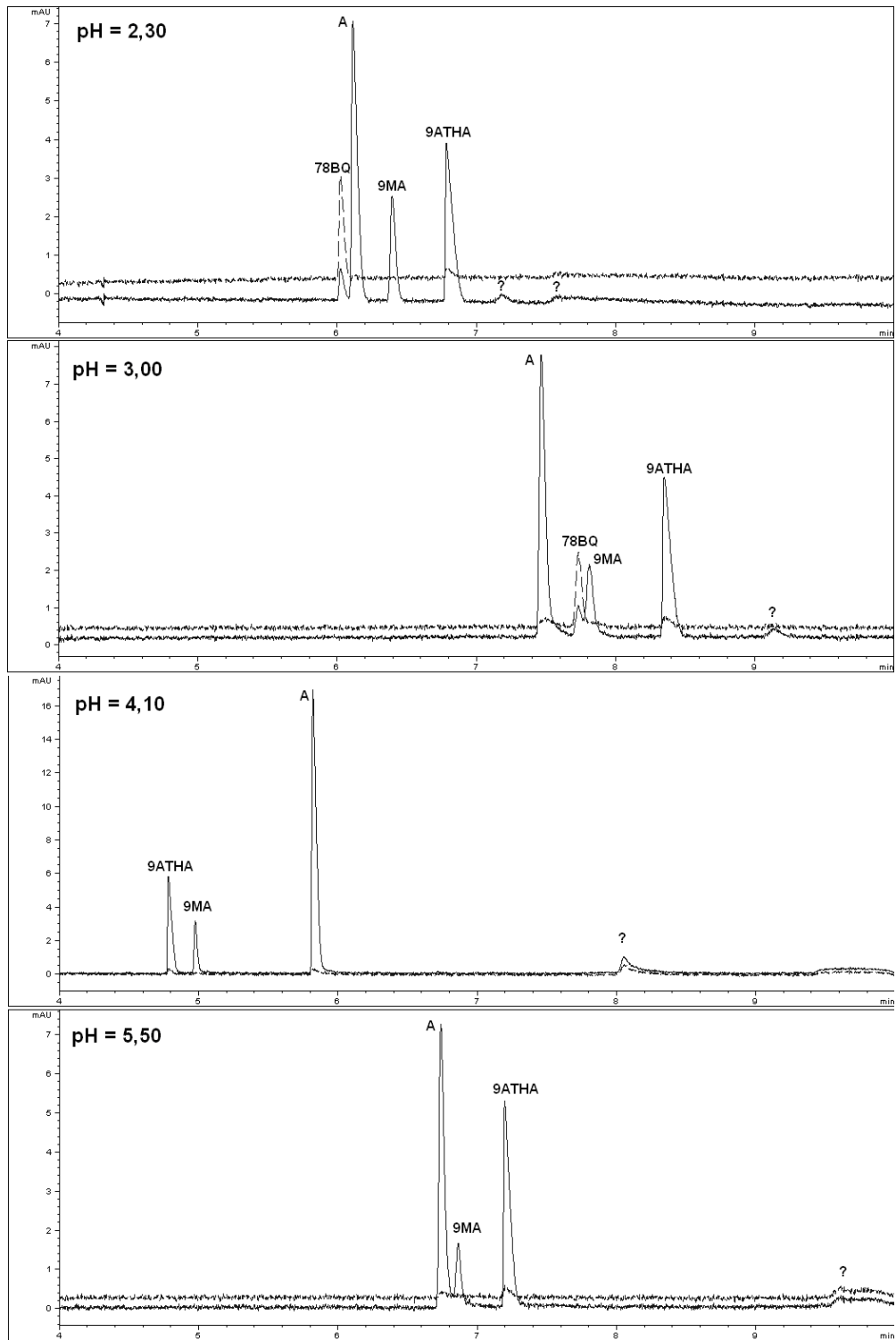


Figura 3: Efeito do pH do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L⁻¹. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 30 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 (—) e 280 (---) nm. Solução padrão: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA em água.

Para avaliar a sensibilidade para os analitos 79DMBA e DBA, optou-se por aumentar o tempo de injeção. Isso promoveu o surgimento, ainda que discreto, de dois novos picos nos eletroferogramas obtidos com 60 e 100 s de tempo de injeção (Figura 4), apesar de o último pico não ter sido confirmado como tal, já que se apresentou bastante deformado.

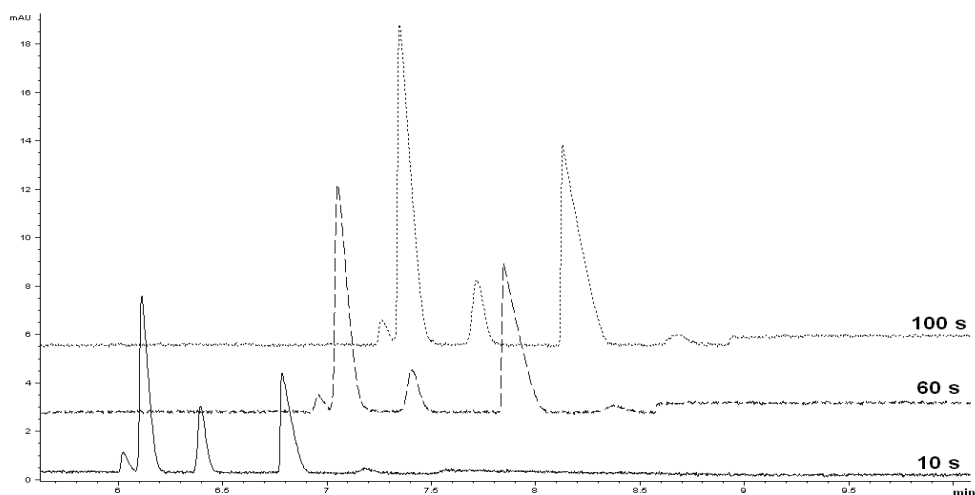


Figura 4 - Efeito do tempo de injeção sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 10 mmol L^{-1} , pH natural (2,3). Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 250 nm. Solução padrão: $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA em água.

