

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DIRETA
DE ÓLEOS VEGETAIS EMPREGANDO MICROEMULSÕES DE ÁGUA
EM ÓLEO E MEIOS NÃO AQUOSOS**

Tese de Doutorado

CARLA ROSANE BARBOZA MENDONÇA

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DIRETA
DE ÓLEOS VEGETAIS EMPREGANDO MICROEMULSÕES DE ÁGUA
EM ÓLEO E MEIOS NÃO AQUOSOS**

CARLA ROSANE BARBOZA MENDONÇA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Química.

Porto Alegre, fevereiro de 2005.

O trabalho descrito na presente tese, feito inteiramente pela autora, foi realizado entre março de 2001 e fevereiro de 2005 no Instituto de Química da UFRGS, sob a orientação da Prof^a Dr^a Clarisse Maria Sartori Piatnicki e co-orientação da Prof^a Dr^a Clara Isméria Damiane Bica, sendo que entre setembro de 2003 e setembro de 2004, parte do mesmo foi desenvolvida no Departamento de Química Analítica da Universidade de Valencia/Espanha, sob a orientação do prof. Dr. Guillermo Ramis Ramos.

Carla Rosane Barboza Mendonça

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago

Instituto de Química – Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Rui Zambiasi

Faculdade de Química de Alimentos – DCA – Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Maria Regina Alves Rodrigues

Instituto de Química e Geociências – DQO – Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Denise Schermann Azambuja

Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Dimitrios Samios

Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Sonhar, apesar das desilusões...
Caminhar, apesar dos obstáculos...
Lutar, apesar das barreiras...
Acreditar, acima de tudo!

Autor desconhecido

Agradecimentos

As palavras são poucas para expressar minha gratidão às pessoas que acreditaram e contribuíram na realização deste trabalho. O meu muito obrigado:

- Aos meus pais (Samuel e Nair Mendonça) e familiares (irmãos, sobrinhos, sogros, cunhados, afilhados, padrinhos, tios e primos) que sempre estiveram torcendo por mim, e meu esposo Sidnei Quevedo pelo apoio e presença constante.
- Aos colegas do Dept^o de Química Orgânica da UFPel pelo apoio e esforços para concretização deste projeto.
- Aos colegas e professores do Lindim e do laboratório de eletroquímica da UFRGS pelo companheirismo e incessante cooperação. Em especial à Sofia Lauer e Yara Silva.
- Ao prof. Rui Zambiasi por sua contribuição ao longo de toda minha formação superior.
- Al prof. Ernesto Simó por su hospitalidad y contribución en los experimentos de electroforesis capilar.
- A las chicas: Martha Mendieta, Virginia Bernabé y Silvia Ortega, mis adorables amigas del laboratorio de electroforesis capilar de la Universitat de València.
- A minhas amigas: Mari Ângela Renon, Grazielle Granada e Carmen Borges, pela amizade leal e constante incentivo.
- À CAPES pela bolsa e a Tânia Machado (UFPel) responsável por todos os trâmites inerente a mesma.

Em especial:

- À prof^a. Clarisse Piatnicki, minha orientadora, amiga e um pouco “mãe”, que sempre teve a palavra certa para estimular-me nos momentos difíceis e que contribuiu imensamente em minha formação.
- À prof^a. Clara Bica, minha co-orientadora e amiga, pela confiança depositada, por sua participação fundamental, pelos ensinamentos e incansável apoio.
- Al prof. Guillermo Ramis, por el gran profesional que es, por su amistad, confianza, empeño hecho para posibilitar mi estancia en su grupo y por todo que me ha enseñado.

Produção científica gerada a partir dos resultados descritos na tese:**Artigos publicados:**

1 – Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; Simó-Alfonso, Ernesto F.; Ramis-Ramos, G.. Characterisation of hydroxyaromatic compounds in vegetable oils by capillary electrophoresis with direct injection in an oil-miscible KOH/ propanol/ methanol medium. *Electrophoresis*, **2005** (no prelo).

2 – Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.. Electrokinetic capillary chromatography in a polar continuous phase water-in-oil microemulsion constituted by water, sodium dodecyl sulfate and n-pentanol. *Electrophoresis*, **2005**, *26* (no prelo).

3 – Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.. Water in soybean oil microemulsions as medium for electrochemical measurements. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 628.

Artigos em preparação:

1 – Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; Silva, Yara P.S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.. Influence of the co-surfactante on the behavior of water in soybean oil microemulsions.

2 – Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, Guillermo. Physical chemistry characterization and electrochemical studies in a water-in-oil microemulsion.

Trabalhos apresentados em congressos e eventos científicos:

1. Garcia, S. L.; Rodrigues, J. R.; Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.. Determinação voltamétrica e potenciométrica de ácidos em óleo de soja. In: XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre. *Resumos do XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira de Iniciação Científica*. Porto Alegre, 2004. p. 38-39.

2. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.. Characterisation of phenols in vegetable oils by capillary electrophoresis using a miscible propanol / methanol medium. In Latin American Capillary Electrophoresis (LACE), 2004, Toledo/ES. *Book of Abstracts of LACE*. Toledo, 2004. PP-A-58–PP-A-58.
3. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.. Electrokinetic capillary chromatography in a w/o microemulsion applied to the direct analysis of edible fats. In: Euroanalysis XIII - European Conference on Analytical Chemistry, 2004, Salamanca/ES. *Book of abstract of Euroanalysis XIII*. Salamanca/ES: Gráficas Varona S.A., 2004. p. PS214-PS214.
4. Mendonça, C. R. B.; Ramis-Ramos, G.; Simó-Alfonso, E.F.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.. Avaliação do comportamento eletroquímico do ferroceno em microemulsão de água em óleo de soja através de medidas de voltametria cíclica. In: XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Niterói/RJ. *Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*. Niterói: Editora da UFRJ, 2004. p. FUN03-FUN05.
5. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C., M. S.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.. Análisis directo de aceites y grasas mediante electroforesis capilar de microemulsiones w/o. *Actas del IX Seminario de la Asociación de Investigadores y Estudiantes Brasileños en Cataluña, Barcelona*, 2004. p.307-312.
6. Mendonça, C. R. B.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G.. Direct analysis of oils and fats by capillary electrophoresis using a miscible water/ SDS/ n-pentanol w/o microemulsion and application to the determination of synthetic antioxidants. In: Sesión de difusión de las actividades de la Xarxa Temàtica Interregional, 2004, Barcelona. *Abstracts of the Sesión de difusión de las actividades de la Xarxa Temàtica Interregional*, Barcelona, 2004. Não paginado. Apresentação oral.
7. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.. Eletroanálise em microemulsão: determinação de ácido oléico em óleo de soja In: XII Encontro Nacional de Química Analítica, 2003, Sao Luís-MA. *Livro de resumos do XII Encontro Nacional de Química Analítica*. São Luís-MA, 2003. v.único. p.EQ060 - EQ060.

8. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S.. Ferrocene oxidation in soybean oil microemulsion In: 54th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2003, São Pedro-SP. *Book of abstracts - 54th Meeting of the International Society of Electrochemistry*. São Pedro – SP, 2003. v.único. p.789-789.
9. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Gaucia, S. L.; Piatnicki, C. M. S.. Influência da razão surfactante: co-surfactante nas características físico-químicas de uma microemulsão de água em óleo. In: XI Encontro de Química da Região Sul, 2003, Pelotas-RS. Livro de *Resumos* do XI Encontro de Química da Região Sul. Pelotas - RS: Editora da UFPEL, 2003. p.FQ 56 - FQ 56
10. Mendonça, C. R. B., Garcia, S. L.; Bica, C. I. D; Piatnicki, C. M. S.. Microemulsões de água em óleo de soja avaliadas por espalhamento de luz dinâmico e voltametria linear. In: XI Encontro de Química da Região Sul, 2003, Pelotas. Livro de *Resumos* do XI Encontro de Química da Região Sul. Pelotas: Editora da UFPEL, 2003. p.FQ 55 - FQ 55
11. Mendonça, C. R. B.; Bica, C. I. D.; Piatnicki; C. M. S.. Water in soybean oil microemulsion as studied by dynamic light scattering and linear voltammetry. In: 11th International Conference on Surface and Colloid Science, 2003, Foz do Iguaçu - PR. *Book of abstracts - 11th International Conference on Surface and Colloid Science*. Foz do Iguaçu: , 2003. v.único. p.285 – 285.
12. Mendonça, C.R.B.; Piatnicki, C.M.S.; Bica, C.I.D.. Microemulsões de óleo de soja como meio para medidas eletroquímicas. In: XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002, Araraquara. *Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*. Araraquara: UNESP, 2002. p. 201-203. Apresentação oral.

Índice Geral

Capítulo 1

Introdução

1.1 Importância do estudo

1.2 Objetivos

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2.1 Introdução

2.2 Análise de óleos vegetais

2.3 Microemulsões

2.3.1 Definição e características das microemulsões

2.3.2 Tipos de microemulsões

2.3.3 Aplicações das microemulsões

2.3.4 Componentes das microemulsões

2.3.4.1 Surfactantes

2.3.4.2 Co-surfactantes

2.3.4.3 Óleos

2.3.5 Diagrama de fases

2.4 Espalhamento de luz

2.4.1 Princípio

2.4.2 Tipos de espalhamento de luz

2.4.3 Espalhamento de luz dinâmico

2.5 Voltametria empregando ultramicroeletrodos

2.5.1 Introdução

2.5.2 Voltametria no estado estacionário

2.5.3 Voltametria no estado transiente

2.5.4 Características dos ultramicroeletrodos

2.6 Eletroforese capilar

2.6.1 Histórico

2.6.2 Capilares

2.6.3 Fluxo eletroosmótico (EOF)

2.6.4 Equipamento para eletroforese capilar

- 2.6.5 Sistemas de detecção
- 2.6.6 Otimização das condições de separação
- 2.6.7 Agentes modificadores da superfície do capilar
- 2.6.8 Modos de separação
 - 2.6.8.1 Cromatografia capilar eletrocinética de microemulsões (MEEKC)
 - 2.6.8.2 Eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE)
- 2.6.9 Efeito *stacking*
- 2.6.10 Vantagens e desvantagens da CE comparada à cromatografia líquida de alta performance (HPLC)
- 2.7 Análise de biofenóis
- 2.8 Referências

Capítulo 3

- Experimental
 - 3.1 Materiais
 - 3.2 Métodos
 - 3.2.1 Preparação das microemulsões
 - 3.2.2 Caracterização das microemulsões
 - 3.2.3 Avaliação da estabilidade
 - 3.2.4 Medidas eletroquímicas
 - 3.2.5 Medidas por eletroforese capilar
 - 3.2.5.1 Condicionamento e limpeza do capilar: microemulsões
 - 3.2.5.2 Condicionamento e limpeza do capilar: meios não aquosos
 - 3.3 Referências

Capítulo 4

- Resultados e Discussão
 - 4.1 Formação da microemulsão
 - 4.2 Estudos da estabilidade termodinâmica
 - 4.2.1 Temperatura de turbidez
 - 4.2.2 Adição de sal
 - 4.3 Caracterização físico-química das microemulsões com proporções variadas de surfactante:co-surfactante
 - 4.4 Espalhamento de luz dinâmico
 - 4.4.1 Coeficiente de difusão translacional

- 4.5 Absorção molecular
- 4.6 Medidas eletroquímicas
 - 4.6.1 Condutividade elétrica
 - 4.6.2 Voltametria
- 4.7 Eletroforese capilar
 - 4.7.1 Estudos utilizando microemulsões
 - 4.7.1.1 Estudos preliminares e separação dos solutos sondas
 - 4.7.1.2 Influência da temperatura, pH e composição do tampão
 - 4.7.1.3 Injeção de óleos vegetais e gorduras
 - 4.7.1.4 Mobilidade das gotículas e partição entre as fases
 - 4.7.1.5 Influência da hidrofobicidade e carga dos solutos
 - 4.7.1.6 Influência da percolação
 - 4.7.1.7 Resumo dos mecanismos de separação propostos em microemulsões de w/o
 - 4.7.1.8 Fatores de retenção e mobilidades
 - 4.7.2 Estudos utilizando meios não aquosos
 - 4.7.2.1 Seleção da mistura de solventes
 - 4.7.2.2 Otimização das condições de separação
 - 4.7.2.3 Separação de componentes naturais de óleos vegetais
 - 4.7.2.4 Estudos quantitativos
- 4.8 Referências

Capítulo 5

Conclusões

- 5.1 Caracterização das microemulsões
- 5.2 Estudos eletroquímicos
- 5.3 Estudos por eletroforese capilar
 - 5.3.1 Empregando microemulsões
 - 5.3.2 Empregando meios não aquosos

Anexos

Produção científica gerada

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Representação esquemática dos tipos de microemulsões. Microemulsão de óleo em água (a); microemulsão bicontínua (b); microemulsão de água em óleo ou microemulsão reversa (c).

Figura 2.2 – Modelo do diagrama de fases de uma mistura pseudo-ternária composta por água, óleo, surfactante e co-surfactante.

Figura 2.3 – Geometria de espalhamento em um experimento de espalhamento de luz. A subtração vetorial de k_e (feixe espalhado) e k_t (feixe transmitido) é igual ao vetor de espalhamento (q). Na figura, k_i representa o feixe incidente.

Figura 2.4 – Relação entre o vetor de espalhamento (q) e a dimensão máxima do objeto observável (L).

Figura 2.5 – Representação do espectro óptico da luz espalhada por uma partícula em movimento Browniano.

Figura 2.6 – Migração dos cátions em direção ao cátodo.

Figura 2.7 – Dependência do fluxo eletrosmótico em função do pH.

Figura 2.8 – Perfil do fluxo eletrosmótico presente em CE, comparado com o do fluxo pressurizado típico de HPLC.

Figura 2.9 – Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.

Figura 2.10 – Esquemas para a introdução de amostras em eletroforese capilar. Injeção hidrodinâmica: (a), (b) e (c); injeção eletrocínica (d).

Figura 2.11 – Estruturas moleculares: (I) Tocoferóis, $X = Y = Z = CH_3$ para α -tocoferol, $X = Z = CH_3$ e $Y = H$ para β -tocoferol, $Y = Z = CH_3$ e $X = H$ para γ -tocoferol, $Z = CH_3$ e $X = Y = H$ para δ -T (os correspondentes tocotrienóis têm também duplas ligações, entre 3'-4', 7'-8' e 11'-12'); (II) metil-4-hidroxibenzoato (metil parabeno); (III) 2-(*p*-hidroxifenil)etanol (tirosol); (IV) ácido 2,4-dihidroxibenzóico; (V) ácido *p*-metoxibenzóico (*p*-anísico); (VI) ácido *trans*-3-fenil-2-propenóico (*trans*-cinâmico); (VII) ácido *trans*-4-hidroxicinâmico (*p*-coumárico); (VIII) ácido *trans*-4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ferúlico); (IX) 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA); (X) 2,6-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno (BHT).

Figura 4.1 – Aparência dos sistemas compostos de óleo de soja, SDS e água, (a) contendo um co-surfactante e (b) na ausência de co-surfactante.

Figura 4.2 – Diagramas de fase pseudo-ternários das misturas de água/óleo/SDS e co-surfactante a 25 °C. A área delimitada indica o domínio da microemulsão. 1-pentanol, óleo de soja, SDS e água (a); 1-pentanol, óleo de soja, SDS e solução aquosa $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tripentilamina e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (b).

Figura 4.3 – Temperatura de turbidez das microemulsões preparadas com pentanol (a), com 3-metil-1-butanol (b) ou com hexanol (c), para diversas proporções em massa de surfactante e álcool.

Figura 4.4 – Funções de correlação de intensidade mediada no tempo para as microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, (□) com pentanol, (○) com 3-metil-1-butanol, em ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$. T = 25 °C.

Figura 4.5 – Função de correlação de intensidade mediada no tempo para a microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, com dependência angular.

Figura 4.6 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,3 % óleo, 43,3 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

Figura 4.7 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,0 % óleo, 43,2 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

Figura 4.8 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 39,7 % óleo, 42,1 % de 3-metil-1-butanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

Figura 4.9 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,5 % óleo, 43,6 % de pentanol, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

Figura 4.10 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,0 % óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

Figura 4.11 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 39,7 % óleo, 42,1 % de pentanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

Figura 4.12 – Relação entre a taxa de relaxação (Γ) e o quadrado do vetor de espalhamento (q^2), para as microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6 % de água, (a) pentanol, (b) 3-metil-1-butanol. $T = 25$ °C.

Figura 4.13 – Coeficiente de difusão translacional, D ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) em função da relação temperatura absoluta sobre viscosidade, T/η (K m s kg^{-1}) para a composição com 40,0% de óleo, 43,2% de 3-metil-1-butanol, 10,8% de SDS e 6,0% de água.

Figura 4.14 – Distribuição normalizada dos tempos de correlação como função da frequência (s^{-1}) para microemulsões com vários conteúdos de água à temperatura de 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°. (a) pentanol; (b) 3-metil-1-butanol.

Figura 4.15 – Distribuições normalizadas do tempo de correlação como função da frequência (s^{-1}), para uma microemulsão com 7,5% de água, em várias temperaturas, a ângulo de espalhamento de 90°, contendo como co-surfactante: pentanol (a); 3-metil-1-butanol (b).

Figura 4.16 – Espectro de UV-visível do óleo (a); da microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS, 6,0 % de água, sem ferroceno (b) e com $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno (c).

Figura 4.17 – Valores de condutividade para diferentes composições de microemulsões em função da temperatura. **a)** 39,7 % óleo, 42,1 % de pentanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água; **b)** água.40,0 % óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água; **c)** 39,7 % óleo, 42,1 % de 3-metil-1-butanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água; **d)** água.40,0 % óleo, 43,2 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água; **e)** 40,5 % óleo, 43,6 % de pentanol, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água; **f)** 40,3 % óleo, 43,3 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água.

Figura 4.18 – Voltamogramas da oxidação das microemulsões contendo **(A):** a) 40,5 % de óleo, 43,6 % de pentanol, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água; b) 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água; c) 39,7 % de óleo, 42,1 % de pentanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água. **(B):** a) 40,3 % de óleo, 43,3 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água; b) 40,0 % de óleo, 43,2 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água; c) 39,7 % de óleo, 42,1 % de 3-metil-1-butanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água. Eletrodo de trabalho ume de Pt vs. Pt *quasi* referencia e $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 4.19 – Voltamograma das microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, (a) sem ferroceno e (b) com $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ferroceno; (c) com $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; (d) com $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho ume de Pt, eletrodo de referência Pt *quasi*-referência e $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 4.20 – Relação entre concentração de ferroceno e corrente limite para reação de oxidação em ume de Pt vs. *quasi* referência Pt, na microemulsão contendo pentanol como co-surfactante, $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 4.21 – Voltamograma da microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS, 6,0 % de água e $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno; (a) $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$; (b) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (c) $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (d) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de trabalho ume de Pt, eletrodo de referência de AgCl/Ag.

Figura 4.22 – Relação entre $v^{1/2}$ e corrente de pico anódica, para microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS, 6,0 % de água e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ferroceno. Eletrodo de trabalho ume de Pt vs. eletrodo de referência de AgCl/Ag, $v = 10, 20, 50, 100, 200$ e 500 mV s^{-1} .

Figura 4.23 - Relação E vs. $\log i/(i_{lim} - i)$ obtida a partir de um voltamograma linear da oxidação de $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno em microemulsão. Ume de Pt vs. AgCl/Ag e velocidade de varredura 1 mV s^{-1} .

Figura 4.24 – Voltamograma da microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, (a) sem ácido oléico; (b) com $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido oléico, (c) com $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; (d) com $7 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido oléico. Eletrodo de trabalho ume de Pt, eletrodo de referência AgCl/Ag e $v = 2 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 4.25 – Eletroferogramas obtidos em um BGE constituído por uma microemulsão de w/o preparada com um tampão aquoso de Tris $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,4, registrado a 240 nm. Solutos ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada soluto injetados em microemulsão): salicilato (I), 2-aminoantraquinona (A), anilina (B), 3,4,5-trimetoxibenzoato (C) e ftalato (II).

Figura 4.26 – Eletroferogramas obtidos nos valores de pH e temperatura indicados nos traços; BGE constituído por uma microemulsão de w/o preparada com um tampão aquoso de Tris $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,4, registrado a 240 nm. Solutos: salicilato (I), OG (A), tereftalato (B), piromelitato (C) e ftalato (II).

Figura 4.27 – Eletroferogramas monitorados nos comprimentos de onda indicados nos traços; BGE constituído por uma microemulsão de w/o preparada com um tampão aquoso de Tris $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,4, registrado a 240 nm. Amostra de azeite de oliva aditivada com salicilato (I), BHA (A), BHQ (B), PG (C), OG (D) e ftalato (II) foi misturada com a microemulsão (razão 1:4 em peso) e injetada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada soluto na mistura); pico E refere-se aos TAGs do azeite de oliva.

Figura 4.28 – Condutividade *versus* percentagem de água para a microemulsão constituída por água e 1:4 SDS/ n-pentanol ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Figura 4.29 – Miscibilidade do óleo de soja com a mistura propanol - metanol a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Figura 4.30 – Eletroferograma obtido com um BGE constituído por uma solução $8 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de dietilamina e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm. As soluções dos ácidos salicílico (SA), trimetoxibenzóico (TMBA) e benzóico (BA) foram preparadas em óleo de soja refinado ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada), diluídas 1:1 com propanol e injetadas.

Figura 4.31 – Eletroferograma obtido com um BGE constituído por uma solução $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm. As soluções de ácido salicílico (SA), BHA e BHT foram preparadas em óleo de soja refinado ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada), diluídas 1:1 com propanol e injetadas.

Figura 4.32 – Eletroferograma obtido por injeção de óleo de soja refinado aditivado com ácido salicílico (SA), BHA e BHT; BGE constituído por uma solução $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm.

Figura 4.33 – Eletroferogramas obtidos por injeção de óleo de soja com BHA e BHT; BGE constituído por uma solução $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em propanol com concentrações variadas de metanol (indicadas nos traços); monitoramento feito a 220 nm.

Figura 4.34 – Eletroferogramas obtidos por injeção de diversos óleos, usando um BGE $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de propanol/ metanol (85:15 v/v), monitorando-se a 220 nm. O número nos picos indica metil parabeno (1), 2,4-dihidroxibenzoato (2), tirosol (3), p-comarato (4), trans-cinamato e p-anisato (pico não resolvido) (5), e ferulato (sobreposto ao δ -T) (6).

Figura 4.35 – Eletroferograma do protetor labial dissolvido em propanol (1:4), obtido com um BGE constituído por uma solução $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm.

Lista de Tabelas

Tabela I – Características dos diferentes tipos de estruturas organizadas formados na presença de surfactantes

Tabela II – Composição das microemulsões de w/o obtidas variando-se o conteúdo de água, para 1-pentanol e 3-metil-1-butanol como co-surfactante

Tabela III – Estabilidade das microemulsões preparadas com 3-metil-1-butanol como co-surfactante, em diferentes proporções de surfactante:co-surfactante, frente a concentrações crescentes de tetraborato de sódio

Tabela IV – Dados da caracterização físico-química das microemulsões de água em óleo com diferentes co-surfactantes e razões surfactante:co-surfactante, contendo 6 % de água e 40 % de óleo

Tabela V – Raio hidrodinâmico (R_h) médio das microemulsões compostas de diferentes proporções de óleo de soja, SDS, pentanol ou 3-metil-1-butanol e água, em função da temperatura

Tabela VI – Valores do coeficiente de difusão ($D_{w/o}$) obtido através das medidas de espalhamento de luz dinâmico para a microemulsão com 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água

Tabela VII – Variâncias das distribuições dos tempos de relaxação (CONTIN) para vários conteúdos de água e temperaturas. Ângulo de espalhamento: 90°

Tabela VIII – Características físico-químicas dos co-surfactantes e das microemulsões compostas de 8% de água, 14,2 % de SDS, 20% de óleo de soja e 57,8 % de co-surfactante, utilizando diferentes co-surfactantes, na proporção de 1:4 SDS:álcool

Tabela IX – Dados eletroquímicos para a microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água. Condutividade, limite anódico e catódico e potenciais $E_{1/2}$ para a oxidação de H_2O 3 mol L^{-1} sem e com $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de Ferroceno (Fc) em um ume de Pt. $D_{w/o}$ e D_{Fc} calculados da Equação (2.10).

Tabela X – Valores de coeficiente de difusão obtidos por medidas eletroquímicas ($D_{w/o}$ electrochem.) e de espalhamento de luz dinâmico ($D_{w/o}$ DLS) para as microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 10,8 % de SDS, 38,5 % de pentanol ou 3-metil-butanol e diferentes % de água. $T = 25$ °C.