Um teste variando a concentração do eletrólito (tampão fosfato), usando tempo de injeção de 100 s, foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 5. Observou-se que este parâmetro influenciava muito a eficiência da separação: quanto maior a concentração do eletrólito, mais estreitos os picos e, conseqüentemente, melhor a resolução. Os dois primeiros picos (78BQ e A), antes parcialmente sobrepostos, foram completamente separados com 50 mmol L^{-1} de tampão fosfato como eletrólito. Além disso, foi observado que quanto maior a diferença de condutividade entre o eletrólito de trabalho e a solução da amostra, mais estreitos os picos.

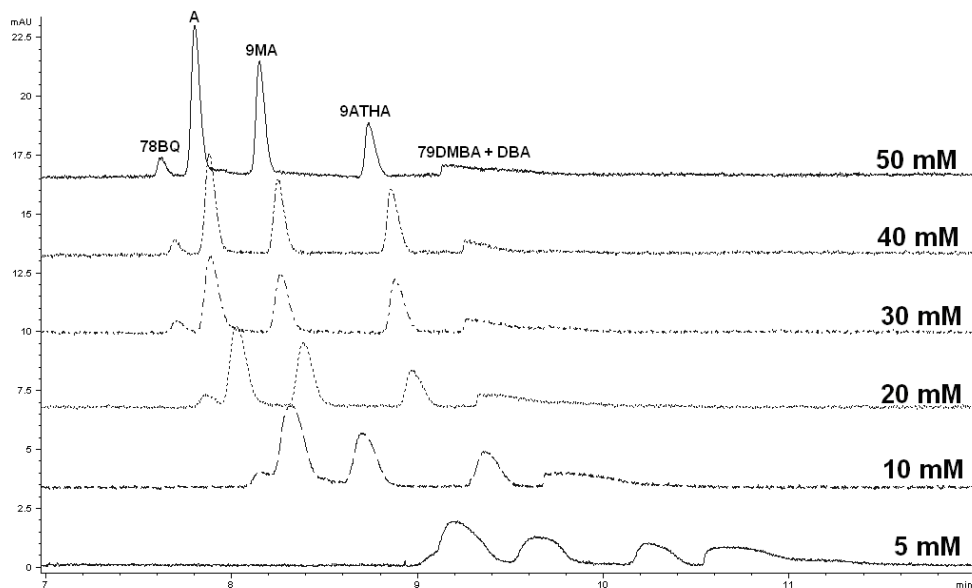


Figura 5 - Efeito da concentração do eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato (5 a 50 mmol L⁻¹), pH natural. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 100 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 nm. Solução padrão em tampão fosfato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

Em CZE é bastante comum o uso de eletrólitos aditivados. A presença de solventes orgânicos como aditivos ao eletrólito aumenta a solubilidade dos solutos orgânicos, diminuindo a interação soluto-capilar, e modifica a magnitude do EOF. A adição de metanol ao eletrólito foi testada e o resultado obtido está apresentado na Figura 6. Observou-se que quanto maior o teor de metanol no eletrólito, maior a separação entre os picos da DBA e da 79DMBA e, pela primeira vez até este momento, obteve-se um eletroferograma com os seis picos correspondentes aos seis analitos sendo separados.

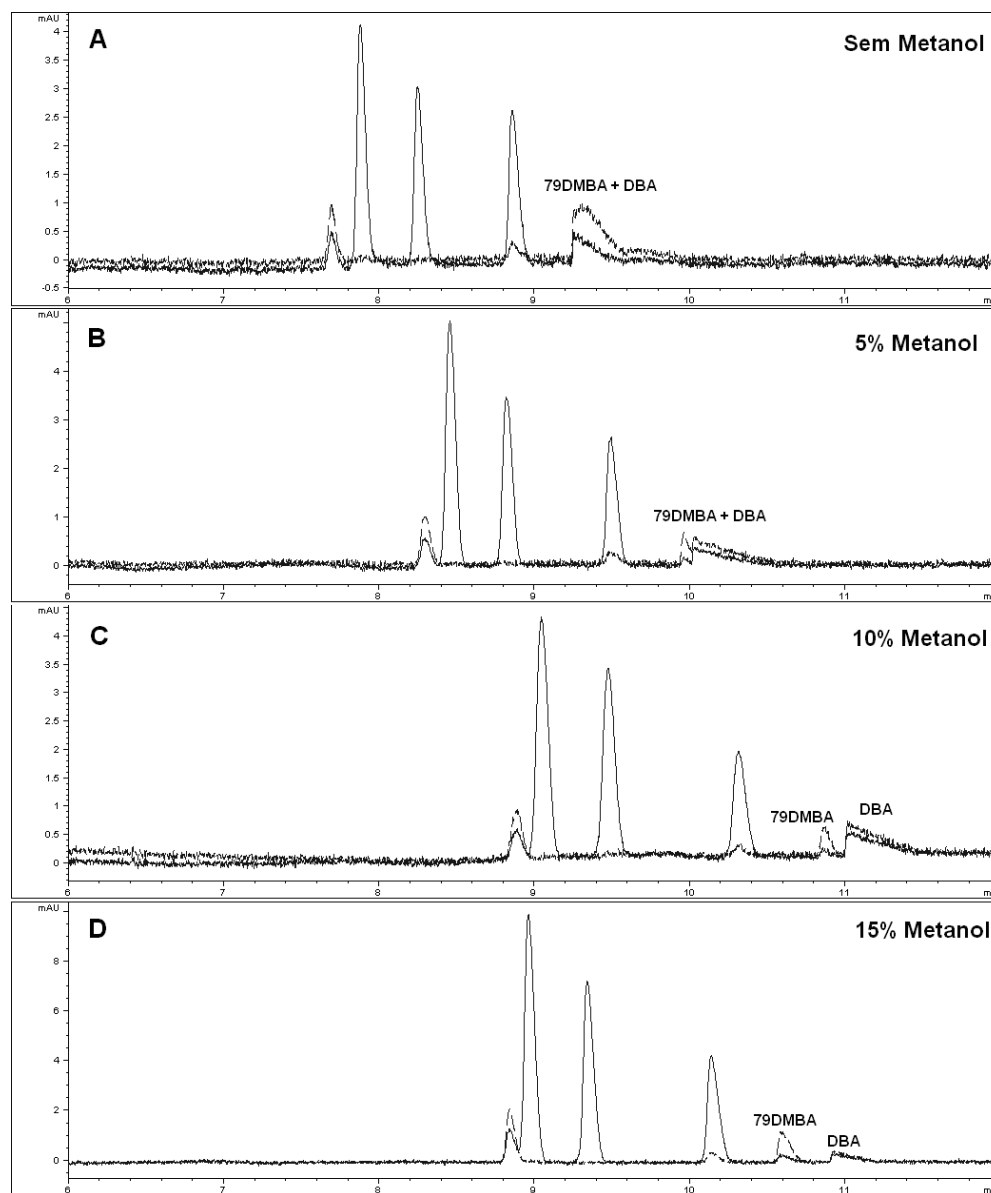


Figura 6 - Efeito da adição de metanol ao eletrólito sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 30 mmol L^{-1} , pH natural. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 100 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar e detecção em 250 (—) e 290 (---) nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L^{-1} contendo $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ da cada analito.

Com a resolução dos seis picos, a identificação dos analitos no eletroferograma foi realizada através da medição dos espectros de absorção com o próprio detector utilizado para as análises eletroforéticas (detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos). Um espectro foi obtido para

cada pico no eletroferograma da mistura contendo todos os seis analitos (Figura 6C), e estes espectros foram comparados com os espectros obtidos para as soluções das substâncias puras, nas mesmas condições. A ordem de saída dos analitos foi determinada como: A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA; e os espectros de absorção estão apresentados nas figuras que vão da Figura à Figura .

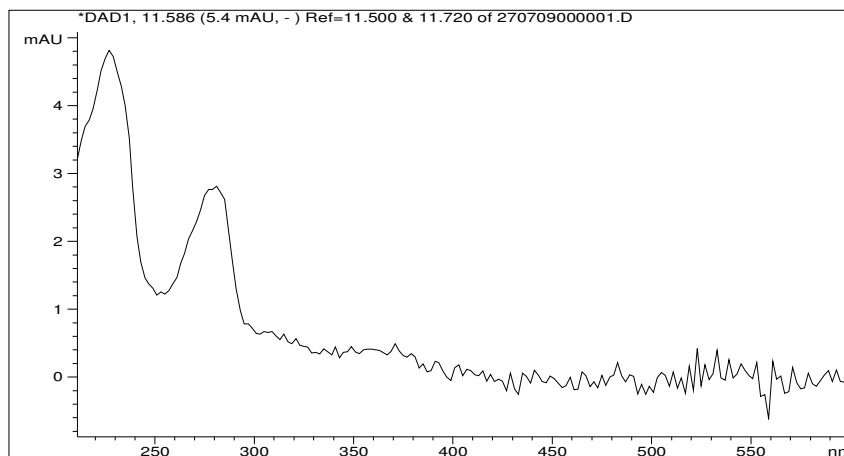


Figura 7 - Espectro de absorção da 78BQ (1º pico no eletroferograma). $\lambda_{\text{máx}} = 230 \text{ nm}$.

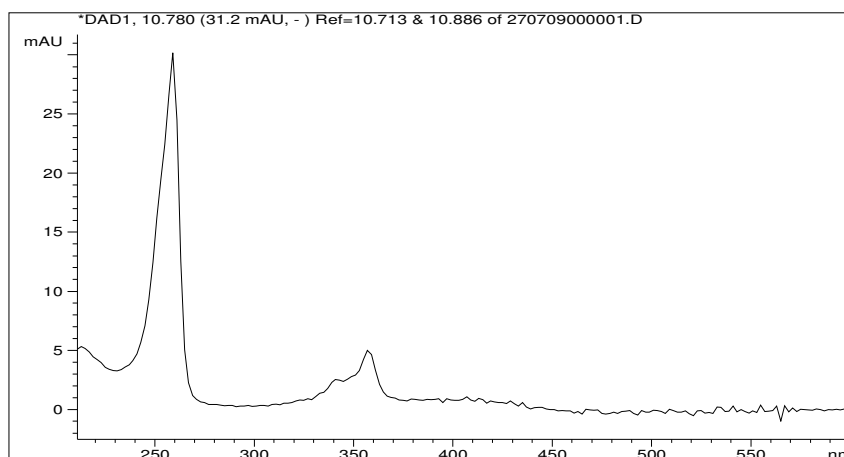


Figura 8 - Espectro de absorção da ACRIDINA (2º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$.

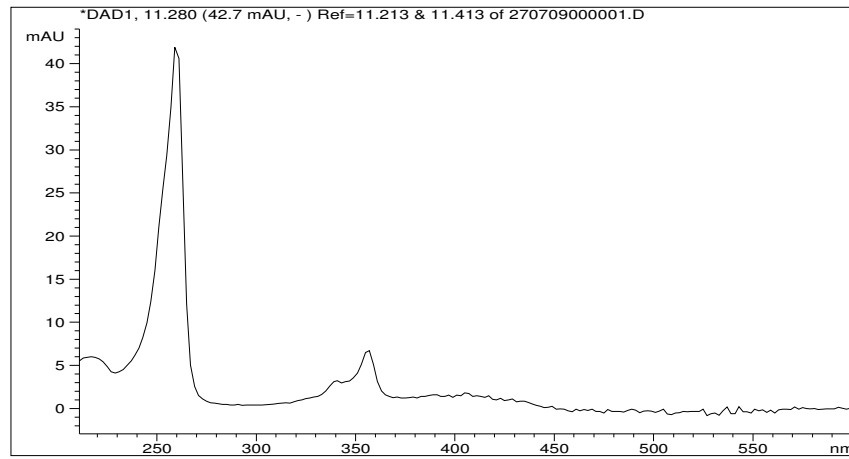


Figura 9 - Espectro de absorção da 9MA (3º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$.