Tabela XI - Tempos característicos de estado transiente ($\delta/r=0,1$) em um UME de $1 \mu\text{m}$ de raio para diferentes valores de coeficiente de difusão

Tabela XII - Potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) e correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) obtidos por voltametria cíclica, em diferentes velocidades de varredura. Ultramicroeletrodo de Pt de $1 \mu\text{m}$ de raio vs. eletrodo de referência de AgCl/Ag em microemulsão contendo 20 mol L^{-1} de ferroceno

Tabela XIII – Tempo de migração relativo (t_R') e mobilidade (μ_r) de acordo com as equações 4.4 e 4.8 e, desvio padrão (σ) do tempo de migração absoluto, para diversos solutos em uma microemulsão de w/o com fase contínua polar

Tabela XIV – Mecanismos de separação propostos de solutos neutros e aniônicos em microemulsão w/o constituída por surfactantes aniônicos

Tabela XV – Constantes físicas do metanol e de outros solventes polares que apresentam miscibilidade com pelo menos 50 % de óleo de soja

Tabela XVI – Picos observados em diversas preparações farmacêuticas contendo óleos vegetais

Lista de abreviaturas e símbolos

- AOT – aerosol OT ou bis(2-etil-hexil)sulfosuccinato de sódio
- BGE – eletrólito de corrida
- BHA – tert-butil-hidroxianisol
- BHL – balanço-hidrofílico-lipofílico
- BHQ – tert-butil-hidroxiquinona
- BHT – tert-butil-hidroxitolueno
- CE – eletroforese capilar
- GC – cromatografia de gases
- D – coeficiente de difusão
- DLS – espalhamento de luz dinâmico
- DMFA – dimetilformamida
- DMSO – dimetilsulfóxido
- E – potencial
- $E_{1/2}$ – potencial de meia onda
- E° – potencial padrão formal
- EOF – fluxo eletroosmótico
- Fc – ferroceno
- HEC – hidroxietilcelulose
- i – corrente
- IBPI – iodeto de 1-(4-iodobutil)-1,4-dimetilpiperazínio
- i_{lim} – corrente limite
- i_{pa} – corrente de pico anódica
- i_{pc} – corrente de pico catódica
- MEEKC – cromatografia eletrocínica de microemulsão
- m/m – massa/massa
- NACE – eletroforese capilar em meio não aquoso
- NCP – fase contínua apolar
- NP HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal
- OG – galato de octila
- o/w – óleo em água
- PCP – fase contínua polar

PG –galato de propila

PVA – álcool polivinílico

Rh – raio hidrodinâmico

RMEEKC – cromatografia eletrocinética de microemulsão reversa

RP HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

SDS – dodecil sulfato de sódio

TAGs – triacilgliceróis

THF – tetrahidrofurano

t_R' – tempo de migração relativo

tris – tris(hidroximetil) aminometano

ume – ultramicroeletrodo

v – velocidades de varredura do potencial

vs. – *versus*

v/v – volume/volume

w/o – água em óleo

Γ – taxas de relaxação

α -T – α -tocoferol

β -T – β -tocoferol

δ -T – δ -tocoferol

γ -T – γ -tocoferol

η – viscosidade

μ_r – mobilidade relativa

θ – ângulo de espalhamento

Resumo

Amostras de óleo vegetal foram preparadas na forma de microemulsão de água em óleo (w/o) utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) como surfactante e um álcool como co-surfactante. As microemulsões foram caracterizadas através de medidas de viscosidade, índice de refração, condutividade elétrica, espalhamento de luz dinâmico e voltametria. Ensaio preliminares para a quantificação de analitos por análise direta foram realizados por voltametria linear e eletroforese capilar. As microemulsões de água em óleo de soja apresentaram gotículas de dimensões nanométricas e estabilidade termodinâmica dependente da temperatura, da concentração dos eletrólitos dissolvidos e da natureza do co-surfactante empregado. Por outro lado, o raio hidrodinâmico das gotículas (R_h) diminuiu com o aumento da temperatura. Quanto aos valores de condutividade, maiores do que os obtidos para o óleo de soja e para a água deionizada, aumentam com a temperatura, na faixa de 20 a 65 °C, e com o teor de água na microemulsão, entre 5 e 7,5 % de água. A maior estabilidade termodinâmica foi alcançada para uma microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, em massa, na razão 1:4 [SDS]:[álcool]. Medidas voltamétricas com um ultramicroeletrodo de Pt em microemulsões contendo ferroceno ou ácido oléico dissolvidos evidenciaram a dependência linear das correntes limite anódica e catódica com a concentração da espécie eletroativa. Já a oxidação do ferroceno por voltametria cíclica, usando o mesmo ultramicroeletrodo, mostrou que a diminuição dos coeficientes de difusão nestes meios permite realizar medidas em estado transiente, empregando velocidades convencionais de varredura em potencial. Experimentos por cromatografia eletrocínética em microemulsão reversa (RMEEKC) com n-pentanol como fase contínua permitiram a separação de solutos neutros e aniônicos em amostras de óleo vegetal e gordura animal. Finalmente, foi desenvolvido um procedimento rápido para a separação e identificação dos biofenóis presentes em óleos, utilizando como eletrólito de corrida uma mistura de metanol e 1-propanol contendo KOH. Os resultados evidenciam a possibilidade de análise direta de óleos vegetais empregando métodos eletroanalíticos em microemulsões w/o, e métodos por eletroforese capilar, quer em microemulsões, quer em meio não aquoso.

Abstract

Samples of vegetable oils were prepared as water in oil (w/o) microemulsions using as surfactant and co-surfactant, respectively, Sodium dodecil sulfate and an alcohol. The microemulsions have been characterized through dynamic light scattering, viscosity, refraction index, electrical conductivity and voltammetric measurements. Besides, preliminary experiments were carried out to quantify chemical species through direct analysis using linear voltammetry and capillary electrophoresis. Water in soybean oil microemulsions present droplets with nanometric dimensions, the thermodynamic stability depending on the temperature, concentration of dissolved electrolytes and nature of the co-surfactant. On the other hand, the hydrodynamic radius R_h decreases with increasing temperature. As for conductivity values, they are higher for w/o microemulsions than for soybean oil or deionized water, increasing with temperature in the range of 20 to 65 °C and with the water content in the microemulsion, between 5 and 7,5 % of water. The higher thermodynamic stability of microemulsions was found for the composition 40,0 % oil, 43,2 % n-pentanol, 10,8 % SDS and 6,0 % water, in weight, that is, a 1:4 [SDS]:[n-pentanol] ratio. Voltammetric measurements at a Pt ultramicroelectrode in w/o microemulsions containing dissolved ferrocene or oleic acid showed that the anodic and cathodic limiting currents vary linearly with the concentration of the electroactive species. On the other hand, cyclic voltammetry of ferrocene at the same ultramicroelectrode showed that the diminished values for diffusion coefficient of chemical species in w/o microemulsions allow to attain a transient regime using conventional potential scan velocities. Reverse microemulsion electrokinetic chromatography using n-pentanol as the continuum phase allowed the separation of neutral and anionic solutes in vegetable oil and animal fat samples. Finally, a procedure using a solution containing KOH in a mixture of methanol and 1-propanol as background electrolyte has been developed for the rapid separation and identification of biophenols in oils. The results evidence that electroanalytical methods applied to w/o microemulsions and capillary electrophoresis methods, either using w/o microemulsions or nonaqueous medium, allow carrying on direct analysis of analites in vegetable oils.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Além da importância como alimento, os óleos vegetais também são valorizados por sua potencial aplicação como matéria-prima em produtos industrializados de grande valor econômico. Neste sentido, conhecer as características de um óleo vegetal pode fornecer importantes informações, entre outras, sobre os processos industriais de produção, a qualidade das matérias-primas, os tipos de embalagem ou as condições de estocagem a que estes óleos foram submetidos e os efeitos do processo de fritura. Mais especificamente, a detecção de produtos de oxidação, hidrólise, cisão, polimerização, presença de aditivos, adulterantes, contaminantes, ácidos graxos livres e outros, permite estabelecer parâmetros de qualidade dos óleos e dos principais produtos derivados, como medicamentos, cosméticos, detergentes, alimentos e combustíveis.

A análise de óleos vegetais, em geral, está associada à extração dos analitos empregando-se um solvente orgânico adequado. A eliminação das etapas de extração e pré-concentração de componentes minoritários presentes em óleos vegetais (em geral de grande valor agregado), aumenta a rapidez e reduz a possibilidade de erros aleatórios e sistemáticos na preparação da amostra para análise. Neste sentido, o preparo das amostras de óleo sob a forma de microemulsões de água em óleo permite eliminar dos procedimentos analíticos as etapas prévias de extração.

Microemulsões são sistemas compostos por no mínimo 3 componentes: água, óleo e um surfactante, fazendo-se frequentemente necessária a adição de um co-surfactante, normamente um álcool de cadeia média. Estes sistemas são muito estáveis, apresentam boas propriedades condutoras, em geral superiores às dos solventes orgânicos, e possuem a capacidade de dissolver simultaneamente substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas.

A baixa tensão superficial entre a água e o óleo, em geral inferior a $0,001 \text{ dina cm}^{-1}$, que é responsável por uma grande área interfacial, e a possibilidade de dissolver diversos tipos de substâncias, tornam as microemulsões atrativas para uma ampla variedade de aplicações.

Além da preparação sob a forma de uma microemulsão, o preparo de amostras de óleo por diluição com propanol e o uso de um eletrólito de corrida não aquoso, em procedimentos de eletroforese capilar, para determinação de antioxidantes naturais e separação de compostos fenólicos, também constitui uma metodologia inovadora na análise de óleos vegetais; ambos procedimentos permitem a execução de análises rápidas e de baixo custo.

1.2 OBJETIVOS

Para o desenvolvimento de metodologias de separação e identificação de espécies químicas orgânicas em óleos vegetais, estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- caracterizar microemulsões de água em óleo de soja através de medidas físico-químicas (condutividade, viscosidade e índice de refração), espectroscópicas (espalhamento de luz dinâmico) e eletroquímicas (determinação da janela eletroquímica e do comportamento eletroquímico do ferroceno em um ultramicroeletrodo de Pt);
- desenvolver estudos eletroanalíticos preliminares visando a quantificação de espécies presentes em óleo de soja (determinação de ácidos graxos livres);
- desenvolver estudos por eletroforese capilar para separação e identificação de compostos em microemulsão de w/o de óleos e gorduras por injeção direta da amostra no equipamento;
- desenvolver estudos por eletroforese capilar para separação, identificação e quantificação de diversos compostos (antioxidantes naturais e sintéticos e compostos fenólicos), por injeção direta de amostras de óleos vegetais em meios não aquosos.

Capítulo 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

A análise química de óleos vegetais é de grande importância, pois pode fornecer informações sobre a qualidade de um óleo ou da matéria-prima de origem, possibilitando ainda, desenvolver métodos de identificação e de separação específicos para determinadas espécies. É possível, por exemplo, determinar a presença de antioxidantes sintéticos e de produtos de decomposição (como ácidos graxos livres, hidroperóxidos e ácidos graxos polimerizados). Estas informações podem também viabilizar a geração de efluentes economicamente recuperáveis ou descartáveis sem dano ao meio ambiente.

A expressiva produção brasileira de soja (49.712.400 toneladas – safra de 2004), a qual coloca o Brasil como segundo produtor mundial, com rendimentos de cerca de 480 litros de óleo por hectare da planta, e o amplo consumo do óleo extraído desta oleaginosa no país (3,1 milhões de toneladas em 2004), especialmente nos processos de fritura, foram determinantes para a escolha deste óleo como o principal amostra em estudo neste trabalho.¹

2.2 Análise de óleos vegetais

Em geral, a análise de óleos vegetais é precedida da extração do analito por um solvente orgânico adequado. Mais recentemente, métodos de análise em microemulsões têm sido desenvolvidos. Estes constituem uma alternativa menos tóxica e mais barata do que o emprego de solventes orgânicos na análise química de óleos, em particular nos métodos eletroanalíticos.² A análise química de óleos vegetais compreende a determinação de uma série de compostos e propriedades que relacionam a qualidade do produto final com os processos industriais de produção, embalagem e estocagem.³⁻⁵ As determinações mais importantes são as seguintes:

- a) aditivos
- b) adulterantes
- c) contaminantes
- d) vitaminas
- e) produtos de decomposição
- f) gorduras e ácidos graxos
- g) voláteis ou óleos essenciais
- h) inorgânicos
- i) pH
- j) ácidos orgânicos.

Os resultados destas determinações permitem ainda avaliar o efeito do processo de fritura na qualidade do óleo e do produto alimentício final (oxidação, hidrólise, polimerização e cisão).⁶

Por outro lado, o conhecimento das propriedades físicas dos óleos vegetais, como viscosidade e densidade, são necessários para o dimensionamento de equipamentos industriais para bombeamento, destilação, tanques de estocagem, entre outros.⁷

Além de aspectos relacionados com a composição, a separação de componentes presentes nos óleos vegetais pode contribuir para a melhoria de qualidade do produto final,⁸ bem como gerar produtos de partida para a preparação de derivados, como por exemplo:

- vitaminas, como os tocoferóis e tocotrienóis, usados na indústria farmacêutica e cosmética;⁹
- monoglicéridios, empregados como emulsificantes nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos e, na produção de resinas e detergentes;¹⁰
- poliésteres de sacarídeos, empregados em alimentos dietéticos;¹¹
- ácidos e ésteres graxos e aromáticos, convertidos a álcoois por hidrogenação catalítica;¹²
- alquil oleatos, empregados na produção de lubrificantes vegetais.¹³

Além disso, conhecer a composição de um óleo é desejável para avaliar seu potencial emprego como biodiesel, que é uma importante e recente aplicação dos óleos vegetais.¹⁴⁻¹⁶

As técnicas analíticas instrumentais de uso corrente na análise de óleos são a espectroscopia de absorção e de emissão atômicas na determinação de inorgânicos,^{17,18} a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas e a espectroscopia na região do infra-vermelho com transformada de Fourier na determinação de voláteis e compostos orgânicos,¹⁹ e a cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de antioxidantes.^{20,21} São ainda empregados métodos eletroanalíticos²² e espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono 13 na determinação de outros contaminantes.²³

Por sua sensibilidade, rapidez e baixo custo, os métodos eletroquímicos permitem freqüentemente realizar estudos analíticos com vantagem em sensibilidade e/ou exatidão sobre outros métodos.

Os processos eletroquímicos em interfaces óleo-água têm merecido crescente atenção, com vistas a medidas quantitativas de variáveis termodinâmicas relativas a processos de extração por solventes e de transferência de carga. Assim, diversas metodologias têm sido propostas, tais como a extrusão lenta de uma fase orgânica para uma fase aquosa ou vice-versa, através de um capilar,²⁴ o uso de ultramicroeletrodos^{25,26} e mais recentemente, como alternativa importante, a preparação da amostra na forma de microemulsão.^{27,28}

2.3 MICROEMULSÕES

O termo microemulsão foi introduzido pelo químico inglês J.H. Schulman. Em 1943 ele descreveu o processo de transição de uma mistura estável rica em óleo para uma mistura estável rica em água e, em 1959, introduziu o termo “microemulsão” para designar este sistema.²⁹⁻³¹

Ao se misturar um líquido orgânico imiscível e um surfactante com água, forma-se, geralmente, uma emulsão leitosa-turva, a qual após algum tempo separa-se em

duas fases. Schulman observou em 1950 que esta emulsão turva e instável pode ser convertida em uma mistura opticamente transparente e termodinamicamente estável por adição de um álcool. Desde então, o número de publicações abordando este tema tem crescido continuamente e as microemulsões têm apresentado um incremento significativo de aplicações, tanto no campo das pesquisas como na indústria, em função de suas propriedades especiais.²⁹

Em razão do aumento da condutividade elétrica do sistema devido à presença de água, as microemulsões viabilizam procedimentos eletroanalíticos em amostras de óleos. O crescente número de pesquisas relacionadas ao uso de microemulsões deve-se também à preocupação de preservar o meio ambiente buscando alternativas para o uso de solventes orgânicos.^{29, 32, 33}

2.3.1 Definição e características das microemulsões

Microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis, opticamente transparentes, isotrópicos e de baixa viscosidade que contém uma fase dispersa (também conhecida como pseudo-fase) constituída por gotículas de tamanho nanométrico em uma fase contínua de um solvente imiscível com a fase dispersa. Elas são constituídas de água, um solvente hidrofóbico que é chamado de “óleo”, um surfactante e, freqüentemente, também de um co-surfactante, normalmente um álcool de cadeia média.³⁴⁻⁵⁰

Estes sistemas comportam-se de forma similar aos solventes orgânicos polares e, apesar de aparentemente homogêneos sob observação visual, as microemulsões são na verdade micro-heterogêneas (talvez nano-heterogêneas seria o melhor termo). São sistemas formados de partículas com diâmetro da ordem de 1 a 100 nm dispersas em uma fase contínua.^{33, 51-56} A transparência mostrada por estes sistemas deve-se ao fato do tamanho das partículas dispersas ser muito menor que os comprimentos de onda da radiação eletromagnética na região do visível.^{30, 57-59} Teorias termodinâmicas sobre a formação e a estabilidade das microemulsões foram desenvolvidas e relatadas em diversos trabalhos.⁶⁰

Uma mistura homogênea estável é transparente, enquanto uma mistura instável e não homogênea é turva, a menos que os componentes da mistura tenham índices de

refração idênticos. O estado de transparência pode ser quebrado por variação de temperatura, pressão ou composição da mistura e o ponto de transição, definido como ponto da incipiente separação de fases, é denominado ponto de turbidez.⁶¹ Quando uma mistura homogênea atinge a temperatura do ponto de turbidez, ela se torna turva, deixa de mostrar a transparência que caracteriza uma microemulsão e começa a separação de uma nova fase.

As microemulsões têm sido alvo de numeros estudos durante as últimas décadas, principalmente devido ao seu elevado poder dissolvente.⁶² Devido à mistura íntima das microfases água-óleo, elas podem dissolver espécies apolares, polares e iônicas, desde que sua composição seja adequadamente ajustada. Esta propriedade é similar à de soluções micelares, porém, a capacidade de solubilização simultânea de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas das microemulsões é muito maior do que a das micelas.³²

As propriedades condutoras das microemulsões são conferidas principalmente pelo surfactante ou pela adição de um eletrólito suporte. Devido a pequena tensão interfacial, normalmente menor que $0,001 \text{ dina cm}^{-1}$, estes sistemas são capazes de dissolver um elevado número de substâncias.^{29,52,57}

A microestrutura das microemulsões tem sido estudada por várias técnicas, como por exemplo técnicas espectroscópicas de espalhamento de luz (dinâmico e estático), relaxação dielétrica, fluorescência resolvida no tempo ou fosforescência *quenching*, espalhamento de neutrons a baixo ângulo (SANS) e espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS). Estas técnicas podem produzir informações bastante úteis sobre o núcleo e a estrutura da monocamada de surfactante ou surfactante/co-surfactante na interface das fases, distribuição de tamanho das partículas dispersas, polidispersão, agregados de gotículas e suas dinâmicas de difusão, bem como sobre a taxa de troca inter-gotículas e fluidez da monocamada.^{28,63 – 66}

Os métodos clássicos de determinação da viscosidade, tensão interfacial, condutividade, turbidez e pressão osmótica também fornecem muitas informações sobre estes sistemas.^{52,64,66 – 69} É particularmente importante o conhecimento das propriedades dinâmicas das gotículas suspensas para a compreensão das propriedades condutoras e das reações químicas e processos de transferência de massa que ocorrem nestes meios.⁶⁴

2.3.2 Tipos de microemulsões

Dependendo da polaridade da fase dispersa é possível distinguir três tipos de microemulsões: óleo em água (o/w), água em óleo (w/o) ou microemulsão reversa e microemulsões bicontínuas, que apresentam uma estrutura intermediária em que as fases percolam uma através da outra.^{2,35,59,66,70 – 75}

Estes tipos de microemulsões apresentam as seguintes características:

- a) Microemulsões de óleo em água – Apresentam uma fase aquosa contínua com gotículas de óleo dispersas, as quais estão recobertas pelo surfactante. O diâmetro destas gotículas mede em geral entre 10 e 100 nm.
- b) Microemulsões de água em óleo – Apresentam gotículas de água recobertas com surfactante dispersas em uma fase oleosa contínua e são em geral pouco condutoras. O diâmetro das mesmas mede em torno de 1 e 100 nm.
- c) Microemulsões bicontínuas – Tanto o óleo como a água apresentam-se como fases contínuas, formando uma rede dinâmica de canais de água e de óleo com monocamadas do surfactante nas interfaces.

A Figura 2.1 mostra a representação esquemática dos três tipos de microemulsões.

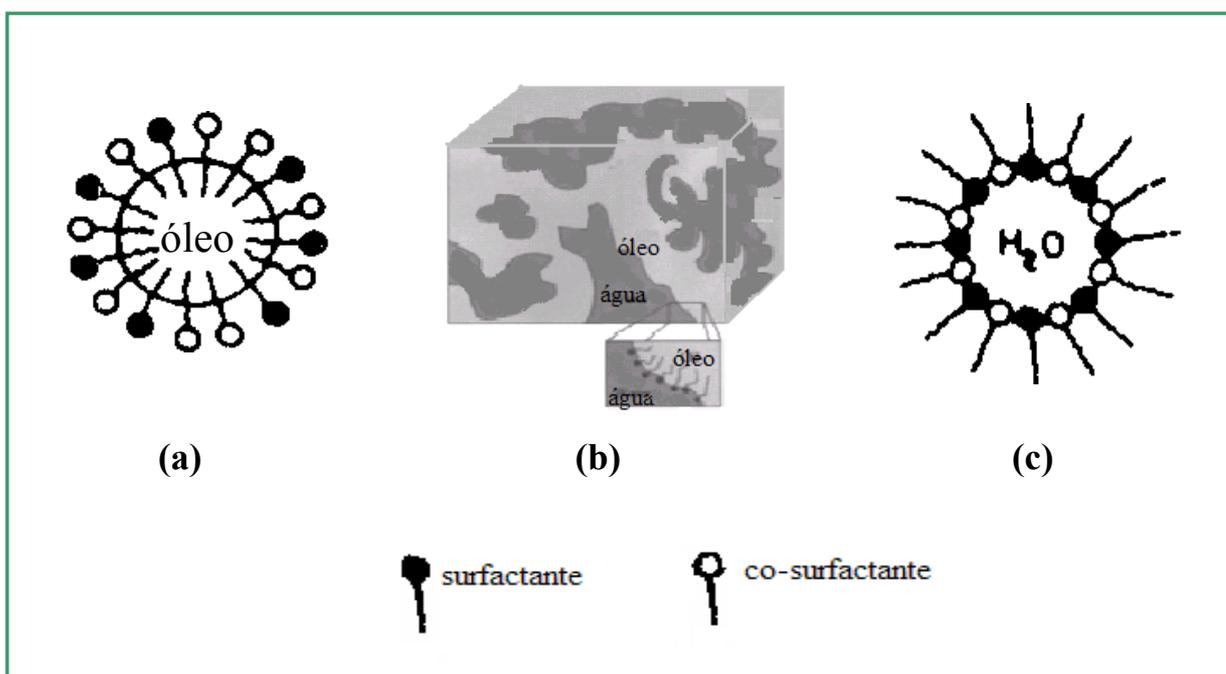


Figura 2.1 – Representação esquemática dos tipos de microemulsões. Microemulsão de óleo em água (a); microemulsão bicontínua (b); microemulsão de água em óleo ou microemulsão reversa (c).

2.3.3 Aplicações das microemulsões

A microemulsões preparadas com componentes biocompatíveis têm sua principal aplicação nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. A utilização das microemulsões na tecnologia farmacêutica é relativamente recente e tem despertado grande interesse como sistema de liberação de drogas no organismo.^{30,46,70} Este interesse justifica-se pelas seguintes vantagens:²⁹

a) a preparação das microemulsões é simples e, devido à grande estabilidade termodinâmica elas se tornam relativamente mais baratas do que as emulsões;

b) a falta de homogeneidade ou a presença de precipitados podem ser facilmente detectados devido à transparência óptica do sistema, podendo ser facilmente evitados;

- c) a estabilidade termodinâmica da mistura e o efeito estabilizador do surfactante melhoram a estabilidade dos fármacos e cosméticos na estocagem;
- d) formulações empregando microemulsões com surfactantes compatíveis com proteínas podem ser usados para soluções injetáveis;
- e) de acordo com alguns estudos, microemulsões como solvente não causam qualquer imuno reação ou risco de embolia, ao contrário das emulsões, por apresentarem gotículas consideravelmente menores, além disso, podem ter composição pré-definida;
- f) comparadas às formulações convencionais foram observadas taxas elevadas de difusão e penetração na pele para microemulsões em fármacos;

A principal desvantagem das microemulsões em relação às emulsões deve-se à utilização de concentrações elevadas de emulsionantes e co-emulsionantes, possibilitando a ocorrência de irritação local.⁷⁰ Portanto, esses componentes, além de permitir a formação dos sistemas devem também ser atóxicos e ter permissão para emprego em produtos farmacêuticos. Entretanto, esta limitação varia dependendo do uso pretendido para a preparação em questão, havendo maior disponibilidade de substâncias para produtos que visam a administração cutânea. As restrições são maiores para os produtos ingeridos por via oral ou que devem ser preparados de forma estéril (parenterais e oftálmicos).³⁰

Outras aplicações importantes deste sistema envolvem:

- a) a extração de petróleo, baseada na baixa tensão interfacial e boa propriedade emoliente das microemulsões, que aumenta consideravelmente a mobilização das gotículas de óleo aprisionadas nos poros dos reservatórios;^{76,77}
- b) a extração de metais nobres de minérios com baixo conteúdo de metais, por extração líquido-líquido e extração em 2 fases, com extratores orgânicos dissolvidos na microemulsão;⁷⁸
- c) a pesquisa de poluentes ambientais em amostras de solo e efluentes, por extração com microemulsões;^{45,79}

d) o emprego como aditivos em lubrificantes e óleos de corte, neste caso, dois efeitos benéficos são potencializados, a inibição na corrosão, em função da presença do surfactante, e a elevação da capacidade térmica sem alterar a estabilidade termodinâmica do meio, devido ao incremento do conteúdo de água proporcionado pelas microemulsões. O primeiro sistema utilizado para esta finalidade foi patenteado em 1930,²⁹

e) o emprego em processos de limpeza de tecidos ou superfícies sólidas, em função da baixa tensão interfacial permitir ótimos resultados na remoção de contaminantes e a melhoria na qualidade dos processos de tingimento e acabamento têxtil, devido a economia de corante e de energia, por permitir operar em temperaturas mais baixas.

Desde a década de 80 vêm sendo desenvolvidos estudos nas áreas de produção de nanopartículas de materiais como metais, semicondutores, supercondutores, materiais magnéticos e fotográficos, látex, entre outros, utilizando microemulsões como nanoreatores.^{30,50,80}

As numerosas aplicações, bem como o aumento do número de grupos de pesquisa engajados no estudo de microemulsões, demonstram sua importância em muitos ramos da química com uma expectativa de intensificação de seu uso em um futuro próximo.

2.3.4 Componentes das microemulsões

Os componentes das microemulsões são água, óleo, surfactante e freqüentemente, um co-surfactante. Além de água, soluções salinas diversas também podem ser empregadas como fase aquosa no preparo das microemulsões. Segundo a aplicação, esta fase pode conter diversos aditivos, como tampões, antibactericidas e agentes isotônicos.⁷⁰ A seguir são examinadas as características destes componentes.