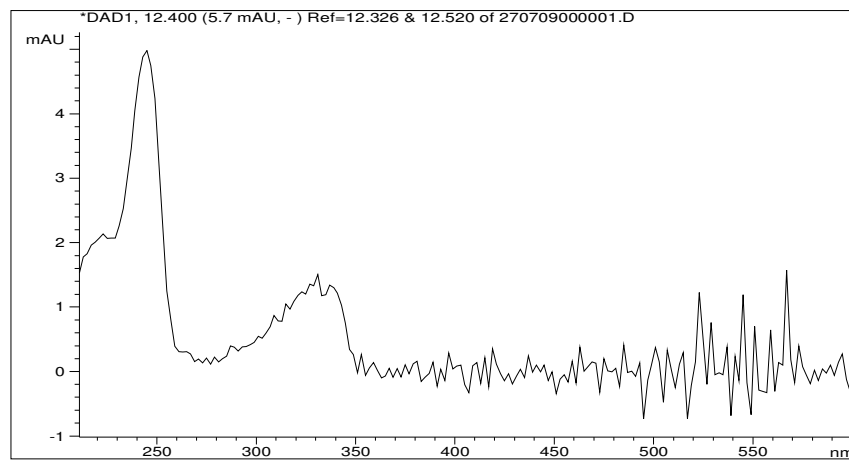


Figura 10 - Espectro de absorção da 9ATHA (4º pico). $\lambda_{\text{máx}} = 250 \text{ nm}$.

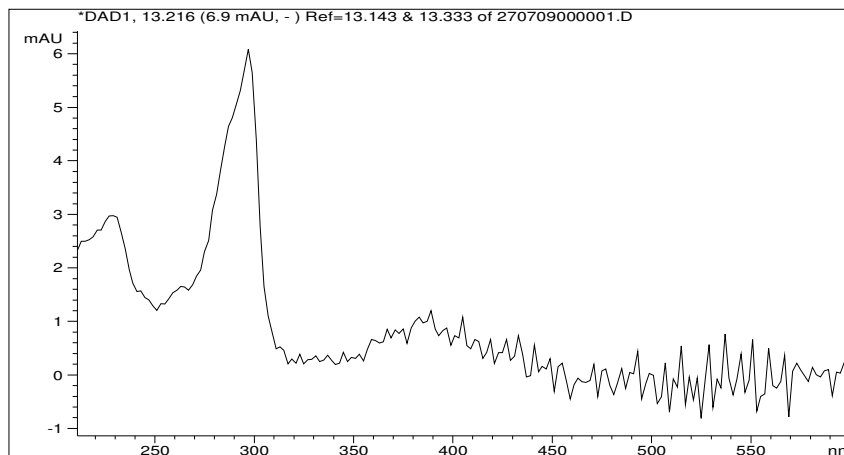


Figura 11 - Espectro de absorção da 79DMBA (5ª pico). $\lambda_{\text{máx}} = 300 \text{ nm}$.

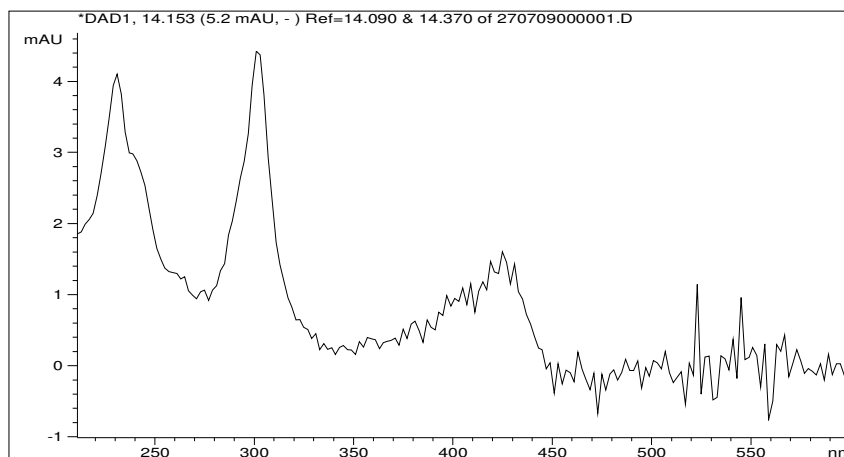


Figura 12 - Espectro de absorção da DBA (6ª pico). $\lambda_{\text{máx}} = 300 \text{ nm}$.

A partir dos resultados apresentados na Figura 6, alguns experimentos de otimização envolvendo temperatura e diferença de potencial aplicada, e outros envolvendo a composição do eletrólito (concentração do tampão fosfato, concentração de metanol e pH) foram realizados sem sucesso, devido a um alargamento nos picos que sugere que havia alguma interação entre os analitos e a parede do capilar.

Para evitar o alargamento dos picos observado, novos testes foram realizados para a separação dos seis analitos de interesse. Foi utilizado um eletrólito composto de 50 mmol L^{-1} de H_3PO_4 e 15% de metanol, com o seu pH natural (2,0). Uma mistura contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de A e 9MA, e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 78BQ, 9ATHA, DBA e 79DMBA, em solução contendo 15% de metanol e 1

mmol L⁻¹ de H₃PO₄, foi injetada por 10 s, a uma temperatura de 25 °C e com uma diferença de potencial aplicada de +25 kV (Figura A). O mesmo teor de solvente orgânico adicionado ao eletrólito foi adicionado à solução padrão (amostra), para 15 e 20% de metanol e 15 e 20% de ACN (Figura). Com a utilização de 20% de ACN no tampão e na amostra, além de uma melhor resolução ter sido obtida para os seis analitos, a intensidade dos dois últimos picos (79DMBA e DBA) tornou-se maior, indicando que a ACN foi mais eficiente em solubilizar estes analitos, diminuindo a adsorção dos mesmos à parede do capilar. A partir do resultado apresentado na Figura B, com a utilização de 20% de ACN na composição do eletrólito de trabalho e 20% de ACN na composição da amostra, o problema de alargamento dos picos não foi mais observado.

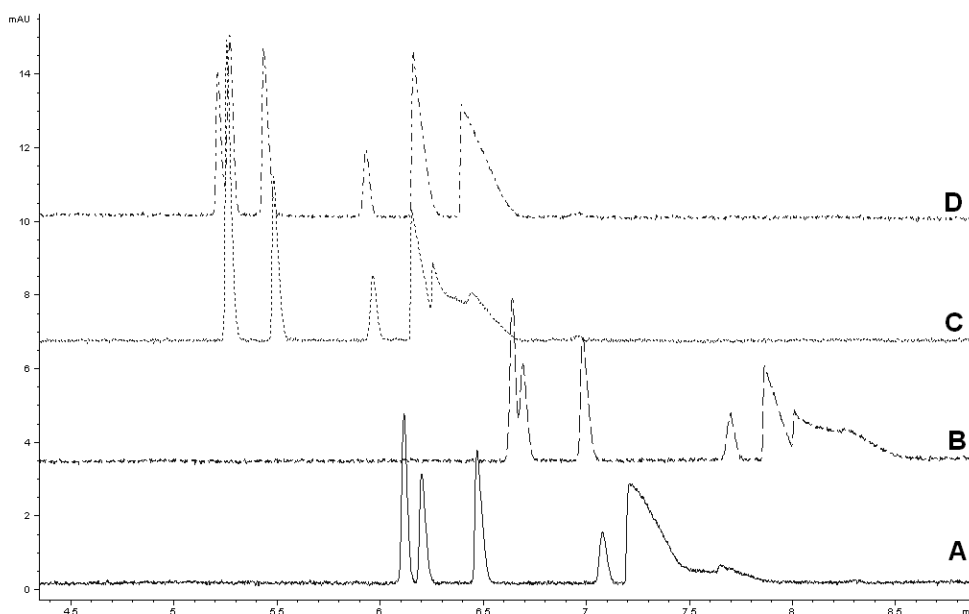


Figura 13- Efeito do solvente orgânico no eletrólito e na solução da amostra sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, pH natural. Solvente orgânico presente no eletrólito e na amostra: (A) 15% de metanol; (B) 20% de metanol; (C) 15% de ACN; e (D) 20% de ACN. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 230 nm. Solução padrão em tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ acrescido do solvente orgânico: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA.

Um estudo adicional envolvendo o efeito da variação do pH do eletrólito e da sua concentração foi realizado. Quando a concentração do eletrólito foi

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

Para tentar diminuir o alargamento dos dois últimos picos, eletrólitos com maiores teores de ACN foram testados. No entanto, foi observado que, apesar de ter havido um estreitamento dos dois últimos picos (79DMBA e DBA) com o aumento da concentração de ACN no eletrólito, o pico da 78BQ deslocou-se para a direita, prejudicando a resolução no eletroferograma. A tabela abaixo resume as condições de trabalho selecionadas.

Tabela 1 – Resumo das condições de trabalho selecionadas.

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

Estudos com capilar de caminho estendido

Um capilar de sílica fundida de caminho óptico estendido, de 64,5 cm de comprimento total (56 cm até o detector), 50 µm de diâmetro interno e 150 µm de caminho óptico (três vezes maior que o do capilar tradicional), passou a ser utilizado com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método. Com isso, esperava-se que as áreas dos picos dos analitos aumentassem três vezes com relação às áreas obtidas com o capilar tradicional, o que foi observado para todos os analitos (Figura 14).

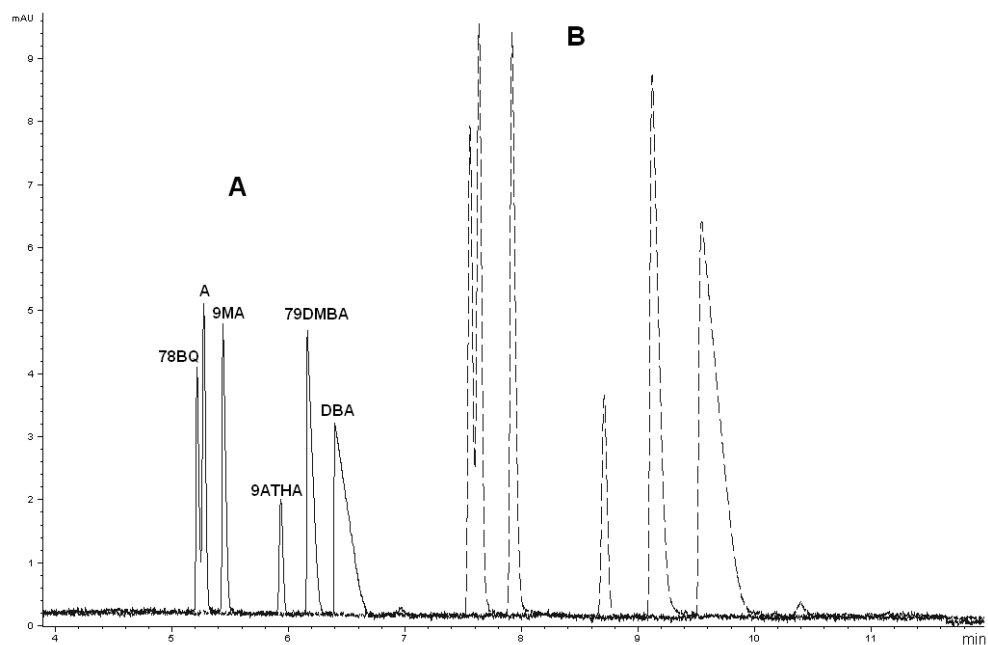


Figura 14- Efeito do uso do capilar de caminho óptico estendido sobre a separação dos azaarenos básicos em estudo por CZE, usando tampão fosfato 50 mmol L⁻¹, contendo 20% ACN, pH natural. Condições instrumentais: 25 kV, 25 °C, 10 s de injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, e detecção em 230 nm. Solução padrão: 2,0 mg L⁻¹ de A, 9MA, 78BQ e 9ATHA e 4,0 mg L⁻¹ de DBA e 79DMBA em 1 mmol L⁻¹ H₃PO₄, contendo 20% ACN. (A) Capilar normal. (B) Capilar de caminho óptico estendido.