2.3.4.1 Surfactantes

Surfactantes ou tensoativos são compostos anfílicos, orgânicos ou organometálicos, ou seja, substâncias caracterizadas pela presença em suas estruturas moleculares de duas regiões, uma polar e outra apolar.^{55,81,82}

A estrutura dos surfactantes iônicos, de uma forma geral, pode ser expressa como R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8–18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo cabeça (polar ou iônico). Dependendo da natureza de X, os tensoativos podem ser classificados como não iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros.^{81–83}

Um surfactante catiônico apresenta em geral a fórmula $R_nX^+Y^-$, onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento ou um grupo de elementos capaz de formar uma estrutura catiônica e Y é um contra íon. Em princípio, X pode ser N, P, S, As, Te, Sb, Bi ou um halogênio.⁸² Os sais de amônia quaternária formam uma das classes mais conhecidas de surfactantes catiônicos, como por exemplo: brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB), cloreto de cetilpiridínio (CICP) e cloreto de benzalcônio (BKC).^{51,71,82}

Entre os surfactantes aniônicos mais frequentemente utilizados estão os sais de ácidos carboxílicos (graxos) monopróticos ou polipróticos com metais alcalinos ou alcalino-terrosos e ácidos como sulfúrico, sulfônico e fosfórico contendo um substituinte de hidrocarboneto saturado ou insaturado. Exemplo destes surfactantes são: dodecil sulfato de sódio (SDS), dodecil benzeno sulfonato de sódio (DDBS), bis (2-etil hexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT) e di-hexadecil fosfato (DHF)⁸² e os sais biliares como colato de sódio (CS) e deoxicolato de sódio (SDC).⁸⁴

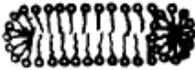
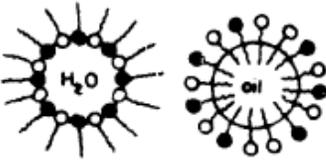
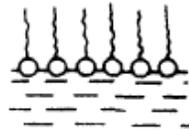
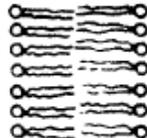
Os surfactantes anfóteros apresentam ambos os grupos, aniônico e catiônico e, dependendo do pH da solução e da estrutura química, pode prevalecer tanto a espécie aniônica como a catiônica ou a neutra. Os tensoativos anfóteros mais comuns incluem N-alquil e C-alquil betaína e sultaína, como também, álcool amino fosfatidil. Exemplos desta categoria são: 3-(dodecildimetil amônio) propano-1-sulfato (SB-12), 4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB), bem como, diversas lecitinas.^{82,85}

Os tensoativos não-iônicos são derivados do polioxietileno e polioxipropileno (de compostos com alquil fenol e álcool, ésteres de ácidos graxos, alquilaminas, amidas e mercaptanas) ou polialcoóis, ésteres de carboidratos, amidas de álcoois graxos e óxidos de amidas graxas. Exemplos: Polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol (Triton X-100), polioxietileno (23) dodecanol (brij 35), polioxietileno-10-dodecil éter ($C_{12}E_{10}$), polioxidoetileno-10-oleil éter ($C_{18:1}E_{10}$ ou Brij 97), N,N-dimetildodecilamina-N-óxido (DDAO) e N,N-dimetiloctilamina-N-óxido (DOAO), tween 80[®] e tween 60[®].^{46,82}

Como exemplo de surfactantes usados no preparo de microemulsões não tóxicas podemos citar os fosfolipídeos (lecitinas), que podem ser administradas a pacientes por via parenteral, cutânea, oral ou ocular. Propileno glicol, tween 80[®], tween 60[®], retinol, palmitato de retinol e acetato de retinol também são outros exemplos de surfactates fisiologicamente aceitáveis.⁴³

A Tabela I indica alguns tipos de estruturas que os surfactantes podem formar na presença de água, óleo ou uma combinação dos 3 componentes.

Tabela I – Características dos diferentes tipos de estruturas organizadas formados na presença de surfactantes.⁸²

Características	Micelas	Micelas Inversas	Micro Emulsões	Monocapas	Bicapas	Vesículas
Constituinte	Tensoativo	Tensoativo	Tensoativo, co-tensoativo, solvente apolar	Tensoativo	Tensoativo com duas caudas	Tensoativo com duas caudas
Método de preparação	dissolver o tensoativo [$>CMC$]* em água	Dissolver o tensoativo em solvente apolar	Dissolver o tensoativo e co-tensoativo numa mistura de solventes apolar-água	Dissolver os tensoativos livres em solvente orgânico volátil sobre a superfície aquosa	Dissolver os tensoativos livres em solvente orgânico sobre um canal que conecta duas soluções aquosas	Submetendo a solução a ultrasom
Estrutura	 					
Peso molecular médio	2000-6000	2000-6000	10^5 - 10^6	Depende da área coberta e da densidade da capa formada	Depende da área e da densidade coberta da bicapa formada	$>10^7$
Diametro (Å)	30-60	40-80	50-100			300-10000
Estabilidade	Semanas, meses	Semanas, meses	Semanas, meses	Horas, dias	Horas	Semanas
Diluição em água	São destruídas	Formam micro emulsões aq/o	o/w + água = micelas aquosas w/o + água = separação de fases	São destruídas	São destruídas	Não se alteram

* CMC = concentração micelar crítica.

As principais características do uso de surfactantes estão relacionadas à formação de ambientes organizados.^{83,53} Em função da presença dos grupos hidrofílico e hidrofóbico na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, que é a responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes.⁸¹ Desta maneira, é possível formar microemulsões do tipo água em óleo (w/o) ou óleo em água (o/w), as quais são definidas principalmente pelo equilíbrio entre as partes polar e apolar da molécula do surfactante, denominado tecnicamente de balanço hidrofílico-lipofílico (BHL).^{50,86} O BHL é numericamente representado em uma escala de valores, em função do tamanho da cadeia polar do surfactante; valores inferiores a dez indicam predominância da parte apolar, tornando-os adequados para o preparo de microemulsões do tipo w/o, por outro lado, valores superiores a dez apontam a prevalência da região polar indicando o emprego dessas substâncias na obtenção de microemulsões o/w.^{30,31,83}

Surfactantes iônicos como dodecil sulfato de sódio, que apresenta BHL maior que 20, freqüentemente requerem a presença de um co-surfactante para reduzir seu BHL efetivo, dentro da faixa requerida para a formação de microemulsões.³¹

Apesar do recurso do balanço hidrofílico-lipofílico, é muito difícil prever com exatidão quais combinações de surfactante/co-surfactante e óleo serão capazes de produzir microemulsões. Além disto, o método do BHL não considera os efeitos da temperatura e da presença de eletrólitos no meio.^{46,83}

2.3.4.2 Co-surfactantes

Os co-surfactantes são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das microemulsões, além de promoverem a fluidificação do filme interfacial formado pelo emulsionante, o que impede a elevação significativa da viscosidade do sistema.⁷⁰ Adicionalmente, a presença de um álcool pode influenciar a solubilidade das fases aquosa e oleosa, devido à sua partição entre ambas as fases.⁷¹

A repulsão das cargas dos grupos polares dos surfactantes iônicos impede a existência de um empacotamento eficiente, já que a tensão superficial não está suficientemente reduzida. A adição de um co-surfactante reduz a tensão superficial do sistema a quase zero, levando à formação de uma camada interfacial mais estável e, conseqüentemente aumentando a estabilidade das microemulsões.^{59,71}

Os principais co-surfactantes utilizados no preparo de microemulsões são álcoois e glicóis, de massa molecular pequena ou média, que apresentam uma cadeia contendo entre dois e dez carbonos.^{30,70,87} Os álcoois mais usados são: 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol.⁵¹

2.3.4.3 Óleos

O tamanho da cadeia alquílica do óleo influencia fortemente a distribuição do co-surfactante nas fases óleo e água, bem como a composição e as propriedades físico-químicas das microemulsões.^{55,64} Relatos da literatura descrevem que, em presença de surfactantes não iônicos e catiônicos, a partição do álcool (co-surfactante) na interface das gotículas é favorecida pelo emprego de óleos com cadeias carbônicas longas.^{55,87}

As substâncias mais empregadas como fase oleosa são: n-alcanos, em geral com cadeias contendo de 6 a 12 átomos de carbono; compostos aromáticos, como benzeno e tolueno;^{55,64} álcoois de cadeia média, como octanol e decanol;⁸⁰ ainda, substâncias como tetracloreto de carbono e triacilgliceróis também são exemplos de fase oleosa em microemulsões.⁸⁸

No preparo de microemulsões biocompatíveis, os óleos polares, como triacilgliceróis de cadeia média ou longa são preferidos ao invés de óleos apolares, pois solubilizam melhor os princípios ativos. Os óleos vegetais como o de soja e rícino são bastante usados, em especial para o preparo de microemulsões de o/w.⁷⁰

2.3.5 Diagrama de fases

Na preparação das microemulsões, a construção de diagramas de fase pseudoternários permite definir a extensão e a natureza das regiões de formação destes sistemas. Para isto, após a seleção dos constituintes da formulação, um diagrama é construído, admitindo-se que as microemulsões são sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fase oleosa e uma mistura surfactante/co-surfactante, sendo que cada vértice do diagrama indica 100 % de um destes componentes, de acordo com o que está mostrado na Figura 2.2. Assim, qualquer combinação dos constituintes pode ser representada de forma percentual no diagrama.^{30 – 32,76}

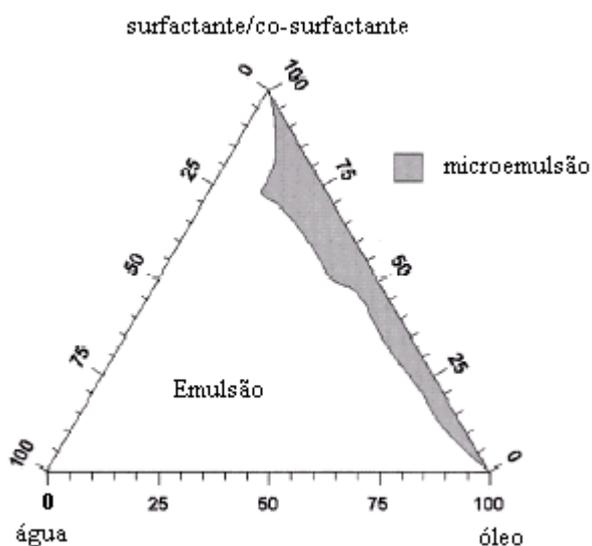


Figura 2.2 – Modelo do diagrama de fases de uma mistura pseudo-ternária composta por água, óleo, surfactante e co-surfactante.¹⁵

2.4 ESPALHAMENTO DE LUZ

Entre as técnicas espectroscópicas disponíveis para investigar sistemas micro-heterogeneos, particularmente microemulsões, as de espalhamento de luz são as mais versáteis e não destrutivas.^{28,89 – 91}

O espalhamento de luz é um fenômeno no qual se baseiam várias técnicas experimentais que têm sido largamente empregadas na análise de inúmeros sistemas nos últimos sessenta anos. Em especial somente após o surgimento de sistemas de detecção do tipo fotomultiplicadores, que aliados a fontes de laser com alta intensidade, coerência e estabilidade de frequência, tornou-se possível executar medidas relativamente fáceis das mudanças dos deslocamentos de frequência da luz espalhada.^{92 – 94}

2.4.1 Princípio

Se uma partícula está sujeita à ação de um campo elétrico, proveniente da radiação eletromagnética, este campo induzirá na partícula um momento de dipolo, gerando um movimento oscilatório, que por sua vez, produzirá luz espalhada em todas as direções (Figura 2.3).^{93 – 95} A luz espalhada por uma determinada amostra produz diversas informações, sendo que o tipo de informação que se pode extrair varia segundo a técnica empregada. As diferenças entre as técnicas ficam por conta das variadas distribuições e faixas de frequência da luz espalhada em relação a luz incidente, na qual se realiza a análise dos dados.

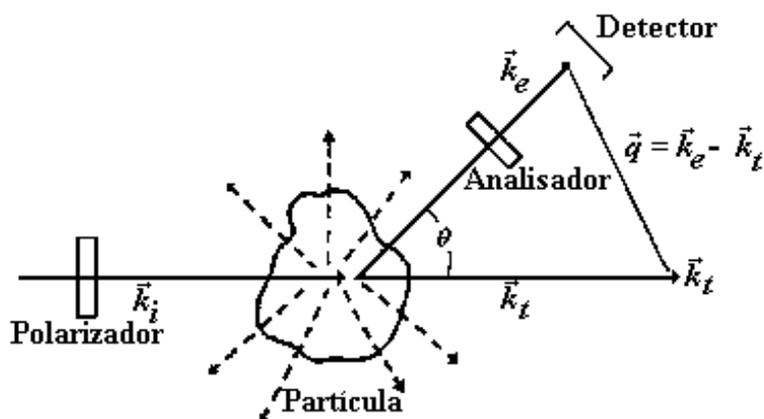


Figura 2.3 – Geometria de espalhamento em um experimento de espalhamento de luz. A subtração vetorial de \vec{k}_e (feixe espalhado) e \vec{k}_t (feixe transmitido) é igual ao vetor de espalhamento (\vec{q}). Na figura, \vec{k}_i representa o feixe incidente.

Nos experimentos de espalhamento de luz, o vetor de espalhamento (q) constitui-se em uma variável de grande importância, pois este está diretamente relacionado às dimensões do objeto observado. A figura 2.4 mostra a relação entre o vetor de espalhamento e a maior porção do objeto observável (L).

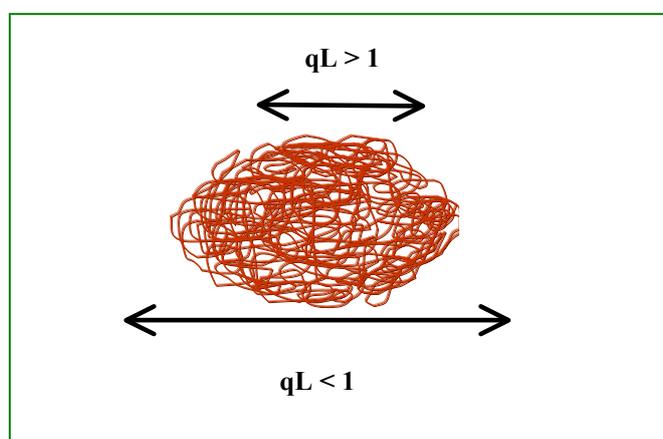


Figura 2.4 – Relação entre o vetor de espalhamento (q) e a dimensão máxima do objeto observável (L).

Tratando-se de um sistema, a luz espalhada pelo mesmo pode ser relacionada com as suas heterogeneidades; não havendo heterogeneidade, não há espalhamento de onda eletromagnética. Porém, como somente o vácuo é perfeitamente homogêneo, em princípio, todos os meios são capazes de espalhar radiação. Em um líquido puro, as

heterogeneidades devem-se às flutuações locais de densidade enquanto em soluções elas estão relacionadas com as flutuações locais de concentração.³³

2.4.2 Tipos de espalhamento de luz

O espalhamento de luz divide-se em elástico, quase-elástico (onde se classifica o espalhamento de luz dinâmico, DLS) e inelástico. No espalhamento de luz elástico, a radiação espalhada possui frequência idêntica à da luz incidente e somente é considerada a luz espalhada em uma dada direção ($\delta\omega = 0$). Por outro lado, o espalhamento inelástico é originado dos espalhamentos com frequências maiores ou menores do que a frequência incidente, decorrentes das transferências de energia do sistema material para o dipolo induzido. Já o espalhamento de luz quase-elástico produz-se quando são observadas pequenas diferenças entre as frequências da luz espalhada e da luz incidente, neste caso, além das flutuações nos valores de intensidade de luz espalhada são consideradas também as distribuições de frequências ($\delta\omega \neq 0$).^{94,96}

Estas flutuações na intensidade da luz espalhada são manifestações dos deslocamentos na frequência dos fótons espalhados ($\pm\Delta\nu$), sendo que a magnitude e o sinal do deslocamento dependem da velocidade e da direção (em relação à radiação incidente) do deslocamento da partícula. Assim, a luz espalhada consiste de um estreito espectro Lorentziano de frequências centrado em torno da frequência incidente do laser (ν_0) (Figura 2.5).

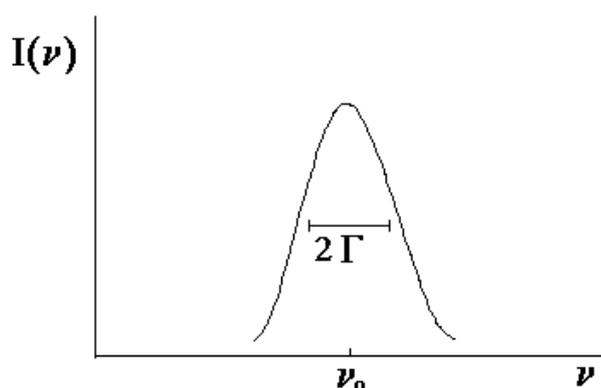


Figura 2.5 – Representação do espectro óptico da luz espalhada por uma partícula em movimento Browniano.

2.4.3 Espalhamento de luz dinâmico

No espalhamento de luz dinâmico, as flutuações na intensidade da luz espalhada se originam de modificações locais do índice de refração da solução, as quais são decorrentes das flutuações locais na concentração da solução, que por sua vez originam-se da difusão translacional ou rotacional das espécies ou da solução.⁹⁷

Com o auxílio de um correlador, o número de fótons que chegam ao detector num certo intervalo de tempo é contado repetidamente e a função de correlação temporal das flutuações de intensidade da luz espalhada é computada. Através da função de correlação temporal, tem-se a correlação dos sinais de intensidade obtidos durante um certo tempo, ordenados de forma periódica. No espalhamento de luz dinâmico, a função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada $G_2(\tau)$ é o parâmetro medido:

$$G_2(\tau) = \langle I(0) I(\tau) \rangle \quad (2.1)$$

que pode ser normalizado através da linha de base $\langle I \rangle^2$ para produzir:

$$g_2(\tau) = G_2(\tau) / \langle I \rangle^2 \quad (2.2)$$

onde τ é o tempo de retardo.

Se as flutuações no campo espalhado mostram uma distribuição Gaussiana, a função de autocorrelação de intensidade normalizada $g_2(\tau)$ pode ser relacionada com a função de correlação do campo elétrico $g_1(\tau)$ através da relação de Siegert:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta[g_1(\tau)]^2 \quad (2.3)$$

onde β é o fator de coerência óptica que depende somente do arranjo da óptica experimental. No caso de um sistema ideal monodisperso, $g_1(\tau)$ é representada como uma exponencial simples:

$$g_1(\tau) = \exp(-Dq^2\tau) \quad (2.4)$$

onde D é o coeficiente de difusão translacional e q é a magnitude do vetor de espalhamento.⁹⁸

$$q = (4\pi n/\lambda) \sin\theta/2 \quad (2.5)$$

dado em termos do índice de refração do meio, n , do comprimento de onda da radiação no vácuo, λ , e do ângulo de espalhamento, θ .

Considerando que as flutuações no sinal de intensidade originam um alargamento e uma distribuição na frequência em torno da frequência central, a medida da meia-largura à meia-altura da curva de distribuição das frequências corresponde à taxa de relaxação (Figura 2.3).⁹⁹

Quando o sistema é polidisperso, o que é um caso comum, a função de correlação do campo deve ser descrita por uma soma ponderada de exponenciais:⁹⁴

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad (2.6)$$

onde $G(\Gamma)$ é a função de distribuição das taxas de relaxação.

Um dos métodos que pode ser aplicado para a análise da função dada pela Equação (2.6) é o programa CONTIN¹⁰⁰ o qual determina $G(\Gamma)$ executando uma transformada de Laplace inversa na Equação 2.6.⁸⁹

Quando a difusão é puramente translacional, é válida a equação:¹⁰¹

$$\Gamma = D q^2 \quad (2.7)$$

onde Γ é a taxa de relaxação em segundos⁻¹, q^2 é o vetor de espalhamento ao quadrado em m⁻² e, D é o coeficiente de difusão translacional em m² s⁻¹.

Aplicando-se a equação de Stokes-Einstein, obtém-se o raio hidrodinâmico:

$$R_h = k T / 6 \pi \eta_0 D \quad (2.8)$$

onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em K, η_0 é a viscosidade do solvente e D o coeficiente de difusão.^{33,102-104}

2.5 VOLTAMETRIA EMPREGANDO ULTRAMICROELETRODOS

2.5.1 Introdução

Por sua rapidez e baixo custo, métodos eletroquímicos de análise são empregados na quantificação de metais presentes em óleos comestíveis, bem como no estudo da cinética de processos de corrosão de dutos e tanques de armazenagem em plantas industriais.¹⁰⁵

Os princípios teóricos dos métodos eletroanalíticos são bem conhecidos e as técnicas voltamperométricas são intensivamente empregadas. A partir de curvas intensidade de corrente-potencial, estas técnicas fornecem informações como o potencial de meia-onda, $E_{1/2}$, que permite identificar a espécie analisada e a corrente limite, i_{lim} (corrente de eletrólise no estado estacionário em que o transporte de massa por difusão limita a velocidade da reação), que dá sua concentração. Além disto, obtém-se a partir destas técnicas as constantes termodinâmicas (potencial padrão de redução, constante de dissociação ácida, produto de solubilidade e formação de complexos), a constante de velocidade de uma reação e informações quanto aos mecanismos de reações de oxidação-redução.¹⁰⁶

Os métodos eletroquímicos requerem o conhecimento da diferença de potencial (ddp) entre o eletrodo de trabalho, onde ocorre a reação de oxidação ou de redução em estudo, e a solução. A rigor, na prática, como o valor da resistência elétrica da solução, R , é desconhecido, não é possível impor ou medir o valor desta ddp. No entanto, é possível controlar a relação $V = E + iR$, onde V , o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho ou o potencial medido, inclui necessariamente o valor da queda ôhmica iR , onde i é a corrente que circula no eletrodo de trabalho. Ademais, quando a corrente ou a resistência são muito elevadas, o valor da queda ôhmica iR predomina frente ao de E , mascarando a relação entre E e i , o que impõe limitações aos valores de constante dielétrica, força iônica e concentração na solução em estudo.¹⁰⁷

A partir de 1960, a aplicação de métodos eletroquímicos em estudos biológicos aceleraram o desenvolvimento tecnológico de eletrodos cada vez menores para determinações potenciométricas “in vivo”.¹⁰⁸ Eletrodos com dimensões micrométricas

denominados ultramicroeletrodos (ume), ou seja, eletrodos com pelo menos uma das dimensões menor que $25 \mu\text{m}^{109}$ empregados em métodos voltamperométricos, tiveram suas vantagens reportadas em publicações a partir de 1975.¹¹⁰⁻¹¹²

O campo de aplicação dos métodos eletroanalíticos aumentou significativamente com o uso de ultramicroeletrodos.^{113,114} Até o início dos anos 80, estas medidas restringiam-se a soluções envolvendo solventes de elevada constante dielétrica ($\epsilon \geq 20-30$), força iônica elevada ($\geq 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), e concentrações relativamente baixas da espécie em estudo ($\leq 0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Medidas voltamétricas utilizando ultramicroeletrodos podem ser realizadas diretamente no óleo,¹¹⁵ para monitorar a sua degradação,¹¹⁶ ou detectar a presença de aditivos, como antioxidantes sintéticos.¹¹⁷

As técnicas eletroquímicas podem ainda fornecer valiosas informações relativamente à estrutura química, interações inter-partículas e dados de transporte de massa e de carga em diversos meios.^{63,75,118}

Sabe-se que microemulsões com fase contínua aquosa (o/w ou bicontínuas) apresentam uma condutividade elétrica relativamente alta quando comparada com os sistemas de fase orgânica contínua (w/o), e que a condutividade das microemulsões de w/o também pode ser elevada relativamente à de solventes apolares e de óleos vegetais.^{66,119} Esta característica indica a possibilidade de aplicação de métodos eletroquímicos no estudo destes sistemas. Entretanto, há poucos estudos empregando métodos eletroanalíticos em microemulsões de água em óleos vegetais (w/o). Assim, considerando que, em sua maioria, as espécies de interesse presentes em óleos comestíveis constituem componentes minoritários, torna-se desejável para fins de determinação analítica quantitativa maximizar a quantidade de óleo presente na microemulsão.^{22,91,119}

2.5.2. Voltametria no estado estacionário

Para uma reação de oxidação-redução em que o analito dissolvido na solução se oxida ou se reduz na superfície do eletrodo, a velocidade da reação depende da velocidade de transporte do analito do seio da solução até a superfície do eletrodo, da velocidade do processo de transferência de carga, da cinética de reações químicas que precedem ou seguem a reação eletroquímica e de outros fenômenos, como por exemplo, adsorção na superfície do eletrodo. Em geral, no estado estacionário, existe uma relação entre o potencial aplicado, a corrente de eletrólise e o tempo de aplicação do potencial dado por $f(E,i,t) = 0$ que pode ser simplificada para $f(E,i) = 0$, correspondendo a um valor constante das concentrações das espécies presentes na vizinhança do eletrodo, o que requer um transporte de matéria eficaz na solução. O transporte por difusão, difusão convectiva ou por uma combinação de efeitos de difusão e migração permite alcançar o estado estacionário.¹²⁰

Na voltametria linear o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia de um potencial inicial E_0 a um potencial final E com uma velocidade de varredura constante v de acordo com a equação:

$$E = E_0 + vt \quad (2.9)$$

Quando o potencial do eletrodo é varrido de um valor no qual nenhuma reação ocorre no eletrodo até alcançar a corrente limite da reação, a concentração de substâncias eletroativas na superfície do eletrodo decai a zero. Nestas condições se desenvolve um gradiente de concentração entre a região da superfície do eletrodo até o centro da solução. O volume de solução, dentro do qual ocorre o fluxo difusional, é designado camada de difusão δ (espessura da camada de solução adjacente à superfície do eletrodo de trabalho onde, de acordo com o modelo de Nernst, ocorre a difusão da espécie que se reduz ou que se oxida). Por sua vez, o fluxo de substâncias na direção do eletrodo é descrito pelo produto do coeficiente de difusão da substância (D) e de sua concentração, dividido pela espessura da camada de difusão.

Pode-se dizer que no caso dos microeletrodos, sob dadas condições experimentais, as dimensões do eletrodo são comparáveis ou menores do que δ e, nestas

condições, atinge-se um estado estacionário ou estado pseudo-estacionário (no caso de eletrodos cilíndricos).¹²¹

A expressão da corrente limite, i_{lim} , para um ultramicroeletrodo de disco é dada por:^{122,123}

$$i_{lim} = 4 n F D C r \quad (2.10)$$

onde r é o raio do ume, n o número de elétrons envolvidos na reação redox, F o Faraday e D e C , respectivamente, o coeficiente de difusão e a concentração da espécie eletroativa na solução.

Entre outras vantagens relativamente aos eletrodos clássicos (eletrodo gotejante de mercúrio e eletrodo de disco rotatório), os ume permitem a análise em meios eletricamente resistentes.^{66,124 - 128} A principal limitação dos métodos clássicos está na necessidade de controlar a diferença de potencial na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução, onde ocorre o processo eletroquímico em estudo. Em meios de resistência elétrica elevada ou pouco dissociantes, o sinal analítico será distorcido pela queda ôhmica, mesmo com a adição de eletrólito suporte, ainda que o equipamento de medida disponha de um circuito de compensação automática de iR . O eletrólito suporte é um sal cujos íons não são eletroativos na faixa de potenciais em estudo e que é adicionado propositadamente à solução para aumentar sua condutividade e, conseqüentemente, diminuir a resistência elétrica do meio.