Parâmetros analíticos de mérito

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

Tabela 2 – Repetitividade do método CZE para a análise dos azaarenos básicos.

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

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

Para a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, curvas analíticas foram construídas na faixa de resposta linear, sendo que cada ponto das curvas foi o resultado de três análises. As curvas analíticas (Figura 15, Figura 16, Figura 17, Figura 18, Figura 19 e Figura 20) foram construídas a partir das áreas dos picos em função da concentração de analito na solução injetada e a melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada pelo método dos mínimos quadrados com a ajuda do programa Microsoft[®] Office Excel 2003. O comportamento linear na faixa de trabalho estudada foi indicado pelos valores dos coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,99, apresentados na Tabela 3.

A detectabilidade do método foi avaliada pelas estimativas dos limites de detecção (LOD) e dos limites de quantificação (LOQ). Os LOD e os LOQ foram determinados como a concentração do analito que resultou em uma área do pico igual a três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão de dez medições da solução de menor concentração na curva analítica (menor concentração que pôde ser detectada), de acordo com a literatura [50, 52]. Os valores de LOD ficaram entre 0,68 e 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os de LOQ entre 1,0 a 7,7 $\mu\text{g L}^{-1}$.

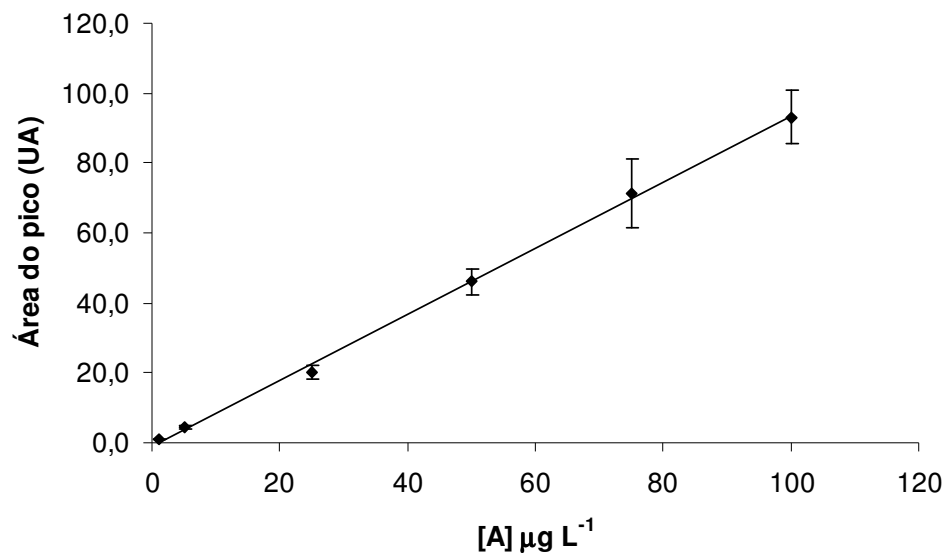


Figura 15 - Curva analítica da Acridina (A) para determinações por CZE.

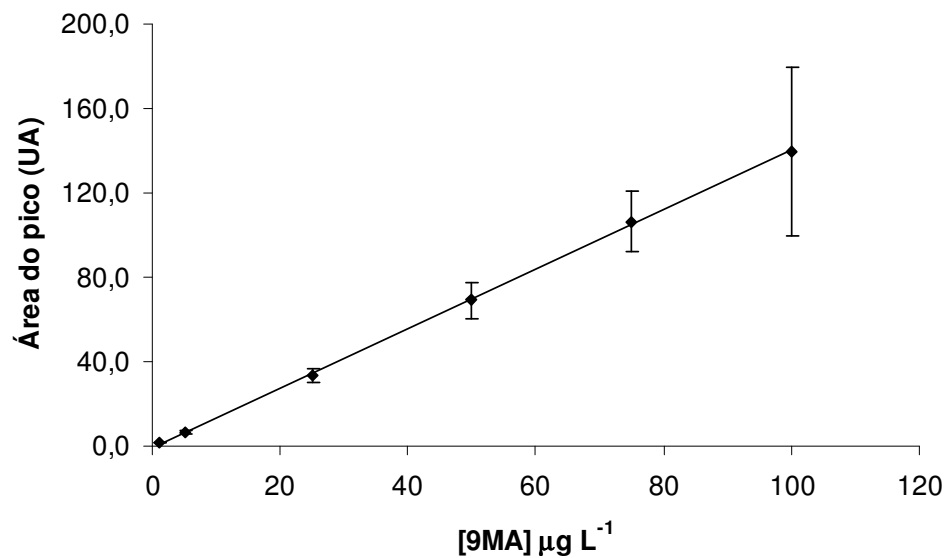


Figura 16 - Curva analítica da 9-metilacridina (9MA) para determinações por CZE.

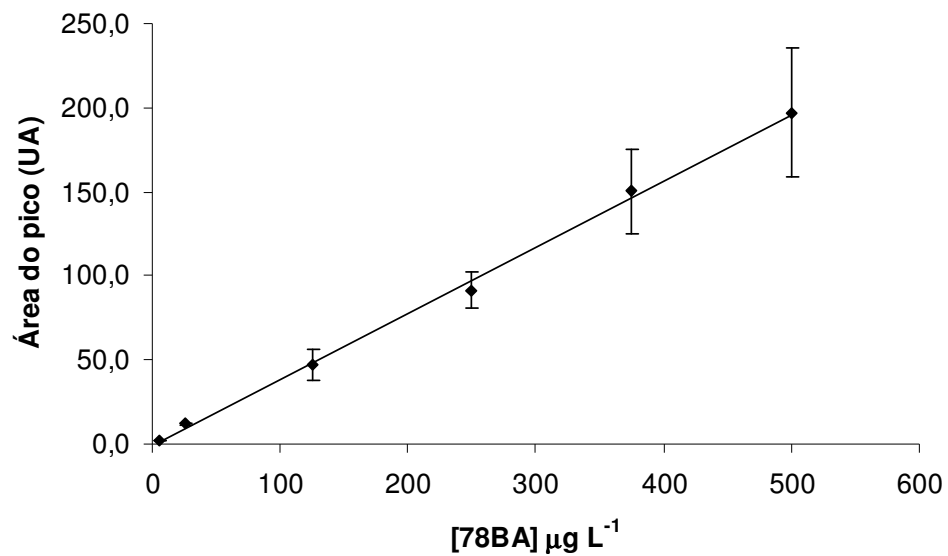


Figura 17 - Curva analítica da 7,8-Benzoquinolina para determinações por CZE.