Nas células eletroquímicas, a diminuição do tamanho do eletrodo de trabalho e a proximidade deste ao eletrodo de referência têm por finalidade reduzir a queda ôhmica, pois a resistência da solução nas imediações do eletrodo é inversamente proporcional às dimensões deste. Ou seja, para um eletrodo esférico ou de disco de raio r_0 , iR varia com o inverso de r_0 e tende a zero à medida que r_0 diminui, permitindo então conhecer o valor de E com elevada exatidão.¹⁰⁶ No entanto, embora conhecidas estas relações, a prática eletroanalítica em meios resistivos esteve limitada durante muito tempo pelas dificuldades de medida de correntes diminutas e de construção de eletrodos com dimensões micrométricas. Com o rápido desenvolvimento da tecnologia do silicone e microeletrônicos,

ultramicroeletrodos revestidos com metais nobres, como por exemplo Ir, Pt e Au, podem ser produzidos em escala industrial a baixos custos e com geometrias muito flexíveis.¹¹⁴

2.5.3 Voltametria no estado transiente

A voltametria cíclica é uma técnica em que uma variação de potencial linear triangular é aplicada ao eletrodo de trabalho enquanto a corrente resultante é registrada ao longo de varreduras de potencial direta e reversa. Assim, espécies que são reduzidas ou depositadas na varredura direta, por exemplo, são reoxidadas na varredura reversa. A técnica é útil na elucidação de mecanismos de reação, especialmente na identificação de espécies intermediárias e é amplamente utilizada como critério de diagnóstico qualitativo dos processos que ocorrem em uma interface. Utilizando como variáveis a velocidade de varredura e os potenciais inicial e final (potencial de reversão) é possível identificar processos de oxidação/redução e/ou de adsorção/dessorção, determinar se as reações ocorrem em uma ou várias etapas e também se são reversíveis ou irreversíveis.¹²⁹

Caracterizando-se um eletrodo planar por apenas uma dimensão, r , para simplificar o modelo matemático, o tempo necessário para que ele alcance o estado estacionário é proporcional à sua superfície.¹²¹ O limite de velocidade de varredura em potencial que assegura um estado estacionário depende do tamanho do eletrodo. Em água, para um rme de 7 μm de raio este limite é de 0,050 V s^{-1} . Acima de 200 V s^{-1} predominam a difusão linear e o regime transiente e para velocidades de varredura compreendidas entre estes limites, o regime de difusão é intermediário entre o estacionário e o transiente.¹³⁰

Para tempos suficientemente curtos de aplicação de um potencial, qualquer eletrodo planar, independentemente do tamanho, comporta-se como um eletrodo infinitamente grande, ou seja, o transporte de massa se dá em regime transiente. Com tempos mais longos, o transporte de massa em relação ao eletrodo muda para um regime estacionário.

A voltametria cíclica foi empregada no estudo de estruturas e de transições estruturais de uma microemulsão de o/w formada por dodecil sulfonato de sódio, n-heptano, butanol e água.⁷⁴

2.5.4 Características dos ultramicroeletrodos

O uso de um ultramicroeletrodo de disco de Pt como eletrodo de trabalho, apresenta diversas vantagens sobre os eletrodos convencionais e permite estudar reações eletródicas em meios altamente resistivos^{66,124 – 128} como óleos vegetais,^{131,132} benzeno,^{133,134} gases,¹³⁵ gelo¹³⁶ e fluidos supercríticos^{137 – 139} onde os eletrodos convencionais, devido a suas maiores dimensões, são afetados por uma expressiva queda ôhmica.¹⁴⁰ As características dos ume permitem inclusive a realização de medidas voltamétricas em solventes orgânicos, na presença de baixas concentrações de eletrólito suporte, ou mesmo na ausência deste.¹⁴¹ Também em soluções aquosas com baixa força iônica, é possível obter medidas com alta sensibilidade, livre da influência de correntes convectivas, especialmente quando são empregados eletrodos de dimensões inferiores a 1 μm .¹⁴²

Ultramicroeletrodos podem ser construídos em uma grande variedade de formas geométricas como disco, hemisfera, cilindro, anel e arranjos diversos, e são feitos comumente de Pt, Au ou carbono vítreo.¹²² Algumas características destes eletrodos diretamente relacionadas com suas aplicações analíticas são:

1- a corrente de eletrólise em um ume é muito pequena e é proporcional ao raio do eletrodo (estado estacionário) ou à sua superfície (estado transiente), dependendo das condições do experimento. Essencialmente, são as pequenas dimensões do eletrodo que limitam o valor da corrente de eletrólise i , em geral à ordem do nanoampere, praticamente eliminando a queda ôhmica;¹⁴¹

2- a dimensão característica da geometria de um ultramicroeletrodo, por exemplo o raio de um ume de disco, é menor do que a espessura da camada de difusão δ . Por esta razão o regime de transporte de massa por difusão a um ume é esférico e o estado estacionário se estabelece em tempos muito curtos, menos de um segundo, por exemplo, para um ume de disco de 10 μm de raio;¹²⁶

3- no estado estacionário, a velocidade de transporte de massa por difusão, dada por $m_0 = D/r$, é maior para um ume do que para um eletrodo de dimensões milimétricas e aumenta à medida que o raio do eletrodo diminui.¹⁴³ Em água, para um ultramicroeletrodo

esférico de 1 μm de raio, m_0 vale $10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$. Para um eletrodo rotatório a 600 rpm, m_0 corresponde à razão D/δ da ordem de $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$, ou seja, 100 vezes menor;¹⁰⁶

4- na ausência de uma espécie eletroativa, a célula eletroquímica pode ser comparada a um circuito **RC** em série, onde **R** é a resistência da solução e **C** a capacidade de dupla camada.¹⁰⁶

Aplicando-se à célula uma diferença de potencial ΔE durante um tempo t aparece uma corrente capacitiva, i_c , dada por :

$$i_c = (\Delta E/R) \exp (-t/RC) \quad (2.11)$$

Se a solução contiver uma espécie eletroativa haverá concomitantemente uma corrente faradaica i_F , e a corrente total será dada por $(i_c + i_F)$. Para baixas concentrações da espécie eletroativa e para tempos de análise curtos, a corrente capacitiva pode tornar-se maior do que a corrente faradaica, induzindo a erros de interpretação das curvas potencial-corrente (voltamogramas). No estado estacionário, a corrente faradaica é diretamente proporcional ao raio de um eletrodo de disco e a corrente capacitiva ao seu quadrado. Portanto, relativamente a um eletrodo clássico, a razão (i_F / i_c) é maior em um μm , o que favorece a análise de traços. Em regime transiente, a razão (i_F / i_c) é proporcional a $v^{-1/2}$, onde v é a velocidade de varredura. Mesmo neste caso, o μm apresenta como vantagem o tempo de carga reduzido,^{144,145} que permite o estudo de reações muito rápidas, da ordem do microsegundo;¹⁴⁶

5- Num μm , a velocidade de transporte de massa por convecção é negligenciável se comparada à por difusão, o que torna possível utilizar ultramicroeletrodos como sensores para realizar medidas em fluidos em movimento;^{147,148,142} Do ponto de vista da Química Analítica, em particular no uso de métodos voltamperométricos, as principais vantagens dos μm em relação aos eletrodos clássicos são a redução drástica da queda ôhmica, mesmo na ausência de eletrólito suporte, e o rápido estabelecimento do estado estacionário.^{106,113,121,134,141,149,150}

2.6 ELETROFORESE CAPILAR

2.6.1 Histórico

A ciência dos métodos de separação foi marcada na década de 80 pela implementação da eletroforese capilar CE, terceira grande técnica instrumental de separação que foi precedida pela cromatografia gasosa (GC) e pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).^{151,152} A eletroforese capilar teve como contribuições pioneiras os trabalhos de Mikkers e colaboradores¹⁵³ em 1979 e Jorgenson e Lukacs¹⁵⁴ em 1981. Desde então, ela tem se expandido continuamente, inicialmente no campo da bioquímica e, posteriormente, da química analítica. O universo de aplicações da eletroforese capilar tem mostrado um crescimento exponencial: no começo da década de 90, houve um aumento significativo no número de publicações em eletroforese capilar, sendo que até o ano 2000 cerca de 12.000 artigos já haviam sido publicados. O princípio da eletroforese é a separação, sob a ação de um campo elétrico, de espécies eletricamente carregadas presentes em uma mistura que é injetada em um eletrólito de corrida. À medida que o eletrólito flui através do capilar ocorre a separação das espécies em função de suas diferentes mobilidades.^{155,156} O eletroferograma, isto é, o registro gráfico do sinal do detector em função do tempo transcorrido desde a injeção até que os analitos passem pelo detector, permite identificar e quantificar os componentes da mistura.

O interesse crescente e os avanços alcançados por esta técnica são atribuídos não somente à simplicidade do equipamento, mas, em especial, à possibilidade de realizar diversos modos de separação em uma única coluna capilar,^{151,157,158} bem como, de analisar uma grande gama de solutos em cada modo de análise. Essa versatilidade torna-se um dos aspectos mais impressionantes da técnica, pois possibilita a análise de íons tão pequenos como o lítio ou fluoreto, até estruturas de dimensões macromoleculares, como proteínas e fragmentos de DNA.^{151,159-162} Estes aspectos promoveram nos últimos anos o desenvolvimento de instrumentos comerciais dotados de sistemas sofisticados de injeção de amostra, detecção em linha e aquisição de dados, tornando a técnica atraente para a utilização em análises de rotina.^{152,163,164}

Atualmente, a CE está bem estabelecida como técnica analítica e, devido a seus mecanismos de separação completamente distintos daqueles dos da cromatografia líquida de alta eficiência, figura em muitos casos como técnica complementar a esta última.¹⁶⁵

2.6.2 Capilares

Uma grande vantagem da eletroforese capilar em relação às outras técnicas de separação é a maior eficiência e resolução obtidas em um tempo menor de análise,^{151,166 – 168} estas características são asseguradas pelo uso de capilares de diâmetro reduzido, cuja principal vantagem sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc.) é de apresentar grandes valores para a relação entre a área superficial interna e o volume de amostra. O emprego de capilares com dimensões entre 25 e 100 μm foi um passo importante no desenvolvimento desta técnica, pois permitiu uma melhor dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule) através do eletrólito de corrida. Evitam-se assim o alargamento da zona da amostra e sua decomposição bem como a ebulição do eletrólito que poderiam ocorrer pelo aumento da temperatura. Outra importante característica do capilar é a alta resistência elétrica que, aliada à capacidade de dissipar o calor gerado, torna possível empregar voltagens mais altas, da ordem de 30 a 50 kV. Conseqüentemente alcançam-se campos elétricos da ordem de 100 a 500 V cm^{-1} , o que reduz o tempo de análise e aumenta a eficiência da separação, podendo superar a 10^5 pratos teóricos em tempos consideravelmente curtos. Os valores dos tempos de separação alcançados em eletroforese dependem das diferenças de potencial aplicadas e do comprimento dos capilares. Assim, potenciais elevados e capilares de menor comprimento garantem tempos de separação mais curtos.^{152,169 – 171}

Além destas, outras vantagens do uso do capilar são o baixo consumo de solventes e a redução do volume de amostras utilizado,¹⁶⁶ da ordem de 1 a 10 nL.¹⁶⁴ Esta característica torna possível reduzir o consumo de amostra a volumes da ordem de microlitros durante um dia de análises,¹⁶³ além de constituir uma vantagem significativa no caso de análises forenses ou biológicas cujas amostras são, em geral, de pequeno volume.¹⁷² Ainda, por ser de material transparente (predominantemente sílica fundida),¹⁵² o

capilar permite que a detecção óptica aconteça em fluxo, com a radiação eletromagnética sendo transmitida diretamente através da parede.^{151,173}

2.6.3 Fluxo eletroosmótico (EOF)

Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários tipos de grupos silanol, os quais em média, apresentam um caráter ácido fraco. Em contato com o meio aquoso, uma fração desses grupos são ionizados tornando a superfície do capilar negativamente carregada. Na presença de eletrólito, surge na interface capilar-solução uma distribuição espacial não homogênea de cargas, denominada dupla camada elétrica. Desta fazem parte a camada de Stern, delimitada pela distância de máxima aproximação dos íons hidratados à parede do capilar, e a camada difusa.^{174 – 176}

Aplicando uma diferença de potencial paralelamente à interface, os íons solvatados presentes na camada difusa da dupla camada elétrica deslocam-se, arrastando o solvente, enquanto que a camada de eletrólito em contato com a superfície do capilar permanece imóvel.^{157,175} Conseqüentemente, a alguns nanômetros da superfície sólida, há um plano paralelo a esta superfície (plano de deslizamento), além do qual ocorre o movimento do eletrólito. Neste plano estabelece-se um potencial, denominado potencial zeta (ζ),¹²⁶ o qual é, essencialmente, determinado pela carga da superfície na parede do capilar que, por sua vez, depende do pH do eletrólito.

O fluxo de solução induzido pelo campo elétrico aplicado, como ilustra a Figura 2.6.¹⁷⁷ é denominado fluxo eletroosmótico e depende das características da superfície do capilar bem como da composição do meio condutor. Simultaneamente as espécies carregadas dissolvidas na solução migram sob a ação da força do campo elétrico com uma velocidade constante em função de sua carga, tamanho e forma. Este processo é denominado migração eletroforética.

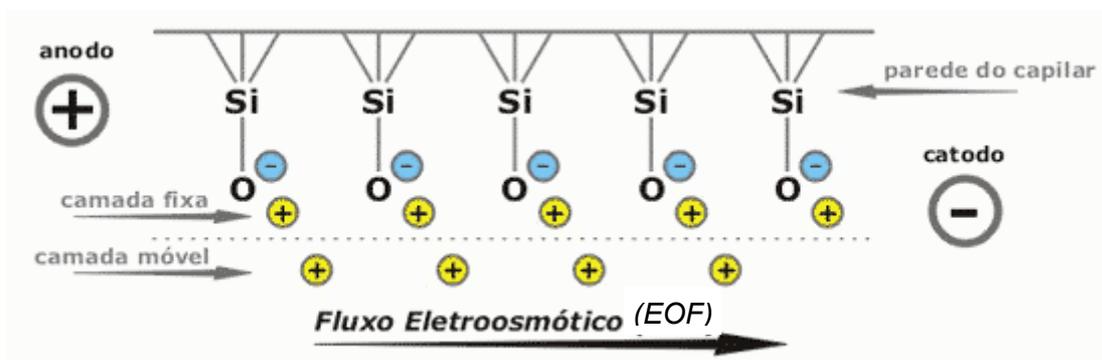


Figura 2.6 - Migração dos cátions em direção ao cátodo.

Como dito anteriormente, a intensidade do EOF é altamente dependente do pH do eletrólito, pois o potencial zeta é governado pela ionização dos grupos silanóis (ácidos) da parede do capilar. Abaixo de pH 4, a ionização desses grupos é pequena e o EOF não é significativo, enquanto que acima de pH 9 os grupos silanóis ficam completamente ionizados e, portanto, o EOF é elevado. A Figura 2.7 mostra o efeito do pH na magnitude do EOF.¹⁷⁷

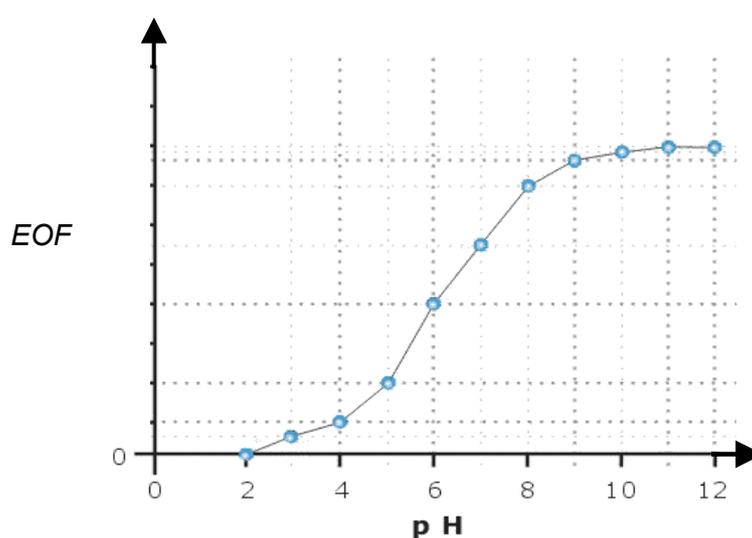


Figura 2.7 - Dependência do fluxo eletrosmótico em função do pH.

A magnitude do fluxo eletrosmótico pode ser expressa em termos de velocidade ou mobilidade segundo as equações:

$$\mu_{eo} = \varepsilon\zeta/\eta \quad (2.11)$$

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (2.12)$$

$$E = \frac{V}{L_{tot}} \quad (2.13)$$

onde ε é a constante dielétrica, η é a viscosidade em Poise, E é o campo elétrico em Volt cm^{-1} , V é o potencial aplicado em Volts e L_{tot} o comprimento do capilar em centímetros.^{171,173}

O potencial zeta é também dependente da força iônica da solução tampão. Um aumento da força iônica resulta em uma maior compactação da dupla camada elétrica e, conseqüentemente, em uma diminuição do EOF.^{170,172,177}

Dependendo de uma série de fatores, tais como a carga induzida nas paredes do sólido, a natureza do eletrólito transportador, a natureza da superfície interna do capilar, a mobilidade do fluxo eletrosmótico pode ser positiva ou negativa. Portanto, ao calcular a mobilidade líquida de uma espécie, os sinais relativos das mobilidades eletroforética (μ_e) e eletrosmótica (μ_{eo}) devem ser considerados.¹⁷³

O tempo requerido para um composto migrar da extremidade do capilar onde ocorre a injeção da amostra até o ponto de detecção é chamado tempo de migração, dado pelo quociente entre a distância de migração e a velocidade. O tempo de migração e outros parâmetros experimentais podem ser usados para calcular a mobilidade aparente (μ_a) do soluto usando a expressão:^{171,173}

$$\mu_a = l/tE = lL/tV \quad (2.14)$$

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (2.15)$$

$$l = L - l_0 \quad (2.16)$$

em que:

V = potencial aplicado;
 L = comprimento total do capilar;
 t = tempo de migração;
 E = campo elétrico;
 l = comprimento efetivo.
 l_0 = comprimento do capilar até o detector

A mobilidade aparente (μ_a) é a mobilidade medida em presença de EOF enquanto que a mobilidade efetiva (μ_e) pode ser obtida a partir da mobilidade aparente pela determinação do EOF, usando um marcador neutro que se move com velocidade igual à do EOF. Exemplos de marcadores neutros incluem dimetilsulfóxido, acetona, tolueno e dimetilformamida, entre outros.¹⁷⁷

A eletroosmose é um dos fatores que contribui sobremaneira para a elevada eficiência da CE,¹⁷⁸ pois o fluxo eletrosmótico é caracterizado por um perfil plano constante da velocidade, que resulta em picos estreitos no eletroferograma.^{151,173 – 175} Esta característica é vantajosa se comparada à cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, onde o fluxo apresenta uma variação parabólica, característico de fluxo gerado por pressão (ver Figura 2.8), que provoca alargamento dos picos.^{152,163,173,176}

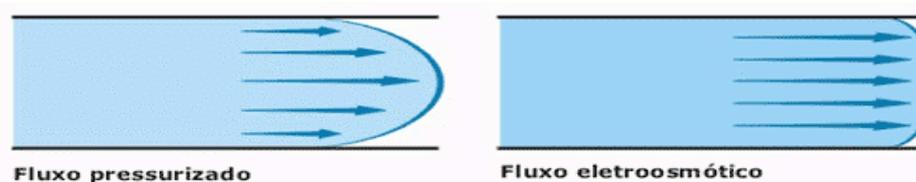


Figura 2.8 - Perfil do fluxo eletrosmótico presente em CE, comparado com o do fluxo pressurizado típico de HPLC.¹⁷⁷

A existência do fluxo eletrosmótico é responsável pelo deslocamento dos solutos em direção ao detector, permitindo a análise simultânea de solutos aniônicos, catiônicos e neutros.¹⁷⁸

Considerando que o EOF afeta drasticamente o resultado das separações, existe a necessidade de realizar-se um controle apropriado do mesmo.¹⁵⁷ Isto pode ser feito através de modificações nas propriedades químicas e físicas da solução tampão denominada eletrólito de corrida, como por exemplo o pH, concentração, força iônica,^{174,179} tipo e concentração de um eletrólito inerte¹⁸⁰ ou emprego de um aditivo orgânico,¹⁸¹ bem como, por mudanças na viscosidade do solvente, constante dielétrica e temperatura da separação.¹⁷⁴ Outra estratégia possível é a aplicação de um campo elétrico externo perpendicular à parede do capilar.¹⁷⁸ Ou ainda, o controle do EOF pode ser exercido alterando-se a composição química do capilar.

2.6.4 Equipamento para eletroforese capilar

Nesta técnica, o capilar é preenchido com o eletrólito de corrida e cada uma de suas extremidades é mergulhada, juntamente com eletrodos de platina, em recipientes que contém este eletrólito. Uma fonte de alta tensão produz uma diferença de potencial entre os eletrodos gerando um campo elétrico e, conseqüentemente, uma corrente elétrica no interior do capilar. O capilar passa diante de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no UV-Visível (UV-vis.). A Figura 2.9 mostra esquematicamente o funcionamento de um equipamento de CE.¹⁷⁷

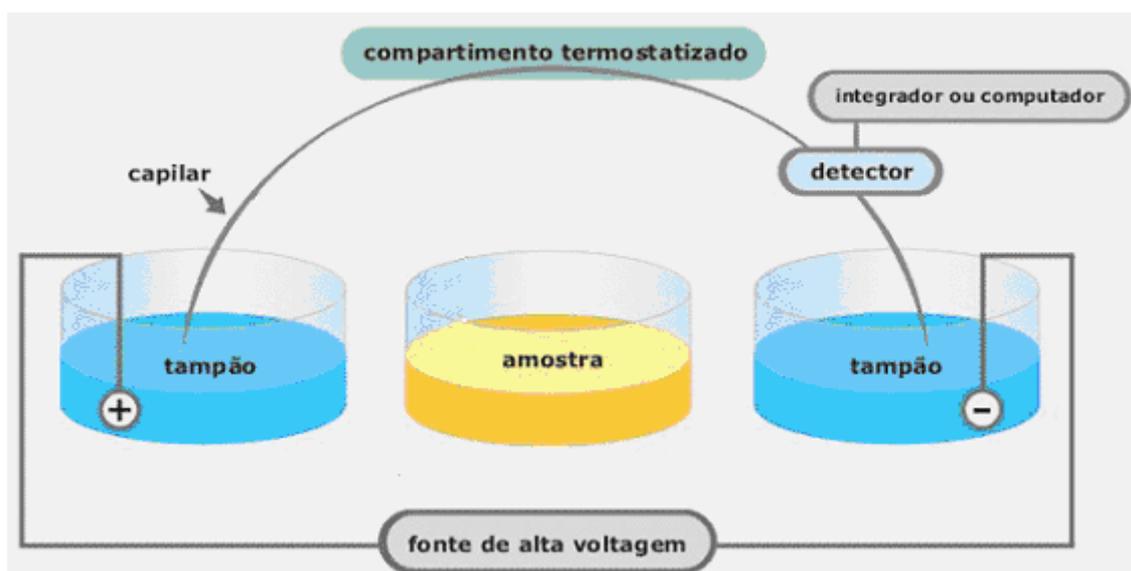


Figura 2.9 - Esquema de um equipamento de eletroforese capilar

O processo envolve o deslocamento de solutos ou de substâncias de dimensões coloidais na solução tampão dentro do capilar, na qual as partículas ou íons migram na direção do cátodo ou do ânodo, em função de sua carga específica. A separação ocorre devido às diferenças entre as mobilidades de compostos iônicos ou ionizáveis, e está relacionada com a razão carga/volume e com fatores estruturais.¹⁷³

Na CE, diferentemente das técnicas cromatográficas (Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), a amostra não é injetada e sim introduzida no capilar pelo lado mais distante do detector. Mesmo que a expressão "injeção" não seja a mais correta, este termo será empregado neste texto por ser o mais frequentemente utilizado.¹⁷⁷

O modo de injeção mais empregado em CE é o denominado hidrodinâmico, onde o capilar é mergulhado em um recipiente contendo a amostra, o qual é em seguida, alternativamente, pressurizado, submetido ao vácuo ou erguido (efeito sifão) provocando a entrada de certo volume de amostra no capilar.¹⁷⁷

Outra alternativa é a inserção do capilar e do eletrodo no frasco da amostra seguida da aplicação de uma diferença de potencial. Neste caso, os solutos neutros são arrastados pelo EOF ao passo que os solutos com carga irão, simultaneamente, migrar para dentro do capilar pelas migrações eletroforética e eletrosmótica. Este tipo de injeção é denominado de injeção eletrocinética. A Figura 2.10 mostra os esquemas para introdução de amostras.

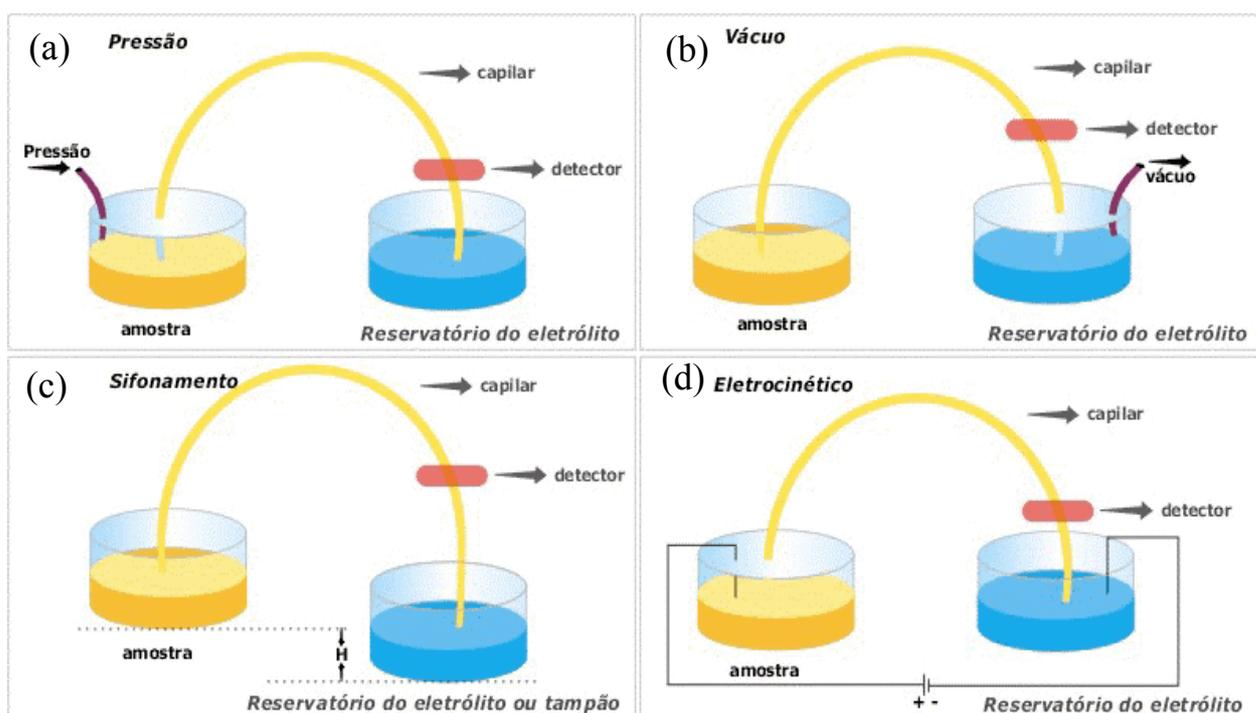


Figura 2.10 - Esquemas para a introdução de amostras em eletroforese capilar. Injeção hidrodinâmica: (a), (b) e (c); injeção eletrocinética (d).