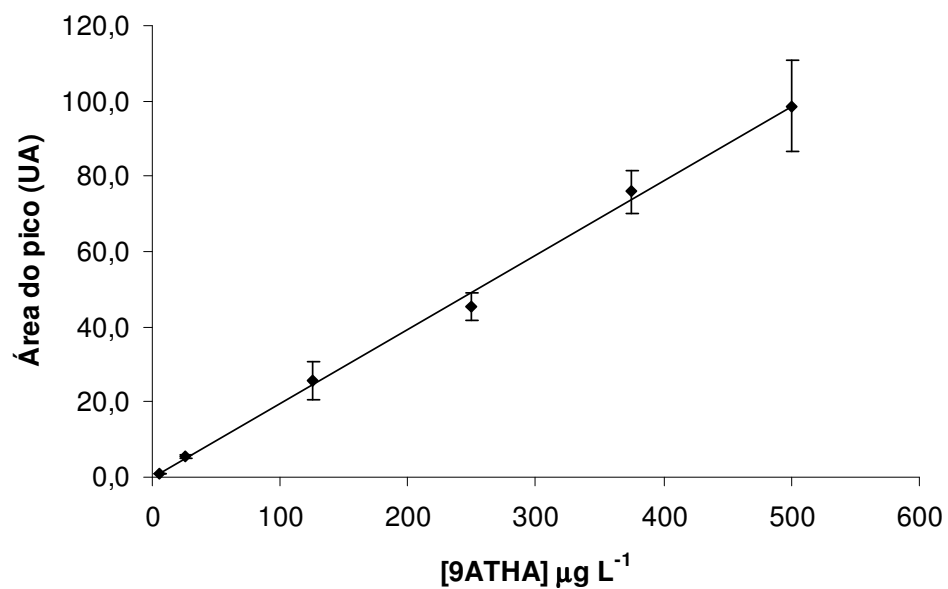


Figura 18 - Curva analítica da 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina (9ATHA) para determinações por CZE.

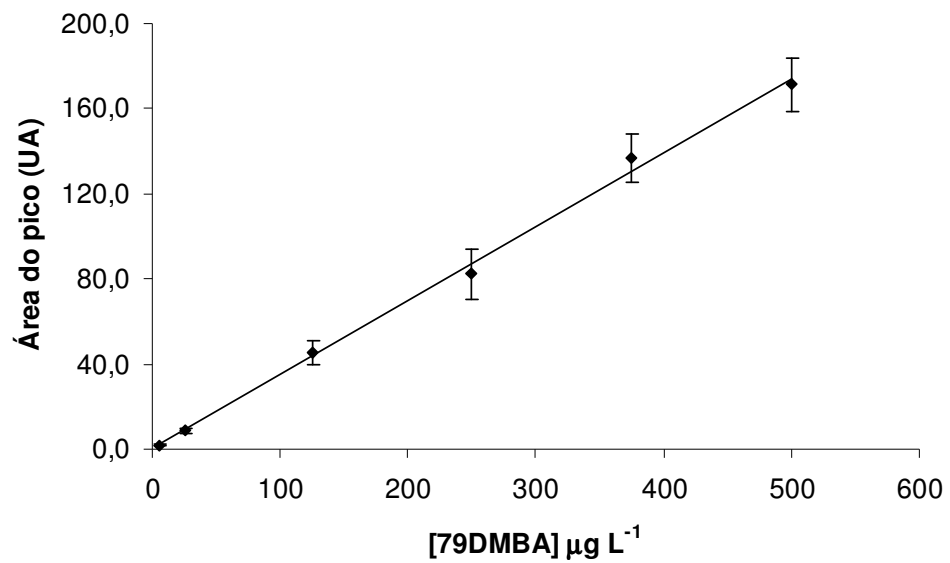


Figura 19 - Curva analítica da 7,9-Dimetilbenzo[*c*]acridina (79DMBA) para determinações por CZE.

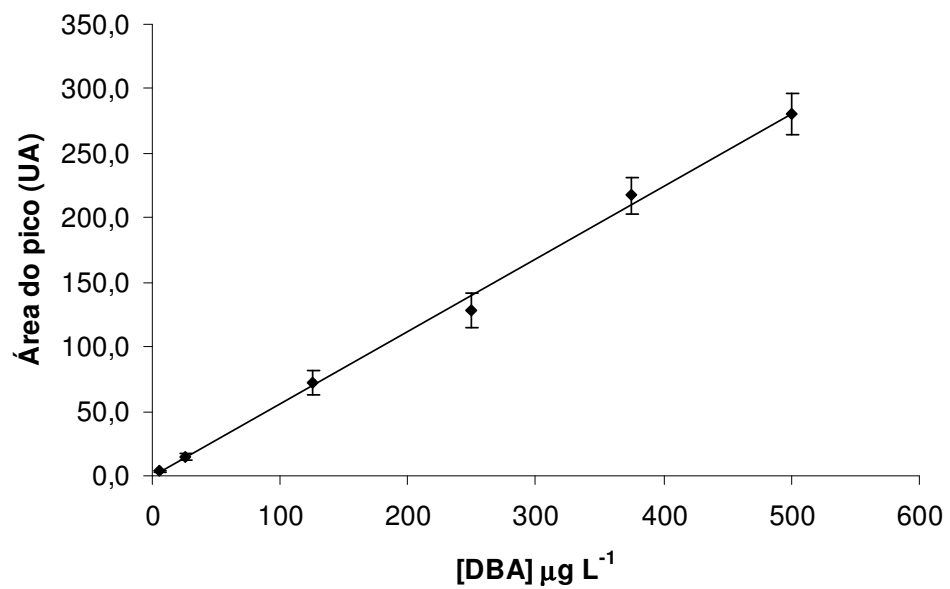


Figura 20 - Curva analítica da Dibenzo[*a,j*]acridina (DBA) para determinações por CZE.