2.6.5 Sistemas de detecção

Uma grande variedade de sistemas de detecção tem sido proposta nos métodos de análise por eletroforese capilar. A escolha de um método de detecção depende de vários requisitos, entre eles a seletividade e a sensibilidade bem como sua compatibilidade com as pequenas dimensões do capilar. Tradicionalmente, têm sido empregados detectores por espectroscopia molecular no UV-visível devido à sua natureza quase universal, ou seja, pode ser aplicado na detecção de várias classes de substâncias, em função da maioria dos compostos estudados apresentarem absorção de radiação eletromagnética na região entre 200 e 900 nm. A maioria dos instrumentos dispõe de detectores com um arranjo de diodos, o qual fornece um espectro para cada substância detectada. Mais recentemente, foi introduzido o uso da espectrometria de massas, que fornece informações estruturais dos analitos, com limites de detecção da ordem de 10^{-16} a 10^{-17} molar.^{152,158,173,177}

2.6.6 Otimização das condições de separação

Em razão da importância do pH, na etapa de otimização da separação deve ser dada especial atenção à escolha da solução tampão. Esta deve fixar o pH do meio solvente, pois pequenas variações de pH podem modificar o fluxo eletrosmótico. Além disto, é desejável que o tampão apresente baixa ou nenhuma absorção no comprimento de onda utilizado para a análise, e também que os íons dos eletrólitos empregados na preparação do tampão apresentem mobilidades próximas àquelas dos íons que estão sendo separados. Assim procedendo, reduzem-se as distorções nas formas dos picos causadas por eletrodispersão.^{151,173}

O pH do meio é definido a partir do pK_a do eletrólito de corrida, cuja capacidade tamponante normalmente é mantida para valores de pH entre 1 unidade acima e abaixo do valor de pK_a .¹⁷³

Tampões biológicos como tris(hidroximetil) aminometano (Tris)/borato, histidina, entre outros, são muito úteis em CE por apresentarem íons grandes e de baixa mobilidade o que permite empregá-los em altas concentrações, sem gerar calor excessivo. Por estas características, sua estabilidade e sua capacidade tamponante, o tampão Tris é bastante empregado em cromatografia eletrocínica de microemulsões (MEEKC), possibilitando separações rápidas com geração de correntes pequenas e um grande número de injeções repetidas, utilizando um único conjunto de *vials*.^{182,183}

2.6.7 Agentes modificadores da superfície do capilar

Vários procedimentos têm sido propostos para controlar a densidade de carga na parede do capilar, com o objetivo de controlar o EOF e também de minimizar as interações soluto-capilar. Neste sentido, revestir as paredes do capilar pode ser uma alternativa bastante útil. Os revestimentos empregados podem incluir desde a simples adição de desativadores dinâmicos como polímeros hidrofílicos ou tensoativos, ou ainda, o emprego de modificadores permanentes que se ligam covalentemente à parede do capilar ou aderem a ela fisicamente.^{163,173} Ambos podem ser usados para eliminar ou reverter a

carga da parede do capilar, alterar a hidrofobicidade e limitar adsorções indesejáveis que levam a alargamento dos picos.¹⁵²

Em geral, a desativação dinâmica costuma ser mais simples de ser executada, sendo que a escolha do agente e sua concentração irão influenciar sobremaneira na magnitude do fluxo ou, mesmo, determinarão a sua inversão.¹⁸⁴

2.6.8 Modos de separação

Dentre as modalidades de eletroforese capilar encontram-se: a eletroforese capilar de zona (CZE) ou, simplesmente, eletroforese capilar; a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC); a cromatografia eletrocínética de microemulsões (MEEKC); a eletroforese capilar em gel (CGE); de focalização isoelétrica (CIEF); a isotacoforese (CITP) e a eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) . A disponibilidade dessas diferentes modalidades contribuiu, de forma significativa, para consolidar a versatilidade atribuída à eletroforese capilar.¹⁶⁹

2.6.8.1 Cromatografia capilar eletrocínética de microemulsões (MEEKC)

O primeiro estudo do uso de uma microemulsão como meio de separação em CE foi realizado por Watarai em 1991,⁴⁰ sendo portanto uma técnica relativamente nova.^{59,185} Ela emprega uma fase pseudo-estacionária carregada para influenciar o comportamento de separação de solutos neutros ou carregados.¹⁸⁶ Os solutos sofrem partição entre as duas fases que formam as microemulsões (gotículas e meio contínuo), as quais migram com velocidades diferentes.¹⁸⁷ Os solutos ionizados podem sofrer partição entre as fases e também migrar devido a sua própria carga.¹⁵²

Recentemente, a cromatografia eletrocínética capilar de microemulsões, baseada em um sistema transparente capaz de, durante o processo de separação, sustentar uma corrente estável no interior do capilar, é reconhecida como uma importante alternativa à cromatografia eletrocínética micelar.^{152,188 – 190}

Existem vários relatos de separações por MEEKC de solutos iônico e neutros usando diversas microemulsões de o/w altamente eficientes, cobrindo uma ampla faixa de hidrofobicidades.^{37,182,183,186,191-195} Compostos muito hidrofóbicos são mais efetivamente dissolvidos em microemulsões do que em soluções micelares,^{186,199 - 201} reduzindo-se o risco de precipitação de componentes da matriz no interior do capilar.¹⁹⁴ Os solutos penetram com maior facilidade dentro da gotícula do que no interior das micelas, em função desta última ser muito mais rígida.^{59,166,187}

O sistema de microemulsão é muito mais complexo do que o micelar, porque existe um número maior de variáveis a serem controladas, como o tipo e concentração do óleo e do co-surfactante. Entretanto, este fato pode ser favorável nas separações, pois possibilita uma extensa gama de combinações de variáveis durante o processo de otimização.^{166,191} Outra característica importante é a habilidade das microemulsões de dissolver simultaneamente quantidades significativas de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos.^{202,203}

O surfactante SDS é o mais freqüentemente usado.^{59,152,204} Relatos recentes indicam que este surfactante produziu melhores resultados em separações por MEEKC empregando uma microemulsão de w/o em relação ao emprego de caprilato de sódio e brometo de cetil trimetilamônio (CTAB).²⁰⁵ Quando caprilato de sódio foi utilizado, a resolução dos picos foi maior que a obtida com SDS; a seletividade das separações foram semelhantes, entretanto, o tempo de análise foi excessivamente longo, além de haver um incremento no ruído da linha de base. Quando utilizou-se CTAB, não foram obtidas boas separações.

2.6.8.2 Eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE)

Em 1984 foi publicado o primeiro trabalho envolvendo o uso de soluções eletrolíticas não aquosas em separações por CE, porém, somente após 1995, aumentou significativamente o número destas publicações.^{168,206-209} Tipicamente, os eletrólitos são preparados em 100% de solvente orgânico, sendo metanol e acetonitrila os mais amplamente utilizados, por apresentarem altas constantes dielétricas e baixas viscosidades.²¹⁰ Existem relatos da existência de EOF mesmo na ausência de eletrólito

suporte, em especial para os solventes de alta constante dielétrica.^{168,211} Considerando que a mobilidade eletroforética está diretamente relacionada com o raio dos íons solvatados e que a solvatação dos íons depende da natureza do solvente, a substituição das moléculas de água por solventes orgânicos tem um impacto significativo nas interações entre os íons e nos valores de parâmetros físico-químicos como a mobilidade e a constante de equilíbrio, entre outros. Portanto, a seletividade em NACE pode ser modificada variando-se a natureza do solvente ou misturando solventes, ou ainda, pelo uso de aditivos como ciclodextrinas e surfactantes. Esta técnica é muito útil na separação de compostos hidrofóbicos e também daqueles que apresentam mobilidades eletroforéticas similares em água.^{152,210,212 – 214}

Por outro lado, as baixas correntes observadas em solventes não aquosos possibilitam o uso de campos elétricos elevados, altas concentrações de eletrólito e também capilares com diâmetros maiores, que permitem aumentar tanto a quantidade de amostra quanto a sensibilidade da detecção.^{168,210,215}

Adicionalmente, para o caso de CE-MS, o uso de solvente contribui no processo de introdução da amostra no espectrômetro de massas, considerando as características de volatilidade, tensão superficial, razão de fluxo e ionização do soluto, que são favoráveis para os solventes orgânicos, esta vantagem deve contribuir para estender o campo de aplicação da CE empregando meios não aquosos.^{210,215,216}

2.6.9 Efeito *stacking*

Um procedimento de pré-concentração denominado empilhamento (*stacking*) permite a compressão dos solutos na zona de injeção e é empregado com frequência na análise de ânions por eletroforese capilar. A introdução de uma amostra com condutividade menor do que aquela do eletrólito de corrida modifica a resistência elétrica do sistema no capilar e a expressão da lei de Ohm passa de $E=IR$ para $E= IR_1 + IR_2$, onde R_1 e R_2 representam as resistências da zona do eletrólito de corrida e da zona da amostra. Portanto, a força do campo elétrico se distribui entre as duas zonas. Como a velocidade eletroforética é proporcional à força do campo, velocidades de migração diferentes podem ser alcançadas em cada uma das zonas.²¹⁷ Isto permite o uso de injeções com maior volume sem que

ocorra um excessivo alargamento da zona da amostra no capilar porque ocorre uma compressão de zona. Porém, se a condutividade da amostra introduzida é maior do que a do eletrólito de corrida, ocorre um alargamento de zona ou anti-empilhamento.¹⁷³

2.6.10 Vantagens e desvantagens da CE comparada à cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A eletroforese capilar apresenta algumas vantagens sobre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como o menor tempo de análise, menor consumo de solventes e maior eficiência de separação.^{157,167,185} A técnica é aplicável à análise de íons inorgânicos, substâncias quirais, DNA, entre outros.¹⁵² Como desvantagens em relação à cromatografia líquida, a CE apresenta baixa repetibilidade no processo de injeção (menor precisão) e menor sensibilidade. Para contornar a falta de repetibilidade do volume de injeção, é recomendado empregar sempre padrões internos nas análises quantitativas.^{173,152,218}

2.7 ANÁLISE DE BIOFENÓIS

Biofenóis constituem um grupo distinto de fitoquímicos com uma grande diversidade estrutural. Comportam-se naturalmente como fitoprotetores e representam uma parte significativa (em torno de 2 %) da matéria insaponificável encontrada nos óleos vegetais.⁹ Estes compostos têm sido relacionados com a prevenção de doenças coronárias e outras enfermidades desta natureza,^{219 – 221} sendo também importantes na manutenção da estabilidade dos óleos durante o processamento, estocagem e cozimento.²²² A concentração de biofenóis depende da origem biológica, ambiente de cultivo e processo de extração do óleo, variando muito de um óleo comestível para outro. Óleos extra virgens, que são extraídos por prensagem e centrifugação, são particularmente ricos em biofenóis, enquanto que óleos refinados, que são obtidos por extração com solvente de uma emulsão aquosa, têm muito menor concentração dos mesmos.^{219,223} O sabor acentuado do azeite de oliva extra virgem (oriundo da fruta *Olea europea*), que é bastante apreciado na cultura Mediterrânea, é principalmente devido a presença de biofenóis.^{220 – 224}

Biofenóis podem ser hidroxiaromáticos substituídos simples, mostrando um ou mais grupos fenóis, combinados ou não com grupos carboxílicos, ou mais complexos, ligados a unidades glicosídicas e monoterpénóides.^{224,225} Óleos vegetais também contém o importante grupo de biomoléculas conhecidas como vitaminas E, as quais apresentam como característica uma estrutura de 2 anéis, conhecida como cromanol (um fenol substituído com um éter cíclico), que está anexada à cadeia lateral de um hidrocarboneto ramificado com 16 átomos de carbono. Esta cadeia lateral é saturada para α -, β -, δ - e γ -tocoferóis e apresenta 3 duplas ligações no caso dos correspondentes tocotrienóis. Os membros de cada série são distinguidos pelo número e posição dos grupos metil no anel fenólico, isto é, 3 para α , 2 para β e γ , e 1 para δ , assim, com exceção de β e γ , dentro uma das 4 séries, os compostos que constituem a vitamina E não são isômeros de posição, os termos “tocois”²²⁶ e “vitamina-E” têm sido usados para referir-se a eles.²²⁷ De acordo com as possíveis posições cis/ cis, cis/ trans, trans/ cis e trans/ trans das duplas ligações na cadeia do hidrocarboneto, 4 isômeros geométricos de cada tocoferol são distinguidos. Tocoferóis são encontrados em proporções variáveis em óleos vegetais,^{228,229} enquanto que tocotrienóis são encontrados em relativa abundância em óleo de palma (oriundo da fruta kernel da *Elaeis guinensis*).¹³

Considerando que os biofenóis são removidos em grande quantidade durante o refino do óleo,^{219,223} diversos antioxidantes fenólicos sintéticos são frequentemente adicionados aos óleos refinados e outras gorduras usadas na manufatura de produtos alimentícios industriais com a finalidade de impedir sua rancificação. A estrutura molecular da vitamina-E (I), dos diversos biofenóis (II a VIII) e dos 2 antioxidantes sintéticos (IX e X), que são utilizados neste trabalho, são mostradas na Figura 2.11.

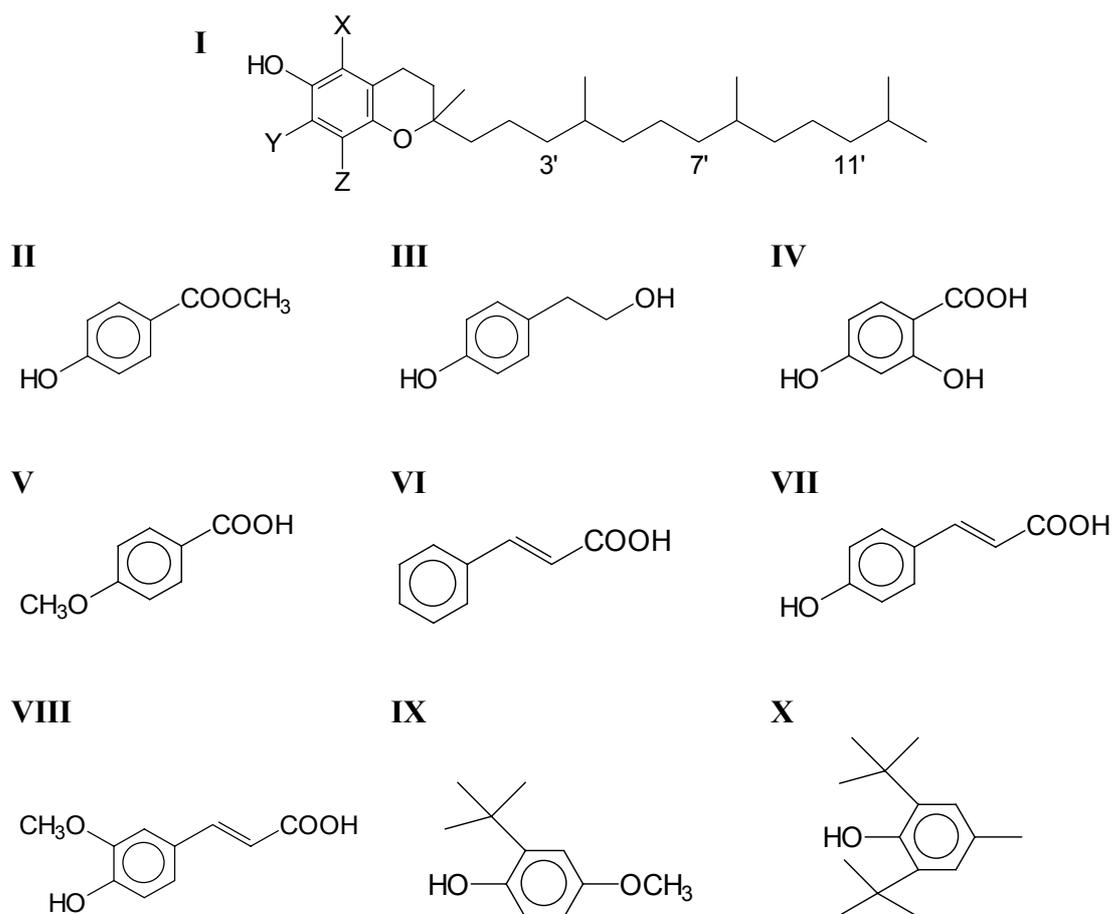


Figura 2.11 – Estruturas moleculares: (I) Tocoferóis, X = Y = Z = CH₃ para α -tocoferol, X = Z = CH₃ e Y = H para β -tocoferol, Y = Z = CH₃ e X = H para γ -tocoferol, Z = CH₃ e X = Y = H para δ -T (os correspondentes tocotrienóis têm também duplas ligações, entre 3'-4', 7'-8' e 11'-12'); (II) metil-4-hidroxibenzoato (metil parabeno); (III) 2-(*p*-hidroxifenil)etanol (tirosol); (IV) ácido 2,4-dihidroxibenzóico; (V) ácido *p*-metoxibenzóico (*p*-anísico); (VI) ácido *trans*-3-fenil-2-propenóico (*trans*-cinâmico); (VII) ácido *trans*-4-hidroxicinâmico (*p*-comárico); (VIII) ácido *trans*-4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ferúlico); (IX) 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA); (X) 2,6-di-*tert*-butil-4-hidroxitolueno (BHT).

A voltametria é uma técnica que tem sido usada para quantificar diretamente as vitaminas-E em amostras de óleo através da simples diluição da amostra com solventes miscíveis em óleo, e através da adição de ácido sulfúrico e um sal de tetralquilamônio para incrementar a condutividade.²³⁰ Ultramicroeletrodos de platina, que normalmente são empregados em meios de baixa condutividade, têm sido utilizados para determinar o conteúdo total de tocoferóis em uma mistura 3:1 v/v de óleo com uma solução salina de

tetrabutilamônio em N-metil-pirrolidona.²³¹ Técnicas voltamétricas com ultramicroeletrodos também têm sido usadas para determinar tanto tocoferóis como antioxidantes fenólicos sintéticos em óleos vegetais, após diluição com uma solução salina de tetrabutilamônio em benzeno-etanol.¹¹³ Entretanto, as interferências nos métodos voltamétricos são severas devido às altas concentrações de outros biofenóis.

Existem estudos comparativos entre cromatografia de camada delgada, GC e NP-HPLC aplicadas a separação de tocoferóis,²³² bem como revisões sobre métodos cromatográficos para a separação de vitaminas-E em matrizes biológicas.²³³ Na determinação de tocoferóis por GC, os analitos são primeiramente extraídos do óleo saponificado, e derivatizados para aumentar a volatilidade.²³⁴⁻²³⁶ Mesmo com a adição de um antioxidante como ácido ascórbico, quando a saponificação é feita por aquecimento prolongado em meio fortemente alcalino, pode ocorrer perda dos analitos. Vários estudos descrevem a determinação de antioxidantes fenólicos sintéticos através de GC em produtos alimentícios diversos.²³⁷⁻²³⁹

Para análise por HPLC, a derivatização dos biofenóis não é necessária; alguns estudos comparativos demonstraram que HPLC é mais rápida, sensível, seletiva e robusta que GC.^{226,227,240-242} A preparação da amostra em RP-HPLC pode ser conduzida por saponificação seguida por extração, para remover o material saponificado,^{223,242,243} ou sem saponificação, executando-se assim diretamente a extração da fração de interesse com um solvente adequado,²²⁴ ou ainda por uso de uma membrana extratora colocada *on line* com o cromatógrafo.²⁴² Em um estudo comparativo, verificaram-se baixos rendimentos de uma ampla variedade de biofenóis usando-se diversos meios de extração em fase sólida, enquanto que rendimentos superiores a 90 % foram alcançados com extração líquido-líquido.²⁴⁷ Relatos descrevem o emprego comparativo de NP- e RP-HPLC, aplicadas a separação de tocoferóis.²⁴³ Os resultados encontrados indicaram que NP-HPLC é mais recomendada para resolver o par de isômeros β e γ das vitaminas-E,^{227,240,248-250} entretanto, empregando-se RP-HPLC, com colunas não convencionais, conseguiu-se a resolução de até 15 isômeros geométricos de tocotrienóis.²⁵⁴ Antioxidantes fenólicos sintéticos, tocoferóis e diversos grupos de triacilgliceróis (TAGs) foram separados por RP-HPLC em uma única corrida usando detecção amperométrica; para este propósito, as amostras de óleo foram diluídas com tetrahydrofurano e metanol, e injetadas na fase móvel contendo 90 % de metanol.²⁵⁵ Uma outra maneira utilizada para determinar antioxidantes sintéticos foi

a diluição do óleo com uma microemulsão w/o miscível com este, que foi também usada como fase móvel em HPLC²⁵⁶ e, também por diluição com 1-propanol e eluição com uma fase micelar compatível.²⁵⁶

Freqüentemente usa-se água e misturas hidro-orgânicas para implementar separações em eletroforese capilar. Separações eficientes e rápidas em CE de misturas complexas de biofenóis têm sido obtidas por injeção de extratos metanólicos de azeite de oliva, e usando tampão borato aquoso como BGE.^{257,247} Misturas de vitaminas-E também foram resolvidas por eletrocromatografia capilar^{258,259} e vitaminas lipossolúveis, incluindo acetato de tocoferila, tem sido separadas por cromatografia eletrocinética de microemulsões (MEEKC).²⁶⁰ As separações em MEEKC foram baseadas na partição dos solutos entre a fase dispersa, constituídas por gotículas de óleo, e a fase aquosa, onde a hidrofobicidade foi ajustada, para ocorrer a dissolução dos solutos, adicionando-se 20 % de 2-propanol.²⁶⁰ acetato de -tocoferila e outros ingredientes ativos foram separados em extrato metanólico de um unguento por cromatografia eletrocinética de interação (HIEKC).²⁶¹ Em HIEKC as separações são executadas em uma mistura de acetonitrila e água, na presença de brometo de tetralquilamônia ou cetiltrimetilamônia.²⁶¹

Existe também um considerável interesse em eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE), tendo-se executado estudos fundamentais de eletroforese capilar em metanol,²⁶² acetonitrila,²⁶³ formamida²⁶⁴ outros solventes isolados ou misturados.^{214,265,266} Aspectos teóricos e metodológicos, e muitas aplicações de NACE, têm sido revisados.^{267 –}
²⁷⁰ Os valores de pKa dos ácidos carboxílicos e fenóis incrementam-se em até 5 unidades logarítmicas em metanol.^{265,270} Diversos polifenóis, incluindo flavonóides e resveratrol, foram separados em amostras de vinho, usando ácido malônico e hidróxido de tetrabutilamônio em metanol; a segunda constante de ionização do ácido diprótico foi usada para tamponar o alto pH requerido.²⁷¹

2.8 REFERÊNCIAS

- ¹ <http://www.webrural.com.br/webrural/cotacoes/soja/> - capturado dia 26/01/2004.
- ² Rusling, J. F.; Zhou, D.; *J. Electroanal. Chem.* 1997, 439, 89.
- ³ Ward, K.; Scarth, R.; Daun, J.K.; Thorsteinson, C.T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 811.
- ⁴ Wanasundara, U.N.; Shahidi, F.; *J. Am Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 817.
- ⁵ Melo, E.A.; Guerra, N.B.; *Bol. SBCTA* 2002, 36, 1.
- ⁶ Chu, Y. H.; Luo, S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 89.
- ⁷ Subrahmanyam, M.S.R.; Vedanayagem, H.S.; Venkatacharyulu, P.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994, 71, 901.
- ⁸ Palmero, M.R.; Owens, S.P.; Bargallo, A.I.C.; Sabater, M.C.L.; Urgell, M.R.; Boronat, M.C.T.; *J. Chromatogr. A* 1994, 672, 267.
- ⁹ Aparicio, R.; Aparicio-Ruíz, R.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 93.
- ¹⁰ Temelli, F.; King, J.W.; List, G.R.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 699.
- ¹¹ Sieh, C.J.; Akoh, C.C.; Koehler, P.E.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 455.
- ¹² Ishii, K.; Mizukami, F.; Niwa, S.; Toba, M.; Ushijima, H.; Sato, T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 465.
- ¹³ Choo, Y.M.; Ooi, K.E.; Ooi, I.H.; Tan, D.H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 333.
- ¹⁴ Ma, F.; Hanna, M.A.; *Bioresource Tech.* 1999, 70, 1.
- ¹⁵ Dantas, T.N.C.; Silva, A.C.; Neto, A.A.D.; *Fuel* 2001, 80, 75.
- ¹⁶ Demirbas, A.; *Energ. Convers. Manag.* 2003, 44, 2093.
- ¹⁷ Turunen, M.; Peräniemi, S.; Ahlgrén, M.; Westerholm, H.; *Anal. Chim. Acta* 1995, 311, 85.
- ¹⁸ Wang, T.; Jia, X.; Wu, J.; *J. Pharm. Biom. Anal.*, 2003, 33, 639.
- ¹⁹ Zunin, P.; Boggia, R.; Lanteri, S.; Leardi, R.; Andreis, R.; Evangelisti, F.; *J. Chromatogr. A* 2004, 1023, 271.
- ²⁰ Gimeno, E.; Castellote, A.I.; Raventós, R.M.L.; Torre, M.C.; Sabater, M.C.L.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 251.
- ²¹ Pérez, A.S.; Zamarreño, M.M.D.; Rangel, M.B.; Méndez, J.H.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 229.
- ²² McBride, H.D.; Evans, D.H.; *Anal. Chem.* 1973, 45, 446.
- ²³ Adhvaryu, A.; Erhan, S.Z.; Liu, Z.S.; Perez, J.M.; *Thermochim. Acta*, 2000, 364, 87.
- ²⁴ Baars, A.; Aoki, K.; Watanabe, J.; *J. Electroanal. Chem* 1999, 464, 128.

- ²⁵ Whightman, R.M.; Wipf, D.O. in: Barda, A.J. (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, Vol. 15, Marcel Dekker: New York, 1989, pp. 267.
- ²⁶ Ceballos, C.; Frenández, H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000, 77, 731.
- ²⁷ Gao, J.; Njue, C.K.; Mbindyo, J.K.N.; Rusling, J.F.; *J. Electroanal. Chem.* 1999, 464, 31.
- ²⁸ Sjöblom, J.; Lindberg, R.; Friberg, S.E.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 1996, 95, 125.
- ²⁹ Schwuger, M.J.; Schomäcker, R.; *Chem. Rev.* 1995, 95, 849.
- ³⁰ Júnior, A.S.C.; Fialho, S.L.; Carneiro, L.B.; Oréface, F.; *Arq. Bras. Oftalmol.* 2003, 66, 385.
- ³¹ Lawrence, M.J.; Rees, G.D.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 45, 89.
- ³² Romero, J.S.E.; Afonso, E.F.S.; Alvarez-Coque, M.G.G.; Ramos, G.R.; *Anal. Chim. Acta* 1990, 235, 317.
- ³³ Hellweg, T.; Eimer, W.; *Colloid. Surf. A* 1998, 136, 97.
- ³⁴ Solans, C.; Pons, R.; Kunieda, H.; Overview of Basic Aspects of Microemulsions, in *Industrial Applications of Microemulsions* (Solans, C.; Kunieda, H.. Eds.), Dekker, New York 1997, pp. 5-10.
- ³⁵ Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B.. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd ed., Wiley, Chichester (UK) 2003, pp. 139 ss.
- ³⁶ Fatemi, M. H.; *J. Chromatogr. A* 2003, 1002, 221.
- ³⁷ Sirén, H.; Karttunen, A.; *J. Chromatogr. B* 2003, 783, 113.
- ³⁸ Ishihama, Y.; Oda Y.; Uchikawa, K.; Asakama, N.; *Anal. Chem.* 1995, 67, 1588.
- ³⁹ Berthod, A.; Laserna, J. J.; Carretero, I.; *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15, 3115.
- ⁴⁰ Watarai, H.; *Chem. Letters* 1991, 391.
- ⁴¹ Zhou, G. H.; Luo, G. A.; Zhang, X. D.; *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 277.
- ⁴² Ortí, J.F.N.; Camañas, R.M.V.; Ramos, G.R.; *Anal. Chim. Acta* 1999, 387, 127.
- ⁴³ Radomska, A.; Dobrucki, R.; *Int. J. Pharm.* 2000, 196, 131.
- ⁴⁴ Dantas, T.N.C.; Da Silva, A.C.; Neto, A.A.D.; *Fuel* 2001, 80, 75.
- ⁴⁵ Neto, A.A.D.; Dantas, T.N.C.; Moura, A.M.C.P.; *J. Hazardous Materials B* 2004, 114, 115.
- ⁴⁶ Warisnoicharoen, W.; Lansley, A.B.; Lawrence, M.J.; *Int. J. Pharm.* 2000, 198, 7.
- ⁴⁷ Dantas, T.N.C.; Neto, A. A .D.; Moura, M.C.P. A.; Neto, E.L.B.; Forte, K.R.; Leite, R.H.L.. *Water Research* 2003, 37, 2709.
- ⁴⁸ Gonçalves, S.A.P.; Pauli, S.H.; Tedesco; A.C., Quina, F.H.; Okano, L.T.; Bonilha, J.B.S.; *J. Colloid Interf. Sci.* 2003, 267, 494.
- ⁴⁹ Jing, F.; An, X.; Shen, W.; *J. Mol. Catalisys B* 2003, 24-25, 53.

- ⁵⁰ Capek, I.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004, 110, 49.
- ⁵¹ Moulik, S.P.; Digout, L.G.; Alylward, W.M.; Palepu R.; *Langmuir* 2000, 16, 3101.
- ⁵² Klier, J.; Tucker, C.J.; Kalantar, T. H.; Green, D.P.; *Adv. Mater* 2000, 12, 1751.
- ⁵³ Dixit, S.G.; Mahadeshwar, A.R.; Haram, S.K.; *Colloid. Surf. A* 1998, 133, 69.
- ⁵⁴ Farago, B.; *Physica B* 1996, 226, 51.
- ⁵⁵ Vandamme, T.F.; *Prog. Retin. Eye Res.* 2002, 21, 15.
- ⁵⁶ Bayrak, Y.; *Colloid. Surf. A.* 2004, 247, 99.
- ⁵⁷ Gradzielski, M.; Hoffmann, H.; *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 2613.
- ⁵⁸ Langevin, D.; *Adv. Colloid Interface Sci.* 1991, 34, 583
- ⁵⁹ Altria, K.D.; *J. Cap. Elec. and Microchip Tech.* 2002, 7, 11.
- ⁶⁰ Bidyut, K. P.; Moulik, S.P.; *J. Dispersion Sci. Tech.* 1997, 18, 301.
- ⁶¹ Olabisi, O.; Robeson, L.M.; Shaw, M.T.. *Polymer-Polymer Miscibility*, Academic Press: New York, 1979.
- ⁶² Gullón, J.S., Montiel, V.R., Clavilier, A.; *J. Electroanal. Chem.* 2003, 554-555, 273.
- ⁶³ Charlton, I.D.; Doherty, A.P.; *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 8061.
- ⁶⁴ Watarai, H.; *J. Chromatogr. A* 1997, 780, 93.
- ⁶⁵ Murthy, A .K.; *Colloid & Polymer Sci.* 1993, 271, 209.
- ⁶⁶ Bumajdad, A .; Eastoe, J.; *J. Colloid Interface Sci.* 2004, 274, 268
- ⁶⁷ Chang, H.C.; Lin, Y.Y.; Chern, C.S.; Lin, S.Y.; *Langmuir* 1998, 14, 6632.
- ⁶⁸ Olla, M.; Monduzzi, M.; Ambrosone, L.; *Colloid. Surf. A* 1999, 160, 23.
- ⁶⁹ Schelly, Z.A.; *J. Mol. Liq.* 1997, 72, 3.
- ⁷⁰ Vandamme, T.F.; *Pro. Retin. Eye Res.* 2002, 21, 15.
- ⁷¹ Lawrence, M.J.; Rees, G.D.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000, 45, 89.
- ⁷² Groswasser, A. B.; Tlusty, T.; Safran, S. A.; Talmon, Y.; *Langmuir* 1999, 15, 5448.
- ⁷³ Lopez, F.; Cinelli, G.; Ambrosone, L.; Colafemmina, G.; Ceglie, A., Palazzo, G.; *Colloid. Surf. A* 2004, 237, 49.
- ⁷⁴ Mo, C.; Zhong, M.; Zhong, Q. ; *J. Electroanal. Chem.* 2000, 493, 100.
- ⁷⁵ Mackay, R.A.; Myers, S.A.; Bodalbhai, L.; Brajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* 1990, 62, 1084.
- ⁷⁶ Bellocq, A . M.; Biais, J.; Bothorel, P.; Clin, B.; Fourche, G.; Lalanne, P.; Lemaire, B.; Lemanceau, B. ; Roux, D. ; *Adv. Colloid Inerface Sci.* 1984, 20, 167.
- ⁷⁷ Hou, Z.; Li, Z.; Wang, H.; *Colloid. Surf. A* 2000, 168, 109.
- ⁷⁸ Bauer, D. ; *Anal. Chem.* 1983, 55, 662.
- ⁷⁹ Dierkes, F.; Haegel, F.H.; Schwuger, M.J.; *Colloid. Surf. A* 1998, 141, 217.

- ⁸⁰ Lopez-Quintela, M.A.; Tojo, C.; Blanco, M.C.; Garcia-Rio, L.; Leis, J.R.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2004, 9, 264.
- ⁸¹ Nitschke, M.; Pastore, G.M.; *Quim. Nova* 2002, 25, 772.
- ⁸² Maniasso, N.; *Quim. Nova* 2001, 24, 87.
- ⁸³ West, C.C.; Harwell, J.H.; *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26, 2324.
- ⁸⁴ Herrero-Martínez, J.M.; Simó-Alfonso, E.F.; Mongay-Fernández, C.; Ramis-Ramos, G.; *J. Chromatogr. A* 2000, 895, 227.
- ⁸⁵ Fattal, E.; Couvreur, P.; Puisieux, F. In *Méthodes de préparation des liposomes*; Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Phillipot, J.R.; Schuber, F. (Edt.) ; Les liposomes, Les Editions INSERM;Paris, 1993, Chapitre 2.
- ⁸⁶ Li, X.; Kunieda, H.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2003, 8, 327.
- ⁸⁷ Singh, H.N.; Prasad, Ch.D.; Kumar, S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1993, 70, 69.
- ⁸⁸ D'Angelo, M.; Fioretto, D.; Onori, G.; Santucci A.; *J. of Mol. Struct.* 1996, 383, 157.
- ⁸⁹ Hellweg, T.; Klitzing, R.V.; *Physica A* 2000, 283, 349.
- ⁹⁰ Porras, M.; Solans, C.; González, C.; Martínez, A. Guinart, A.; Gutiérrez, J.M.; *Colloid. Surf. A.* 2004, 249, 115.
- ⁹¹ Hellweg, T.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2002, 7, 50.
- ⁹² Burchard, W.; *Makromol. Chem. Macromol Symp.* 1988, 18, 1.
- ⁹³ Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering. With Applications to Chemistry, Biology and Physics* John Wiley & Sons, New York, Chapter II, 1976, pp. 10-23.
- ⁹⁴ Barth, H.G.; Mays, J.W.; *Modern Methods of Polymer Characterization*, v.113, John Wiley & Sons: New York, 1991.
- ⁹⁵ Tanford, C.. *Physical Chemistry of Macromolecules*. New York: John Wiley & Sons, 1961, pp. 275-316.
- ⁹⁶ Hofer, M. *Neutron X-Ray and Light scattering: Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems*. Lindner, P.; Zemb Th. (Eds.) New York: Elsevier, 1991.
- ⁹⁷ Pecora, R.. *Dynamic Light Scattering*. Plenum Press, 1985.
- ⁹⁸ Rouch, J.; Safouane, A.; Tartaglia, P; Chen, S.H.; *J. Chem. Phys.* 1989, 90, 3756.
- ⁹⁹ Brown, W. *Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications* Clarendon Press, Oxford (1993) Chapter VIII, pp. 372-406.
- ¹⁰⁰ Provencher, S.W.; *Makromol. Chem.* 1979, 180, 201.
- ¹⁰¹ Martin, J.E.; Schaefer, D.W.; *Phys.Rev. Lett.* 1984, 53, 2457.
- ¹⁰² Goldszal, A.; Coasteux, S.; Djabourov, M.; *Colloid. Surf. A* 1996, 112, 141.
- ¹⁰³ Claire, K.; Pecora, R.; *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 746.

- ¹⁰⁴ Crupi, V.; Maisano, G.; Majolino, D.; Ponterio, R.; Villari, V.; Caponetti, E.; *J. Mol. Struct.* 1996, 383, 171.
- ¹⁰⁵ Bejarano, M.; Mota, A. M.; Gonçalves, M. L. S.; Madrid, L.; *The Science of The Total Environment* 1994, 158, 9.
- ¹⁰⁶ Bard, A.J.; Faulkner, L.R.; *Electrochemical Methods*; John Wiley & Sons: New York, 1980.
- ¹⁰⁷ Brett, C.M.A.; Brett, A.M.O.; *Electrochemistry Principal, Methods abd Applications*; Oxford University Press: Oxford, 1993.
- ¹⁰⁸ Lavallee, M. Schamme, O.; Herbert, N.; Edt. *Intracellular glass microelectrodes*, John Willey&Sons Inc.: New York, 1969.
- ¹⁰⁹ Xie, X.; Stüben, D.; Berner, Z.; Albers, J.; Hintsche, R.; Jantzen, E.; *Sensor. Actuat. B* 2004, 97, 168.
- ¹¹⁰ Bindra, P.; Brown, A.P.; Pletcher, D.; *J. Electroanal. Chem.* 1975, 58, 31.
- ¹¹¹ Perdicakis, M.; Piatnicki, C.M.S.; Bessière, J.; *Anal. Chim. Acta* 1993, 273, 81.
- ¹¹² Perdicakis, M.; Piatnicki, C.M.S.; Bessière, J.; *J. Chimie-Physique* 1992, 89, 2067.
- ¹¹³ Ceballos, C.; Fernández H.; *Food Res. Int.* 2000, 33, 357.
- ¹¹⁴ Belmont, C.; Tercier, M.L.; Buffle, J.; Fiaccabrino, G.C.; Koudelka-Hep, M.; *Anal. Chim. Acta* 1996, 329, 203.
- ¹¹⁵ Cheek, G. T.; Mowery, R.; *Anal. Chem.* 1989, 61, 1467.
- ¹¹⁶ Farrington, A.M.; Slater, J.M.; *Analyst* 1997, 122, 593.
- ¹¹⁷ Ceballos, C.; Fernández, H.; *J. Braz. Chem. Soc.* 1995, 6, 1.
- ¹¹⁸ Myers, S.A.; Mackay, R.A.; Btajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* 1993, 65, 34.
- ¹¹⁹ Takamura, K.; Fuse, T.; Arai, K.; Kusu, F.; *J. Electroanal. Chem.* 1999, 468, 53.
- ¹²⁰ Bond, A.M.; Oldham, K.B.; Zoski, C.G.; *Anal. Chim. Acta*, 1989, 216, 177.
- ¹²¹ Stulik, K.; Amatore, C.; Holub, K; Marecek, V.; Kutner, W.; *Pure Appl. Chem.* 2000, 72, 1483.
- ¹²² Fleischmann, M.; Pons, S.; Rolison, D.R.; Schmidt, P.; *Ultramicroelectrode*, Datatech Systems, Inc., 1987.
- ¹²³ Saito, Y.; *Rev. of Pol. of Jap.* 1968, 15, 77.
- ¹²⁴ Geraldo, M.D., Montenegro, M.I., Pletcher, D.; *J. Electroanal. Chem.* 1996, 418, 41.
- ¹²⁵ Jha, B.K., Kulkarni, B.D., Vinod, M.P., Vijayamohanam, K. *Chem. Phys. Lett.* 1995, 240, 442.
- ¹²⁶ Oldham, H.B; Myland, J.C.. *Fundamentals of Electrochemical Science*, Academic Press: San Diego, 1994.

- ¹²⁷ Bond, A.M.; *Analyst* 1994, 119, R1.
- ¹²⁸ Farrington, A.M.; Slater, J.M.; *Analyst* 1997, 122, 593.
- ¹²⁹ Villullas, H.M.; Ticianelli, E.A.; Macagno, V.A.; González, E.R.; *Electroquímica: fundamentos y aplicaciones en un enfoque interdisciplinario*. Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, 2000.
- ¹³⁰ Howell, J.O.; Wightman R.M.; *Anal. Chem.* 1984, 56, 524.
- ¹³¹ Mendonça, C.R.B.; Bica, C.I.D.; Piatnicki, C.M.S.; *J. Braz. Chem. Soc.* 2003, 14, 628.
- ¹³² Mendonça, C. R. B.; Ramis-Ramos, G.; Simó-Alfonso, E.F.; Bica, C. I. D.; Piatnicki, C. M. S. In: *Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica 2004*, Niterói/RJ, p. FUN03-FUN05.
- ¹³³ Baranski, A. S.; Winkler, K.; *J. Electroanal. Chem.* 1998, 453, 29.
- ¹³⁴ Bond A. M.; Mann, T. F.; *Electrochim. Acta* 1987, 32, 683.
- ¹³⁵ Fang, Y.; Leddy, J.; *J. Electroanal. Chem.* 1995, 384, 5.
- ¹³⁶ Bond, A.M.; Pfund, V.B.; *J. Electroanal. Chem.* 1992, 335, 281.
- ¹³⁷ Cabrera, C.R.; Bard, A.J.; *J. Electroanal. Chem.* 1989, 273, 147.
- ¹³⁸ Niehaus, D.; Philips, M.; Michael, A.; Wightman, R.M.; *J. Phys. Chem.* 1989, 93, 6232.
- ¹³⁹ Olsen, S.; Tallman, D.E.; *Anal. Chem.* 1996, 68, 2054.
- ¹⁴⁰ Goldfarb, D.L.; Corti, H.R.; *J. Electroanal. Chem.* 2001, 509, 155.
- ¹⁴¹ Bond, A. M.; Fleischmann, M.; Robinson, J.; *J. Electroanal. Chem.* 1984, 168, 299.
- ¹⁴² Belmont-Hebert, C.; Tercier, M.L.; Buffle, J.; Fiaccabrino, G.C.; Rooijm, N.F.; Koudelka-Hep, M.; *Anal. Chem.* 1998, 70, 2949.
- ¹⁴³ Penner, R.M.; Hebben, M.J.; Longin, T.L.; Lewis, N.S.; *Science* 1990, 250, 1118.
- ¹⁴⁴ Schuette, S.A.; McCreery, R.L.; *J. Electroanal. Chem.* 1985, 191, 329.
- ¹⁴⁵ Del Pozo, J.A.; Costa-Garcia, A.; Blanco, P.T.; *Anal. Chim. Acta* 1994, 289, 169.
- ¹⁴⁶ Howell, J.O.; Gonçalves, J. M.; Amatore, C.; Klasinc, L.; Wightman, R.M.; Kochi, J.K.; *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 3968.
- ¹⁴⁷ John, W.; Wallace, G.G.; *J. Electroanal. Chem.* 1990, 283, 87.
- ¹⁴⁸ Gao, X.; Lee, J.; White, H.S.; *Anal. Chem.* 1995, 67, 1541.
- ¹⁴⁹ Macpherson, J.V.; Simjee, N.; Unwin, P.R.; *Electrochim. Acta* 2001, 47, 29.
- ¹⁵⁰ Yang, Z.; Zhao, J.; Lu, Y.; Du, Z.; Yang, Z.. *Chem. Phys.* 2004, 307, 71.
- ¹⁵¹ Tavares, M.F.M.; *Quím. Nova* 1997, 20, 493.
- ¹⁵² Altria, K.D.; *J.Chromatogr. A* 1999, 856, 443.
- ¹⁵³ Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, P. E. M.; *J. Chromatogr.* 1979, 169, 11.

- ¹⁵⁴ Jorgenson, J.W.; Lukacs, K. A.; J. Chromatogr 1981, 218, 209.
- ¹⁵⁵ Miranda, C. E. S., Carrilho, E., Gervasio, A.P., Giné, M.F.; Quim. Nova 2002, 25, 412.
- ¹⁵⁶ Santos, M.R., Tavares, M.F.M., Rubim, J.C.; Quím. Nova 2000, 23, 585.
- ¹⁵⁷ Colombara, R.; Tavares, M.F.M.; Massaro, S.; Quim. Nova 1997, 20, 512.
- ¹⁵⁸ Voegel, P.D.; Baldwin, P.R.; Electrophoresis; 1997, 18, 2267.
- ¹⁵⁹ Jones W. R.; Jnadik P. J.; J. Chromatogr. 1992, 608, 385.
- ¹⁶⁰ Weston A.; Brown P; Jandik P.; Jones W. R.; J. Chromatogr. 1992, 608, 395.
- ¹⁶¹ Rush R.S.; Derby P. L.; Strickland T. W.; Rohde M. F.; Anal. Chem. 1993, 65, 1834.
- ¹⁶² Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T.A.; Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing: Philadelphia, 1998.
- ¹⁶³ Tavares, M.F.M.; Quim. Nova 1997, 19, 173.
- ¹⁶⁴ Jager, A.V., Tavares, M.F.M.; Quim. Nova 2001, 24, 363.
- ¹⁶⁵ Da Silva, J.A.F.; Quím. Nova 2003, 26, 56.
- ¹⁶⁶ Sun, S.W.; Yeh, P.C. ;J. Pharm. Biom. Ana. 2004.
- ¹⁶⁷ Bo, Tao; Liu, H.; J. Chromatogr. 2004, 812, 165.
- ¹⁶⁸ Wright, P.B.; Lister, A.S.; Dorsey, J.G. ; Anal. Chem. 1997, 69, 3251.
- ¹⁶⁹ Miranda, C. E. S., Carrilho, E., Gervasio, A.P., Giné, M.F.; Quim. Nova 2002, 25, 412.
- ¹⁷⁰ Santos, M.R.; Tavares, M.F.M.; Rubim, J.C.; Quím. Nova 2000, 23, 585.
- ¹⁷¹ Weinberger R.; Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press: New York, 1993.
- ¹⁷² Kuban, P.; Engstrom, A.; Olsson, J.C.; Thorsen, G.; Tryzell, R.; Karlberg, B.; Anal. Chim. Acta 1997, 337, 117.
- ¹⁷³ Heiger, D.; High performance capillary electrophoresis. Agilent Technologies: Germany, 2000.
- ¹⁷⁴ Schwer, C; Kenndler, E.; Anal. Chem. 1991, 63, 1801.
- ¹⁷⁵ Tavares, M.F.M.; Anal. Chem. 1995, 67, 3687.
- ¹⁷⁶ Tavares, M.F.M.; Quim. Nova 1996, 19, 173.
- ¹⁷⁷ http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec_4/elec_4.htm. Capturado em 18/12/2004.
- ¹⁷⁸ Hayes, M.A.; Ewing, A. G.; Anal. Chem. 1992, 64, 512.
- ¹⁷⁹ Vindevogel, J.; Sandra, P.; J.Chromatogr. 1991, 541, 483.
- ¹⁸⁰ Green, J.S.; Jorgenson, J.W.; J.Chromatogr.1989, 478, 63.
- ¹⁸¹ Fujiwara, G.; Honda, S.; Anal. Chem. 1987, 59, 487.
- ¹⁸² Altria, K.D.; Mahuzier, P.E.; Clark, B. J.; Electrophoresis 2003, 24, 315.
- ¹⁸³ Mahuzier, P.E., Clark, J.B., Bryant, S.M., Altria, K.D.; Electrophoresis 2001, 22, 3819.

- ¹⁸⁴ Tavares, M.F.M.; Colombara, R.; Massaro, S.; *J. Chromatogr. A* 1997, 772, 171.
- ¹⁸⁵ Prado, M.S.A.; Silva, C.A.; Tavares, M.F.M.; Altria, K.D.; *J. Chromatog.* 2004, 1051, 291.
- ¹⁸⁶ Huang, H.Y.; Chuang, C.L.; Chiu, C.W.; Yeh, J.M.; *Food Chem.* 2005, 89, 315.
- ¹⁸⁷ Terabe, S.; Matsubara, N.; *J. Chromatog.* 1992, 608, 23.
- ¹⁸⁸ Miola, M. F., Snowden, M. J., Altria, K. D.; *J. Pharm. Biom. Anal.* 1998, 18, 785.
- ¹⁸⁹ Nishi, H.; *J. Chromatogr.* 1997, 780, 243.
- ¹⁹⁰ Pedersen-Bjergaard, S.; Naess, O.; Moestue, S.; Rasmussen, K. E.; *J. Chromatogr. A* 2000, 876, 201.
- ¹⁹¹ Watarai, H.; Ogawa, K.; Abe, M; Monta, T.; Takahashi, I.; *Anal. Sci.* 1991, 7, 245.
- ¹⁹² Altria, K. D.; *J. Chromatogr.* 2000, 832, 171.
- ¹⁹³ Watarai, H., Takahashi, I.; *Anal. Commun.* 1998, 35, 289.
- ¹⁹⁴ Jensen, C. G., Hansen, S. H., Bjergaard, S. P.; *Electrophoresis* 2001, 22, 1330.
- ¹⁹⁵ Ishihama, Y., Oda, Y., Asakawa, N.; *Anal. Chem.* 1996, 68, 1028.
- ¹⁹⁶ Altria, K. D.; *J. Chromatogr. A* 1999, 844, 371.
- ¹⁹⁷ Okamoto, H.; Nakajima, T.; Ito, Y.; Aketo, T.; Shimada, K.; Yamato, S.; *J. Pharm. Biomedical Anal.* 2004. No prelo.
- ¹⁹⁸ Silva, C.A.; Tavares, M.F.M.; Altria, K.D.; *J. Chromatog. A* 2004, 1051, 291.
- ¹⁹⁹ Sánchez, J. M., Salvadó, V.; *J. Chromatogr. A* 2002, 950, 241.
- ²⁰⁰ Miksík, I., Deyl, Z.; *J. Chromatogr. A* 1998, 807, 111.
- ²⁰¹ Vomastová, L., Miksík, I., Deyl, Z.; *J. Chromatogr. B* 1996, 681, 107.
- ²⁰² Iwunze, M., Sucheta, A., Rusling, J.; *Anal. Chem.* 1990, 62, 644.
- ²⁰³ Boso, R. L., Bellini, M. S., Miksík, I., Deyl, Z.; *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 11.
- ²⁰⁴ Altria, K.D.; Broderick, M.F.; Donegan, S.; Power, J.; *Electrophoresis* 2004, 25, 645.
- ²⁰⁵ Broderick, M.; Donegan, S.; Power, J.; Altria, K.; *J. Pharm. Biom. Anal.* 2004, no prelo.
- ²⁰⁶ Walbroehl, Y.; Jorgenson, J.W.; *J. Chromatogr. A* 1984, 315, 135.
- ²⁰⁷ Okada, T.; *J. Chromatogr. A* 1995, 695, 309.
- ²⁰⁸ Bjørnsdottir, I; Honoré-Hansen, S.; *J. Chromatogr. A* 1995, 711, 313.
- ²⁰⁹ Bjørnsdottir, I.; Hansen, S.H.; *J. Pharm. Biom. Anal.* 1995, 13, 1473.
- ²¹⁰ Fillet, M.; Servais, A.C.; Crommen, J.; *Electrophoresis* 2003, 24, 1499.
- ²¹¹ Valko, I.E. Siren, H.; Riekkola, M.L.; *J. Microcol. Sep.* 1999, 11, 199.
- ²¹² Cottet, H.; Struijk, M. P.; Van Dongen, J.L.J; Claessens, H.A. Cramers, C.A.; *J. Chromatogr. A* 2001, 915, 241.
- ²¹³ Shihabi, Z.K.; *Electrophoresis* 2002, 23 1628.