Tabela 3 - Resultados de validação para o método CZE.

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

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

Análise das amostras de QAV

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

O método CZE em estudo foi aplicado para a determinação dos seis azaarenos básicos em uma amostra de QAV. Para avaliar a exatidão, uma alíquota dessa amostra foi fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de A e 9MA e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA e submetida ao procedimento de extração antes da análise pelo método CZE. O mesmo procedimento de extração, foi realizado com a eluição dos analitos feita com metanol:amônia (9:1) e com ACN:amônia (9:1), com fator de pré-concentração igual a dois. Ambas as extrações, utilizando metanol:amônia ou ACN:amônia, foram feitas em triplicata

e os extratos resultantes, assim como as soluções-padrão das curvas analíticas, foram analisados por CZE, nas condições apresentadas na Tabela 1, e pelo método de referência (CLAE-DF) para a comparação dos resultados. Os valores de recuperação obtidos pelos dois métodos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Recuperação dos azaarenos básicos em amostra de QAV fortificada.

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

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

Como pode ser observado na Tabela 4, os valores de recuperação obtidos para o procedimento de extração realizado com a eluição dos analitos com Metanol:amônia (9:1) foram sempre maiores que os obtidos com ACN:amônia (9:1), determinados tanto pelo método CZE quanto pelo método de referência (CLAE-DF).

Os resultados obtidos indicaram que é possível aplicar CZE com pré-concentração em linha para a determinação dos azaarenos básicos em QAV. Entretanto, um estudo mais detalhado no sentido de otimizar os parâmetros da análise para melhorar a resolução e a sensibilidade e diminuir o tempo de análise pode ser realizado.

Conclusão

O método CZE foi aplicado para a determinação dos seis azaarenos básicos em uma amostra de QAV fortificada com os analitos. O procedimento de extração em fase sólida (SPE) usando uma coluna trocadora de cátions que permite a isolamento seletiva da fração dos azaarenos básicos dessas matrizes complexas. Este procedimento foi realizado com a eluição dos analitos feita com metanol:amônia (9:1) e com ACN:amônia (9:1) e os extratos resultantes, assim como as soluções-padrão das curvas analíticas, foram analisados por CZE e pelo método CLAE-DF, utilizado como método de referência. Os valores de recuperação obtidos para o procedimento de extração realizado com a eluição dos analitos com Metanol:amônia (9:1) foram maiores que os obtidos com ACN:amônia (9:1), indicando que o primeiro solvente foi mais eficiente na eluição dos azaarenos básicos que o segundo.

Referências:

1. PILLON, L. Z., Effect of clays and adsorbents on the nitrogen content and the stability of jet fuels. *Petroleum Science and Technology*, 19, 7-8, p. 961-970, 2001.
2. SPEIGHT, J. G. and *Handbook of Petroleum Analysis*. New York: John Wiley and Sons, 2001.
3. MOREIRA, E. M., PEREIRA, C. G., BORGES, M. B., Craqueamento catalítico fluido de GOP Cabiúnas desnitrificado: o impacto da redução de nitrogenados na carga no desempenho do FCC. *Boletim Técnico da Petrobras*, 45, 3/4, p. 274-283, 2006.
4. SOCHOVA, I., HOFMAN, J., and HOLOUBEK, I., Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International*, 33, 6, p. 798-804, 2007. 8. BLEEKER, E. A. J., et al., Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 41, 1-2, p. 51-62, 1998.
5. BLEEKER, E. A. J., et al., Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 41, 1-2, p. 51-62, 1998.
6. BLEEKER, E. A. J., et al., *Toxicity of azaarenes*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 173. 2002. p. 39-83.
7. KOBETICOVA, K., et al., Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 3, p. 650-660, 2008.
8. PASSOS, C. N., KAZUSHI, J., KLEIN, S. L., CARVALHO, R. L., S. BOZZO, Processamento de querosene Basrah no tratamento Bender da Reduc. 46, 3/4, p. 334-350, 2003.
9. CHEN, H. Y. and PRESTON, M. R., Measurement of semi-volatile azaarenes in airborne particulate and vapor phases. *Analytica Chimica Acta*, 501, 1, p. 71-78, 2004.

10. CHEN, H. Y. and PRESTON, M. R., Dissolution of azaarenes from urban aerosols. *Atmospheric Environment*, 38, 7, p. 1023-1028, 2004.
11. CHEN, H. Y. and PRESTON, M. R., Azaarenes in the aerosol of an urban atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 32, 5, p. 577-583, 1998.
12. OSBORNE, P. J., PRESTON, M. R., and CHEN, H. Y., Azaarenes in sediments, suspended particles and aerosol associated with the River Mersey estuary. *Marine Chemistry*, 58, 1-2, p. 73-83, 1997.
13. KOZIN, I. S., et al., Isomer-specific detection of azaarenes in environmental samples by Shpol'skii luminescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 354, 1-3, p. 181-187, 1997.
- 14.. ALTRIA, K. D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 856, 1-2, p. 443-463, 1999.
15. VEUTHEY, J.-L., Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1, p. 93- 95, 2005.
16. WILHELM, M., MATUSCHEK, G., and KETTRUP, A., Determination of basic nitrogen-containing polynuclear aromatic hydrocarbons formed during thermal degradation of polymers by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 878, 2, p. 171-181, 2000.
17. NURSTEN, R. M. A., *Capillary Electrophoresis for Food Analysis – Method Development*, Royal Society of Chemistry, 2000.