- ²¹⁴ Grob, M.; Steiner, F.; *Electrophoresis* 2002, 23, 1853.
- ²¹⁵ M.L., Riekkola, M.L.; Jussila, M.; Porras, S.P.; Valko, I.E.; *J Chromatogr. A* 2000, 892, 155.
- ²¹⁶ Grob, M.; Steiner, F.; *Electrophoresis* 2002, 23, 1921.
- ²¹⁷ Weinberger, R.; *Practical Capillary Electrophoresis*; Academic Press: California, 2000.
- ²¹⁸ Timerbaev, A. R.; *Analyst* 2001, 126, 964.
- ²¹⁹ Caruso, D. Berra, B. Giavarini, F. Cortesi, N. Fedeli, E. Galli, G.; *Nutr, Met. Card. Dis.* 1999, 9, 102.
- ²²⁰ Visioli, F.; Galli, C.; *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4292.
- ²²¹ Visioli, F.; Galli, C.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002, 42, 209.
- ²²² Primo-Yúfera, E.; *Química de los alimentos, Síntesis*, Madrid 1998.
- ²²³ Gimeno, E.; Castellote A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; De la Torre, M.C.; López-Sabater, M. C.; *Food Chem.* 2002, 78, 207.
- ²²⁴ Bianco, A.; Uccella, N.; *Food Res. Int.* 2000, 33, 475.
- ²²⁵ Bonoli, M.; Montanucci, M.; Gallina Toschi, T.; Lercker, G.; *J. Chromatogr. A* 2003, 1011, 163.
- ²²⁶ Thompson, J. N.; Hatina, G.; *J. Liq. Chrom.* 1979, 2, 327.
- ²²⁷ Kamal-Eldin, A.; Görgen, S.; Pettersson, J.; Lampi, A. M.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 217.
- ²²⁸ Gorinstein, S.; Martin-Belloso, O.; Katrich, E.; Lojek, A.; Gligelmo-Miguel, N.; Haruenkit, R.; Park, Y. S.; Jung, S. T.; Trakhtenberg, S.; *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14, 154.
- ²²⁹ Bonoli, M.; Pelillo, M.; Gallina Toschi, T.; Lercker, G.; *Food Chem.* 2003, 81, 631.
- ²³⁰ Galeano Diaz, T.; Durán Merás, I.; Guiberteau Cabanillas, A.; Alexandre Franco, M. F.; *Anal. Chim. Acta* 2004, 511, 231.
- ²³¹ Coatanea, M.; Darchen, A.; Hauchard, D.; *Sens. Act. B* 2001, 76, 539.
- ²³² Pyka, A.; Sliwiok, J.; *J. Chromatogr. A* 2001, 935, 71.
- ²³³ Ruperez, F. J.; Martin, D.; Herrera, E.; Barbas, C.; *J. Chromatogr. A* 2001, 935, 45.
- ²³⁴ Artho, A.; Grob, K.; Mariani, C.; *Fett Wiss. Technol.* 1993, 95, 176.
- ²³⁵ Du, M.; Ahn, D. U.; *J. Food Sci.* 2002, 67, 1696.
- ²³⁶ Melchert, H. U.; Pollock, D.; Pabel, E.; Ruback, K.; Stan, H. J.; *J. Chromatogr. A* 2002, 976, 215.
- ²³⁷ Ramis-Ramos, G.. *Synthetic Antioxidants, Characterisation and Analysis*, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Elsevier, Amsterdam 2003, ch. 55, pp. 275.
- ²³⁸ Mariani, C.; Fedelli, E.; *Riv. Ital. Sost. Gras.* 1983, 60, 667.

- ²³⁹ Yang, M. H.; Lin, H. J.; Choong, Y. M.; *Food Res. Int.* 2002, 35, 627.
- ²⁴⁰ Andrikopoulos, N. K.; Brueschweiler, H.; Felber, H.; Taeschler, Ch.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, 68, 359.
- ²⁴¹ Podda, M.; Weber, C.; Traber, M. G.; Packer, L.; *J. Lipid Res.* 1996, 37, 893.
- ²⁴² Sánchez-Pérez, A.; Delgado-Zamarreño, M. M.; Bustamante-Rangel, M.; Hernández-Méndez, J.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 229.
- ²⁴³ Abidi, S. L.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 197.
- ²⁴⁴ Richheimer, S. L.; Kent, M. C.; Bernart, M. W.; *J. Chromatogr. A* 1994, 677, 75.
- ²⁴⁵ Abidi, S. L.; Mounts, T. L.; *J. Chromatogr. A* 1997, 782, 25.
- ²⁴⁶ Gimeno, E.; Calero, E.; Castellote, A.; Lamuela-Raventos, R. M.; De la Torre, M. C.; Lopez-Sabater, M. C.; *J. Chromatogr. A* 2000, 881, 255.
- ²⁴⁷ Bendini, A.; Bonoli, M.; Cerretani, L.; Biguzzi, B.; Lercker, G.; Gallina Toschi, T.; *J. Chromatogr. A* 2003, 985, 425.
- ²⁴⁸ Balz, M. K.; Schulte, E.; Thier, H. P.; *Fat Sci. Technol.* 1993, 95, 215.
- ²⁴⁹ Tan, B.; Brzuskiwicz, L.; *Anal. Biochem.* 1989, 180, 368.
- ²⁵⁰ Kramer, J. K. G.; Blais, L.; Fouchard, R. C.; Melnyk, R. A.; Kallury, K. M. R.; *Lipids* 1997, 32, 323.
- ²⁵¹ Rammell, C. G.; Hoogenboom, J. J. L.; *J. Liq. Chromatogr.* 1985, 8, 707.
- ²⁵² Speek, A. J.; Schrijver, J.; Schreurs, W. H. P.; *J. Food Sci.* 1985, 50, 121.
- ²⁵³ Abidi, S. L.; Mounts, T. L.; *J. Chromatogr. A* 1994, 670, 67.
- ²⁵⁴ Abidi, S. L.; *J. Chromatogr. A* 1999, 844, 67.
- ²⁵⁵ Dionisi, F.; Prodolliet, J.; Tagliaferri, E.; *J. Am. Chem. Oil Chem. Soc.* 1995, 72, 1505.
- ²⁵⁶ Noguera-Ortí, J. F.; Villanueva-Camañas, R. M.; Ramis-Ramos, G.; *Anal. Chim. Acta* 1999, 387, 127.
- ²⁵⁷ Bonoli, M.; Montanucci, M.; Gallina Toschi, T.; Lercker, G.; *J. Chromatogr. A* 2003, 1011, 163.
- ²⁵⁸ Abidi, S. L.; Rennick, K. A.; *J. Chromatogr. A* 2001, 913, 379.
- ²⁵⁹ Fanali, S.; Catarcini, P.; Quaglia, M. G.; Camera, E.; Rinaldi, M.; Picardo, M.; *J. Pharm. Biom. Anal.* 2002, 29, 973.
- ²⁶⁰ Pedersen-Bjergaard, S.; Næss, Ø.; Moestue, S.; Rasmussen, K. E.; *J. Chromatogr. A* 2000, 876, 201.
- ²⁶¹ Okamoto, H.; Uetake, A.; Tamaya, R.; Nakajima, T.; Sagara, K.; Ito, Y.; *J. Chromatogr. A* 2001, 929, 133.
- ²⁶² Porras, S. P.; Riekkola, M. L.; Kenndler, E.; *Electrophoresis* 2002, 23, 367.

- ²⁶³ Vaher, M.; Koel, M.; Kaljurand, M.; *Electrophoresis* 2002, 23, 426.
- ²⁶⁴ Porras, S. P.; Kenndler, E.; *Electrophoresis* 2004, 25, 2946.
- ²⁶⁵ Porras, S. P.; Riekkola, M. L.; Kenndler, E.; *Electrophoresis* 2003, 24, 1485.
- ²⁶⁶ Porras, S. P.; Riekkola, M. L.; Kenndler, E.; *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 31.
- ²⁶⁷ Sarmini, K.; Kenndler, E.; *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 3.
- ²⁶⁸ Steiner, F.; Hassel, M.; *Electrophoresis* 2000, 21, 3994.
- ²⁶⁹ Riekkola, M. L.; Jussila, M.; Porras, S. P.; Valkó, I. E.; *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 18.
155.
- ²⁷⁰ Riekkola, M. L.; *Electrophoresis* 2002, 23, 3865.
- ²⁷¹ Demianova, Z.; Sirén, H.; Kuldvee, R.; Riekkola, M. L.; *Electrophoresis* 2003, 24, 4264.

Capítulo 3

EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

Para o preparo das microemulsões, utilizou-se óleo de soja comercial refinado e desodorizado, envasado em embalagem metálica, obtido do comércio local. Empregou-se como surfactante dodecil sulfato de sódio 99 % (Merck, Darmstadt, Alemanha); água deionizada previamente destilada e, como co-surfactantes, alternativamente, etanol 95 % (Synth, São Paulo, Brasil); 1-pentanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol, ciclohexanol, 3-etil-1-heptanol, 1-octanol, 1-decanol, etilenoglicol, todos entre 99-99,5 % de pureza (Merck, Darmstadt, Alemanha); 1-hexanol 96 % (Riedel, Hannover, Alemanha); 2-propanol 99,5% (Nuclear, São Paulo, Brasil); 1-butanol 99,4 % (Synth, São Paulo, Brasil); 2-pentanol, 3-hexanol, 1-heptanol, todos entre 97-98 % de pureza (Acrós, New Jersey, EUA); dietilenoglicol 99 % (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) e 1,4-butanodiol 99 % (Aldrich, EUA). Tetraborato de sódio (Probus, Barcelona, Espanha) foi usado para avaliar a estabilidade das microemulsões. Como sonda analítica e como material de referência eletroquímico empregaram-se, respectivamente, ácido oléico puro Reagen e ferroceno 98 % da Fluka (Buchs, Switzerland).¹

Na construção dos diagramas de fases da microemulsão, na presença de sal, as seguintes aminas foram experimentadas: propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, dodecilamina, dietilamina, dipropilamina, dibutilamina, dipentilamina, dihexilamina, trietilamina, tripropilamina, tributilamina e tripentilamina todas na concentração de $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e adicionadas de $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético.

As medidas voltamétricas e de condutividade foram realizadas, respectivamente, com um potenciostato EG&G PAR modelo 264 e com um condutivímetro Oakton 35607-10A.

Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram executadas com um espectrogoniometro da Brookhaven Instruments, usando um laser da Spectra-Physics modelo 170 de He-Ne com comprimento de onda 632,8 nm, enquanto que os valores de viscosidade e índice de refração foram obtidos, respectivamente, em um equipamento Brookfield LVDV-II+ Instrument e em um refratômetro de Abbé. Além disto, um espectrômetro de UV-visível da Shimadzu modelo UV-1601PC foi empregado para obter os espectros de absorbância da microemulsão na ausência e presença de ferroceno dissolvido.

Nas medidas por eletroforese capilar, utilizou-se um sistema HP3D (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), provido de um detector espectrofotométrico com arranjo de diodos; capilares de sílica fundida da Composite Metal Services, Ilkley, UK, com 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo) \times 50 μ m I.D e 363 μ m O.D.

Nos estudos realizados por eletroforese capilar utilizou-se como analitos os seguintes reagentes: acetona, tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO), N-metilformamida, dimetilformamida (DMFA), anilina, 2-aminoantraquinona, sulfaguanidina, sulfaquinoxalina, tert-butil-hidroxianisol (BHA), tert-butil-hidroquinona (BHQ), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), galato de octila (OG), galato de propila (PG), e os ácidos benzóico, 3,4,5-trimetoxibenzóico, salicílico (I), 5-sulfônico salicílico, o-ftálico (II), tereftálico e piromelítico (Fluka, Buchs, Switzerland; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha e Panreac, Barcelona, Espanha); outros reagentes utilizados foram: metanol, propanol, 1-pentanol (Scharlab e Panreac, Barcelona, Espanha), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido acético, KOH (Panreac), dietilamina (Carlo Erba, Milano, Itália), trietilamina, butilamina, (Fluka, Buchs, Switzerland) e dodecilamina (Eastman, Kingsport, TN, EUA), tetraborato de sódio (Probus, Barcelona, Espanha), e tris (hidroximetil) aminometano (Tris), trietanolamina, dipentilamina e etanolamina (Sigma-Aldrich e Fluka). Foram usados como padrões os seguintes triacilgliceróis (TAGs): trioleína (TAG monoinsaturado) e trilinoleína (TAG di-insaturado). 1-naftol, α -, γ - e δ -tocoferóis (α -, γ - e δ -T) (Sigma-Aldrich), β -tocoferol (β -T) (Merck, Darmstadt, Alemanha), e os seguintes ácidos hidroxiaromáticos e compostos relacionados: metil-4-hidroxibenzoato (metil parabeno) (Fluka), 2-(p-hidroxifenil) etanol (tirosol) (Sigma-Aldrich), e os ácidos 2,4-dihidroxibenzóico (Acrós Organics, Geel, Belgica), p-

metoxibenzóico (p-anísico), trans-3-fenil-2-propenóico (trans-cinâmico), trans-4-hidroxicinâmico (p-comárico) e trans-4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ferúlico) da Sigma-Aldrich. Foram usadas amostras comerciais de óleos vegetais virgens e refinados de soja, palma (uma amostra do oeste da África), gérmen de trigo (gentilmente doado por Guinama, Valencia, Espanha), azeite de oliva extra virgem e gordura de porco (toucinho), além de uma amostra de toucinho livre de antioxidantes que foi obtida por aquecimento da gordura.

Como modificadores de fluxo eletrosmótico (EOF) foram experimentados: hidroxietil celulose (HEC, 24-27 kDa, Polysciences, Warrington, PA, EUA), álcool polivinílico (PVA, 70-100 kDa, Sigma), brometo de hexadimetrina (Fluka) e 1-(4-iodobutil)-1,4-dimetilpiperazínio de iodo (IBPI), que foi sintetizado e gentilmente doado por R. Sebastiano et al.²

Os eletrólitos de corrida (tampões) foram selecionados para ajustar o valor do pH próximo ao valor correspondente de pKa em água. Assim, as bases livres da trietanolamina (pKa = 7,8), Tris (pKa = 8,1), etanolamina (pKa = 9,5) e dipentilamina (pKa = 10,9) foram usadas na concentração $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ para obter, respectivamente, o tampão aquoso nos intervalos de pH 7,0 – 7,8; 7,0 – 9,5; 9,0 – 10,0 e em pH 10,0. Os valores de pH foram ajustados por adição de gotas de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl às soluções aquosas das aminas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação das Microemulsões

As microemulsões foram preparadas misturando-se o surfactante (SDS) com um álcool (co-surfactante) e água. O óleo foi progressivamente adicionado à mistura, em etapas de 10% de incremento na massa da mistura, compreendendo uma faixa de composição de 10 a 90 %. Esta etapa foi conduzida sob agitação magnética constante.

Diversos álcoois foram testados como co-surfactantes, sendo eles: etanol, 2-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-2-propanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1,4-

butanodiol, 1-pentanol, 2-pentanol, 1-hexanol, 3-hexanol, ciclohexanol, 1-heptanol, 3-etil-1-heptanol, 1-octanol, 1-decanol, etilenoglicol, dietilenoglicol. A razão entre o surfactante e o co-surfactante variou de 1:1 até 1:6 m/m, em etapas de adições sucessivas de uma parte do co-surfactante. Para as razões que resultaram em sistemas transparentes, foram executados experimentos com etapas de adição de 0,1 parte de co-surfactante.

3.2.2 Caracterização das Microemulsões

As intensidades de luz espalhada (DLS) foram correlacionadas com um instrumento de 264 canais BI-9000 AT, compreendendo 7 potências de dez em tempo de retardo. As amostras foram colocadas em um líquido de compensação de índice de refração (decalina). Para caracterizar o comportamento hidrodinâmico das partículas suspensas, as funções de autocorrelação de tempo foram analisadas por ajuste mono-exponencial (Microcal Origin 6.0) e por transformada de Laplace inversa, usando o programa CONTIN.³

Os experimentos de DLS foram realizados nos ângulos de espalhamento de 35; 45; 55; 65; 75; 85; 90; 105; 115; 125 e 135 ° nas temperaturas de $25,0 \pm 0,5$ °C, $40,0 \pm 0,5$ °C e $60,0 \pm 0,5$ °C. Os espectros de UV-visível do óleo de soja e da microemulsão, com e sem ferroceno dissolvido, foram obtidos a fim de comprovar a ausência de absorção de radiação no mesmo comprimento de onda do laser de He-Ne, usado nos experimentos de espalhamento de luz. Para todas as medidas, as amostras foram previamente centrifugadas durante 30 minutos a 4000 rpm, visando minimizar a interferência de partículas de poeira suspensas.

As medidas de índice de refração foram realizadas a $21,0$; $40,0$ e $60,0 \pm 0,5$ °C, enquanto que as medidas de viscosidade foram executadas a $25,0$; $40,0$ e $60,0 \pm 0,1$ °C.

3.2.3 Avaliação da estabilidade

Para avaliar a estabilidade termodinâmica das microemulsões foram executadas medidas de temperatura de turbidez, através da inspeção visual dos sistemas na faixa de temperaturas de 9 a 70 °C, em etapas sucessivas de 3 graus até 25 °C e, acima desta temperatura, em etapas de 5 °C, por 5 minutos, em um banho termostatizado da marca Lauda.

Avaliou-se ainda a estabilidade das microemulsões preparadas com diferentes álcoois usados como co-surfactantes e diferentes proporções surfactante:co-surfactante frente a concentrações crescentes de tetraborato de sódio. A escolha deste sal justifica-se pelo fato de ser um reagente de baixo custo, de uso comum em laboratório de eletroanálise, que permite aumentar a condutividade do meio sem produzir sinal em larga faixa de potencial e pelo seu amplo emprego como agente tamponante, especialmente em eletroforese capilar. Assim, empregaram-se soluções aquosas de tetraborato de sódio em diferentes concentrações no preparo das microemulsões observando-se a perda da estabilidade pelo surgimento de turbidez no sistema.

Visando avaliar a reprodutibilidade, todos os dados da caracterização foram obtidos de triplicatas de cada composição.

3.2.4 Medidas eletroquímicas

Uma solução padrão de KCl de condutividade específica de $1,412 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25 °C foi empregada nas medidas de condutividade, que foram executadas na faixa de 20,0 a $65,0 \pm 0,1$ °C, em etapas de 5 °C.

As curvas de potencial-corrente em microemulsão foram obtidas sob temperatura ambiente, a célula eletroquímica consistindo de uma associação de três eletrodos, sendo um de trabalho de disco de Pt com raio de 1 μm , um eletrodo de referência de AgCl/Ag e um eletrodo auxiliar de Pt. A menos que tenha sido indicado, a maioria dos resultados refere-se ao eletrodo de referência de AgCl/Ag, no entanto, em alguns experimentos um eletrodo de Pt quasi referência^{4,5} foi empregado.

Para obter repetibilidade nos resultados, o eletrodo de trabalho foi limpo antes de cada medida, empregando um banho de ultra-som e imersão por 5 minutos, respectivamente, em acetona e em 1:1 ácido sulfúrico/água.

Para a determinação do domínio eletroquímico da microemulsões o potencial foi varrido de 0,00 V a 3,00 V e de 0,00 V a -2,50 V a 1 mV s^{-1} , sendo os limites anódico e catódico arbitrariamente definidos como os potenciais nos quais a densidade de corrente alcançou $0,1 \text{ A cm}^{-2}$.

A varredura linear do potencial do ume de Pt na microemulsão, na ausência e na presença de ferroceno $2, 3$ e $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, foi realizada sob fluxo de N_2 , sendo o potencial varrido a 1 mV s^{-1} .

Avaliou-se ainda o comportamento do ferroceno nestes sistemas através de medidas de voltametria cíclica em ume de Pt, com o meio desaerado, na faixa de potenciais de 0,0 a 1,1 V, sendo o potencial varrido nas velocidades de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000 mV s^{-1} .

O comportamento eletroquímico do ácido oléico nas concentrações de 3, 5 e $7 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ na microemulsão foi avaliado por voltametria linear nas regiões anódica e catódica, um ume de Pt, sob fluxo de N_2 , sendo o potencial varrido a 2 mV s^{-1} .

3.2.5 Medidas por eletroforese capilar

As microemulsões utilizadas como eletrólito de corrida em eletroforese capilar foram preparadas por meio de pesagem e mistura dos componentes, contendo 85 % de uma mistura 1:4 SDS/ n-pentanol e 15 % de um tampão aquoso (a menos que indicado, empregou-se Tris a pH 8,4).

Para prevenir o efeito anti-stacking (ver item 2.6.9), as microemulsões usadas para dissolver ou diluir as amostras a serem injetadas foram preparadas com água ao invés de tampão. Prepararam-se nesta microemulsão soluções contendo um ou diversos solutos usados como analitos, conforme indicado no item 3.1, pág. 64, cada um na concentração de

500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para executar os experimentos com óleos vegetais ou gordura animal, os solutos foram adicionados às amostras que foram misturadas à microemulsão na razão de 1:4 m/m (2,5 g de gordura + 10 g de microemulsão). Para manipular as amostras de gordura animal, utilizou-se um banho de água a 45 °C.

3.2.5.1 Condicionamento e limpeza do capilar: microemulsões

Os capilares novos foram tratados, nesta ordem, com NaOH 1 e 0,1 mol L⁻¹ e água a 60 °C (10 min cada). Diariamente, antes do uso, os capilares foram condicionados com 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (20 min) e água (10 min) a 60 °C.

O protocolo de pré-condicionamento usado entre injeções consecutivas foi: limpeza do capilar, usando pressão externa produzida por um cilindro auxiliar de nitrogênio, com 0,1 mol L⁻¹ NaOH (10 min/ 5 bar), água (1 min/ 5 bar) e condicionamento com a solução do modificador de parede (5 mM de IBPI em 25 mM de tetraborado de sódio, 2 min/ 5 bar), seguido por um condicionamento eletroforético com a mesma solução de IBPI (3 min/ +20 kV) e condicionamento final com o tampão de corrida 3 min/ 1 bar). Acredita-se que o modificador IBPI, liga-se covalentemente às paredes de sílica do capilar, durante o condicionamento eletroforético.⁶⁻⁸

3.2.5.2 Condicionamento e limpeza do capilar: meios não aquosos

O capilar era lavado, diariamente antes do uso, com NaOH 1 e 0,1 mol L⁻¹ seguido de água (7 min/ 5 bar cada) e eletrólito de corrida (3 min/ 5 bar). Entre injeções consecutivas o capilar foi lavado com NaOH 0,1 e 1 mol L⁻¹ (5 min/5 bar cada um) e água (1 min/ 5 bar), sendo na sequência condicionado com o tampão de corrida (3 min/ 5 bar). Após cada etapa de trabalho o capilar foi limpo com água por 10 min e com ar por mais 2 min.

Todas as amostras, previamente degaseificadas em um banho de ultrassom e filtradas por uma membrana de nylon de 0,45 μm (Albet, Barcelona), foram injetadas hidrodinamicamente (50 mBar durante 3 s). Durante a separação, o capilar foi mantido a

25 °C e aplicou-se uma voltagem de -20 kV (ânodo próximo ao detector) exceto para a amostra de gordura animal, para a qual a temperatura do capilar foi mantida em 35 °C.

Os comprimentos de onda utilizados na detecção durante os estudos com microemulsões foram 210, 240 e 295 nm \pm 10 nm, enquanto que aqueles utilizados com os meios não aquosos foram 220, 240, 290 e 330 nm \pm 10 nm, sendo o comprimento de onda de 450 nm \pm 40 nm usado como referência em ambas situações. O registro completo dos espectros foi sempre executado. Quando foi necessário confirmar a identidade dos picos, utilizou-se um *homemade software* escrito em MATLAB (The Mathworks, Natick, MA, EUA), que permitiu comparar os espectros de padrões com aqueles obtidos em um espectrofotômetro, através da seleção dos picos estocados na matriz comprimento de onda-tempo.

Nos estudos quantitativos, utilizaram-se as áreas corrigidas (divididas pelo respectivo tempo de migração) usando 1-naftol como padrão interno.

Para os testes realizados com eletroforese capilar em meios não aquosos, utilizou-se óleo de soja refinado tanto para os estudos de otimização quanto para o preparo das soluções de partida dos padrões, indicados no item 3.1, págs. 64 e 65, cada uma na concentração 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções e as amostras de óleo foram diluídas com propanol (1:1, v/v) e após, injetadas. Utilizou-se como BGE uma solução de 40 mM KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v), que demonstrou ser o mais eficiente.

A identificação dos picos dos componentes naturais dos óleos foi executada por observação do aumento na intensidade dos mesmos ao adicionarem-se os padrões, e também por comparação do espectro obtido a partir do eletroferograma no tempo de migração de um analito com aquele obtido através de um espectrofotômetro para uma solução do padrão do mesmo analito, preparada no BGE.

3.3 REFERÊNCIAS

- ¹ Tomkins, R.P.T.; Popovych, O.; *Nonaqueous Solution Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1979.
- ² Sebastiano, R.; Gelfi, C.; Righetti, P.G.; Citterio, A.; *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 53.
- ³ Provencher, S.W.; *Agew. Makromol. Chem.* 1979, 180, 201.
- ⁴ Bond, A.M.; Lay, P.A.; *J. Electroanal. Chem.* 1986, 199, 285.
- ⁵ Daniele, S.; Baldo, M.A.; Bragato, C.; *Electrochem. Commun.* 1999, 1, 37.
- ⁶ Sebastiano, R.; Gelfi, C.; Righetti, P.G.; Citterio, A.; *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 71.
- ⁷ Verzola, B.; Sebastiano, R.; Righetti, P.G.; Gelfi, C.; Lapadula, M.; Citterio, A.; *Electrophoresis* 2003, 24, 121.
- ⁸ Sebastiano, R.; Lapadula, M.; Righetti, P.G.; Gelfi, C.; Citterio, A.; *Electrophoresis* 2003, 24, 4189.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FORMAÇÃO DA MICROEMULSÃO

A formação de microemulsões foi evidenciada através de sua transparência visual (Figura 4.1). Entre os co-surfactantes testados, produziram microemulsões na presença de SDS, óleo de soja e água, os álcoois 1-pentanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 2-pentanol, 1-octanol e ciclohexanol, tendo os dois primeiros formado as microemulsões mais estáveis.

De acordo com o que já foi mencionado, uma quantidade máxima de óleo na microemulsão é desejável, a fim de aumentar a sensibilidade do método analítico. A quantidade limite de óleo na microemulsão é cerca de 40 % da massa total, sendo que frações de óleo maiores levam à instabilidade termodinâmica, como será descrito na seqüência.

Diagramas de fase pseudo-ternários, como ilustrado na Figura 4.2, foram obtidos para as microemulsões preparadas com diversas misturas de água/óleo/surfactante contendo alternativamente 1-pentanol ou 3-metil-1-butanol como co-surfactante. Observou-se que o diagrama obtido depende da composição inicial do sistema.

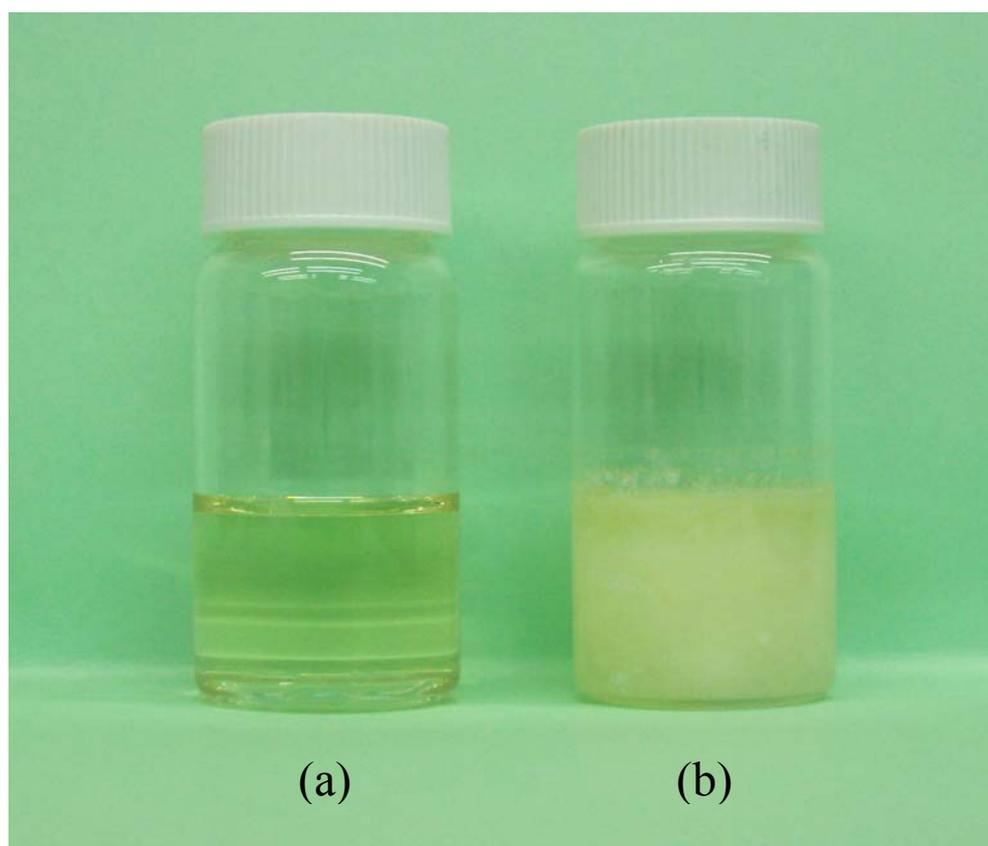
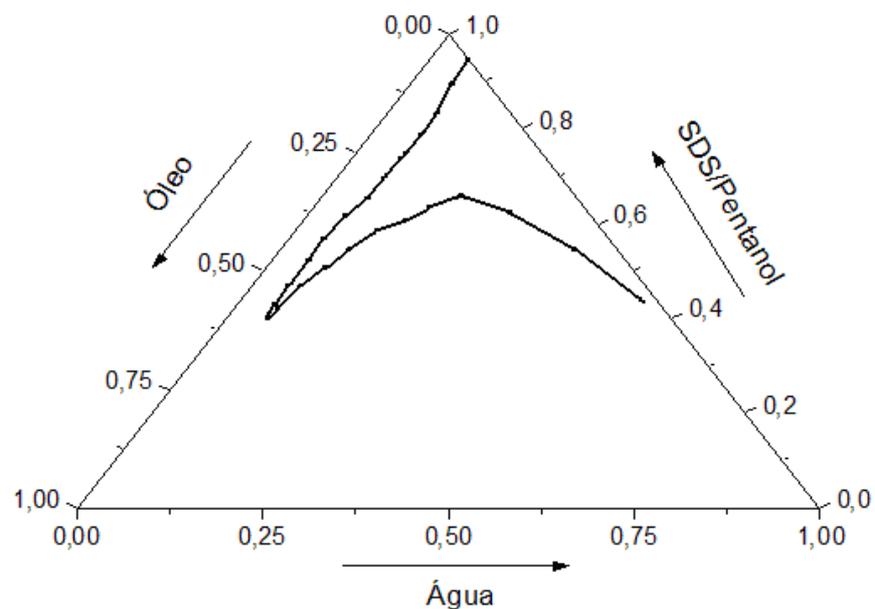
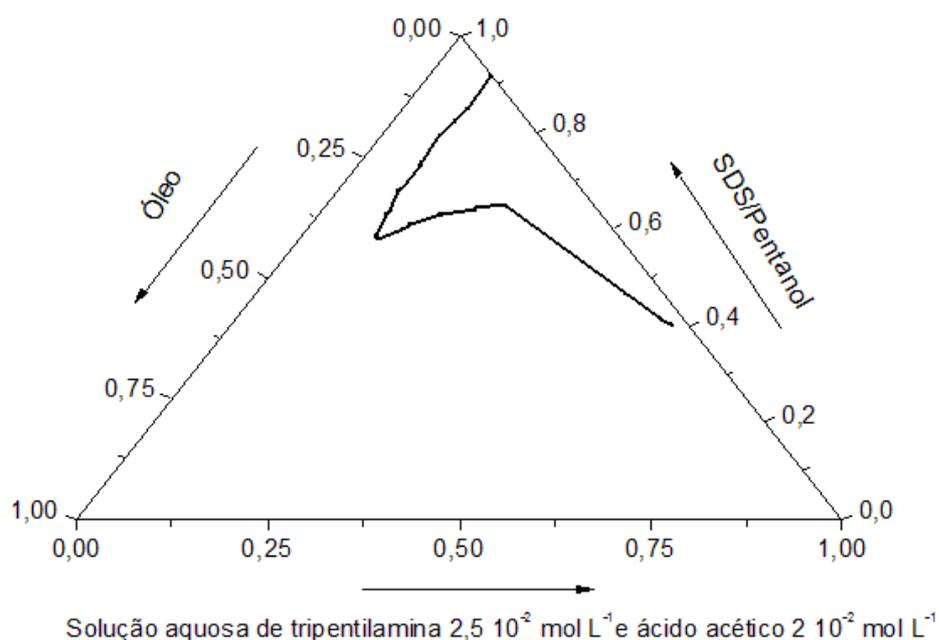


Figura 4.1 – Aparência dos sistemas compostos de óleo de soja, SDS e água, (a) contendo um co-surfactante e (b) na ausência de co-surfactante.



(a)



(b)

Figura 4.2 – Diagramas de fase pseudo-ternários das misturas de água/óleo/SDS e co-surfactante a 25 °C. A área delimitada indica o domínio da microemulsão. 1-pentanol, óleo de soja, SDS e água (a); 1-pentanol, óleo de soja, SDS e solução aquosa $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tripentilamina e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (b).

As composições das microemulsões escolhidas para as medidas experimentais estão localizadas na região próxima ao limite de estabilidade termodinâmica, tendo sido elaboradas as composições mostradas na Tabela II, entre as quais estão aquelas com as concentrações máxima e mínima de água capazes de formar microemulsões, mantida a proporção de 1:4 SDS:álcool.

Elaborou-se também o diagrama de fases na presença de sal para verificar a influência de um possível sistema de eletrólitos (que poderia ser empregado em medidas eletroquímicas ou de eletroforese capilar) na região de microemulsão formada por estes componentes. Assim, constatou-se que a região de microemulsão é ligeiramente reduzida pela presença dos eletrólitos (Figura 4.2 b).

A escolha de uma amina como eletrólito foi determinada considerando a afinidade desta pela fase orgânica. Para definir qual seria a amina empregada, analisaram-se os valores de condutividade obtidos para uma microemulsão contendo $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (necessário para protonar a amina) e $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de uma amina, realizando-se estes ensaios com 15 aminas (primárias, secundárias e terciárias). Os valores de condutividade obtidos variaram entre 37 e $43,9 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente para uma amina primária (heptilamina) e para uma terciária (tripentilamina). Por conferir maior condutividade ao meio, tripentilamina foi selecionada para a realização dos ensaios.

Tabela II – Composição das microemulsões de w/o obtidas variando-se o conteúdo de água, para 1-pentanol e 3-metil-1-butanol como co-surfactante

Álcool empregado	% Óleo	% Álcool	% SDS	% Água
Pentanol	40,5	43,6	10,9	5,0
Pentanol	40,0	43,2	10,8	6,0
Pentanol	39,7	42,1	10,7	7,5
3-metil-1-butanol	40,3	43,3	10,8	5,5
3-metil-1-butanol	40,0	43,2	10,8	6,0
3-metil-1-butanol	39,7	42,1	10,7	7,5

Por variação do conteúdo de água da microemulsão, observou-se que sua estabilidade termodinâmica só é mantida na faixa compreendida entre 5,0 % de água para a microemulsão preparada com 1-pentanol e de 5,5 % para a microemulsão preparada com 3-metil-1-butanol, até 7,5 % de água para ambas.

4.2 ESTUDOS DA ESTABILIDADE TERMODINÂMICA

Considerando que as melhores razões surfactante:co-surfactante para pentanol e 3-metil-1-butanol situaram-se entre 1:3 e 1:4, enquanto que para o 1-hexanol situou-se entre 1:4 e 1:5, as razões intermediárias foram preparadas e avaliadas quanto à estabilidade termodinâmica, detectando-se o ponto de turbidez frente a variações de temperatura e concentração de sal adicionado à microemulsão.

4.2.1 Temperatura de turbidez

Microemulsões de água em óleo de soja perdem sua estabilidade a baixas temperaturas. As Figuras 4.3 a, b e c mostram, respectivamente, as temperaturas de turbidez, determinadas visualmente, para as microemulsões preparadas com 1-pentanol ou 3-metil-1-butanol ou 1-hexanol. Todas as microemulsões são estáveis até 70 °C, entretanto, temperaturas abaixo de 18 °C levam à instabilidade a microemulsão preparada com o 1-hexanol, enquanto que temperaturas abaixo de cerca de 10 °C induzem instabilidade nas microemulsões preparadas com 1-pentanol e 3-metil-1-butanol. Como pode ser visto nas Figuras 4.3 a e b, as microemulsões preparadas com 3-metil-1-butanol e 1-pentanol na razão de 1:4 [SDS]:[álcool] apresentam um comportamento similar, sendo suas temperaturas de turbidez iguais a 9 °C.

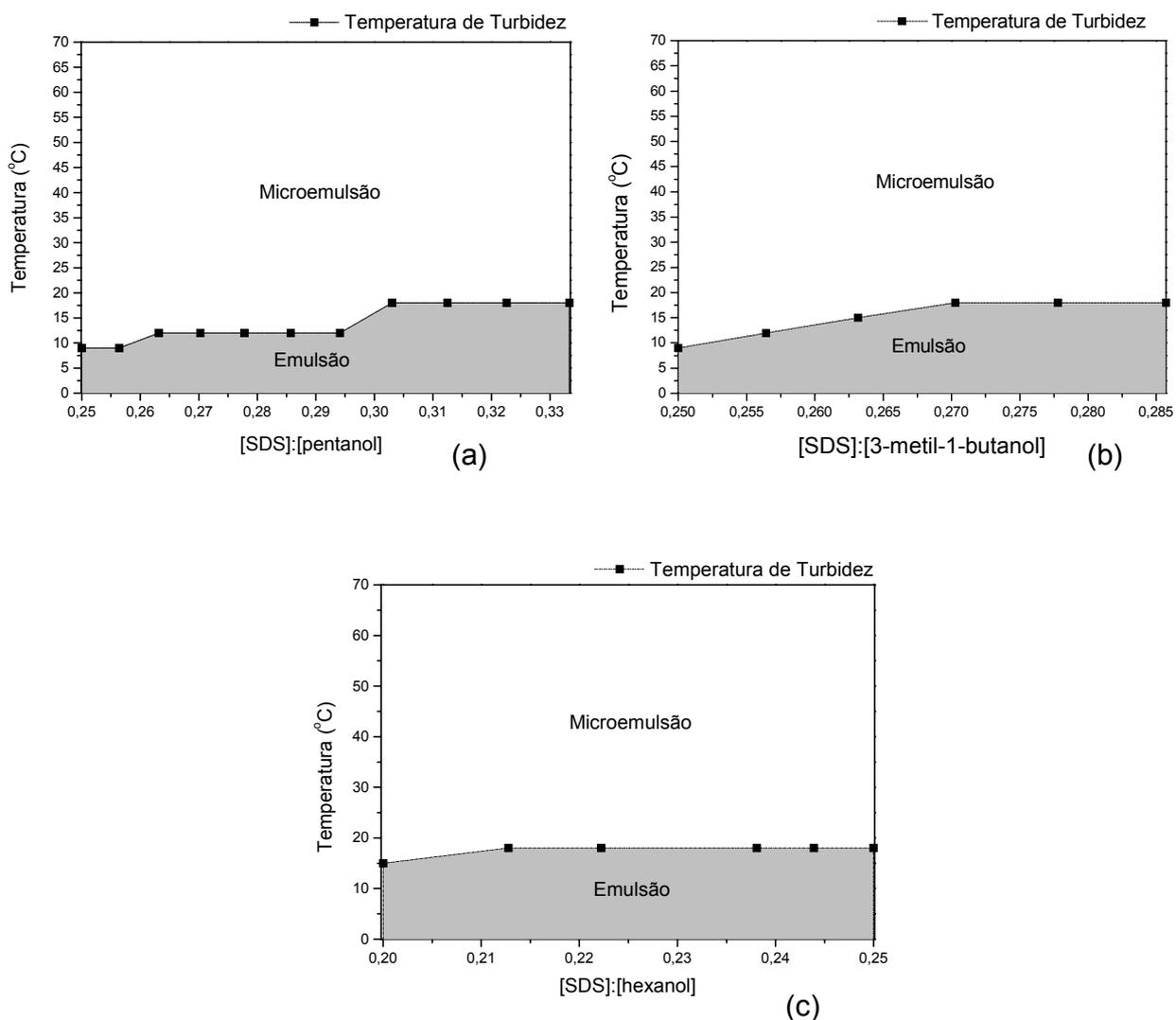


Figura 4.3 – Temperatura de turbidez das microemulsões preparadas com pentanol (a), com 3-metil-1-butanol (b) e com hexanol (c), para diversas proporções em massa de surfactante e álcool.

4.2.2 Adição de sal

O estudo da estabilidade das microemulsões frente a concentrações crescentes de tetraborato de sódio mostrou que as microemulsões preparadas com 1-pentanol, nas proporções de 1:3,0; 1:3,5; 1:3,7 e 1:4,0 SDS:álcool, são estáveis à presença de tetraborato de sódio na concentração máxima de $6,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto que aquelas preparadas com 3-metil-1-butanol mostraram diferenças quanto à estabilidade segundo a proporção do co-surfactante, sendo tanto maior a estabilidade quanto maior a proporção de álcool na

microemulsão, conforme mostrado na Tabela III. Quando 1-hexanol foi empregado como co-surfactante, nas proporções de 1:4 e 1:5 (SDS:álcool), a concentração máxima de tetraborato de sódio suportada pelo sistema foi de $7,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, sendo portanto o co-surfactante que proporcionou a maior estabilidade à microemulsão frente à concentração deste sal.

Tabela III – Estabilidade das microemulsões preparadas com 3-metil-1-butanol como co-surfactante, em diferentes proporções de surfactante:co-surfactante, frente a concentrações crescentes de tetraborato de sódio

Proporção SDS:3-metil-1-butanol	Concentração máxima de tetraborato de sódio que não desestabiliza a microemulsão (mol L^{-1})
1:3,0	$4,5 \cdot 10^{-2}$
1:3,5	$5,5 \cdot 10^{-2}$
1:3,7	$5,5 \cdot 10^{-2}$
1:4,0	$6,0 \cdot 10^{-2}$

Os resultados dos estudos de estabilidade mostraram que a estabilidade diminui com a redução da proporção de co-surfactante na microemulsão, e que de um modo geral, esta é maior quando pentanol é usado como co-surfactante. Assim, a composição mais estável é a que apresenta a razão 1:4 [SDS]:[álcool] (40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, m/m). Entretanto, nesta composição, a microemulsão preparada com pentanol é apenas ligeiramente mais estável do que aquela preparada com 3-metil-1-butanol. Por esta razão, estes dois sistemas foram escolhidos para executar as medidas eletroquímicas e por espalhamento de luz e todos os resultados reportados referem-se a eles, a menos que indicado de outra forma.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES COM PROPORÇÕES VARIADAS DE SURFACTANTE:CO-SURFACTANTE

Os resultados obtidos na caracterização físico-química destas microemulsões estão mostrados na Tabela IV, onde se verifica que, para a microemulsão preparada com 1-pentanol, à medida que a proporção deste co-surfactante aumenta, até a proporção de 1:3,7 m/m, o raio hidrodinâmico (R_h) das gotículas tende a tornar-se menor, enquanto que para os outros dois co-surfactantes testados, observa-se o efeito inverso, contudo, sem mostrar alterações expressivas nos valores obtidos.

Considerando que 1-pentanol, entre os três álcoois estudados, é o que apresenta maior solubilidade em água (1-pentanol 27,0; 3-metil-1-butanol 25,0 e 1-hexanol 5,8 g L⁻¹),^{1,2} é possível que o aumento de sua concentração no meio, possibilite a formação de um maior número de gotículas de água microemulsionadas, conseqüentemente, gotículas de menor tamanho, já que o conteúdo de água permanece constante. Este efeito não se produz em igual dimensão quando 3-metil-1-butanol é utilizado, provavelmente, por influência de sua estrutura molecular. Neste caso, efeitos estéricos na camada que constitui a interface água/óleo também devem ser considerados.

Para microemulsões preparadas, respectivamente, com a mesma quantidade de pentanol ou 3-metil-1-butanol, a quantidade do último dissolvida na região interfacial é provavelmente menor que no caso do pentanol, devido à terminação da cadeia ser mais volumosa. Desta forma, a concentração de 3-metil-1-butanol na fase oleosa, deve ser maior para a microemulsão contendo este álcool, fato que leva a um decréscimo nas dimensões do núcleo aquoso.³

Tabela IV – Dados da caracterização físico-química das microemulsões de água em óleo com diferentes co-surfactantes e razões surfactante:co-surfactante, contendo 6 % de água e 40 % de óleo.

[SDS]:[álcool]	Rh* (nm±σ)	Índice de refração	Viscosidade (cP±σ)	Condutividade (μS cm ⁻¹)
1:3,0 P	4,9±0,2	1,440	13,8±0,3	36,2
1:3,5 P	4,8±0,2	1,438	14,3±0,4	33,0
1:3,7 P	4,1±0,2	1,436	14,0±0,4	31,8
1:4,0 P	4,3±0,2	1,436	14,7±0,4	30,3
1:3,5 MB	3,0±0,1	1,435	14,1±0,1	28,8
1:3,7 MB	3,2±0,1	1,435	14,0±0,1	25,0
1:4,0 MB	3,2±0,1	1,435	14,1±0,1	21,9
1:4,0 H	3,6±0,2	1,440	15,4±0,3	10,9
1:5,0 H	4,0±0,2	1,437	14,0±0,3	9,6

P = 1-pentanol MB = 3-metil-1-butanol H = 1-hexanol

* Rh = raio hidrodinâmico, determinado por medidas de DLS.

Em relação ao índice de refração, as variações também foram pequenas e, exceto quando o 3-metil-1-butanol foi empregado, caso em que não se verificaram variações dos valores obtidos, observou-se uma tendência de diminuição do índice de refração com o aumento da proporção de co-surfactante na microemulsão, fato que se explica em função do índice de refração dos álcoois ser menor do que o do óleo de soja (1-pentanol 1,4093; 3-metil-1-butanol 1,4061; 1-hexanol 1,4179² e óleo de soja 1,475).

Quanto à viscosidade, os resultados mostraram que a variação da proporção de álcool na microemulsão, dentro da faixa avaliada neste estudo, não afetou expressivamente a mesma, não se verificando alguma tendência nos resultados. No entanto, em igual proporção de SDS:álcool, a microemulsão preparada com hexanol mostrou o maior valor de viscosidade, já que este é o mais viscoso dos álcoois utilizados (4,578 cP), sendo que 1-pentanol e 3-metil-1-butanol mostram viscosidades muito similares (3,619 e 3,692 cP, respectivamente).^{1,2}

O valor do índice de refração das microemulsões é levemente menor que o do óleo de soja ($\eta_{\text{óleo de soja}} = 1,475$), enquanto que o valor da viscosidade, como esperado, mostrou um expressivo decréscimo ($\eta_{\text{óleo de soja}} = 52,0$ cP), na temperatura de 25 °C.

Os dados de condutividade da Tabela IV mostraram que as microemulsões preparadas com 1-pentanol são mais condutoras, seguidas por aquelas preparadas com 3-metil-1-butanol, sendo que as microemulsões preparadas com 1-hexanol apresentaram os mais baixos valores de condutividade, cerca de três vezes menores do que as primeiras. Acredita-se que a maior condutividade da microemulsão preparada com 1-pentanol deva-se, especialmente em relação ao 1-hexanol, à menor viscosidade e também à maior solubilidade em água do 1-pentanol. Este fato favoreceria a existência de percolação da fase aquosa através da fase contínua oleosa, sendo este efeito responsável pelo aumento na condutividade. Mesmo que de forma sutil, verificou-se algum grau de percolação neste sistema (ainda que na ausência de óleo de soja). Estes dados serão discutidos mais adiante (ver item 4.6.1.), juntamente com a influência do raio hidrodinâmico e de outros fatores na condutividade, em microemulsões com igual proporção surfactante/co-surfactante,

4.4 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

A técnica de espalhamento de luz dinâmico é uma excelente ferramenta para explorar as nanoestruturas encontradas nas microemulsões, pois esta não perturba o equilíbrio do sistema e nem produz risco de inserir artefatos, como pode acontecer, por exemplo, com a microscopia eletrônica de crio-transmissão, e é mais sensível a mudanças estruturais que as técnicas de espalhamento de luz elásticas, como por exemplo, espalhamento de neutrons a baixo ângulo.⁴

Neste estudo, a técnica de espalhamento de luz dinâmico foi utilizada para determinar o tamanho das gotículas na microemulsão (R_h), obter o coeficiente de difusão das mesmas, bem como, para proporcionar informações úteis na elucidação do comportamento eletroquímico destes sistemas.

A Figura 4.4 mostra as funções de correlação mediadas no tempo as quais foram bem ajustadas por uma exponencial simples para as microemulsões contendo 3-

metil-1-butanol ou pentanol como co-surfactante.

Usando o programa CONTIN, observou-se uma estreita distribuição de tamanho de partícula. Este fato, confirmado pelo ajuste exponencial simples da função de correlação, mostra que estas microemulsões são sistemas monodispersos.

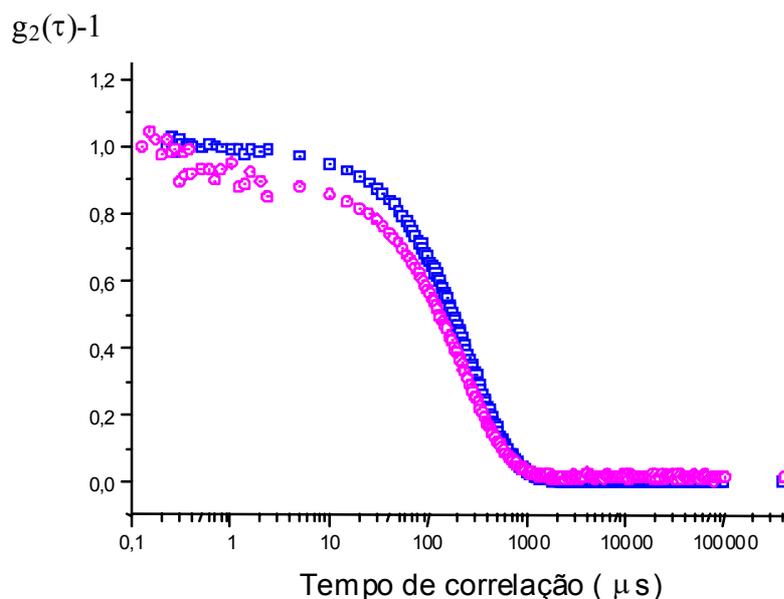


Figura 4.4 – Funções de correlação de intensidade mediada no tempo para as microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, (\square) com pentanol, (\circ) com 3-metil-1-butanol, em ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$. $T = 25^\circ C$.

As funções de correlação de intensidade mediada no tempo obtidas para a microemulsão contendo pentanol, na temperatura de $25^\circ C$, em função do ângulo de medida, estão apresentadas na Figura 4.5.

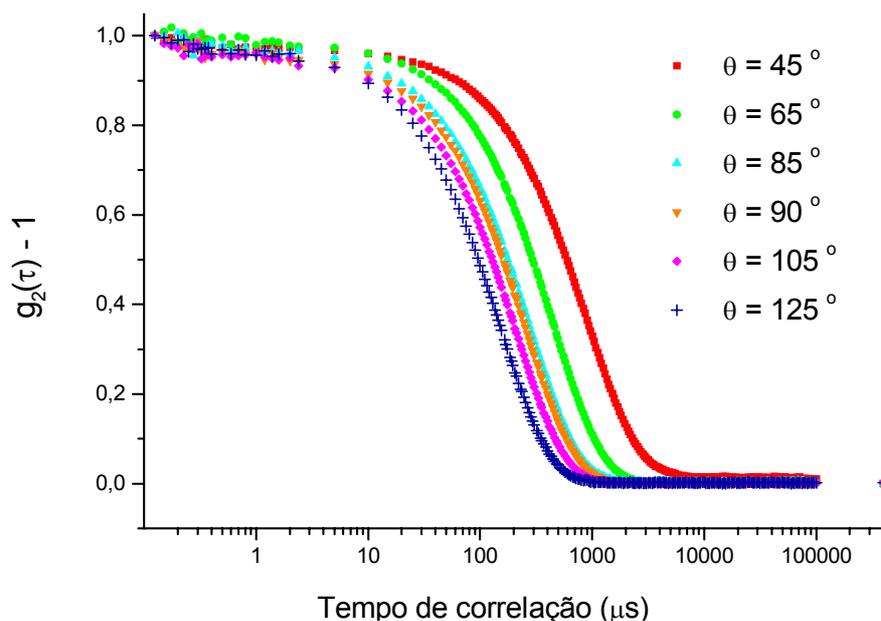


Figura 4.5 – Função de correlação de intensidade mediada no tempo para a microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, com dependência angular.

Pode-se verificar na Figura 4.5 que à medida que aumenta o ângulo, diminui o tempo de correlação, o que corresponde ao comportamento usualmente observado em sistemas nos quais as flutuações na intensidade da luz espalhada apresentam uma distribuição gaussiana.

O raio hidrodinâmico (R_h) obtido pelo programa CONTIN informa o tamanho das gotículas de água na microemulsão. Os valores médios de R_h para as microemulsões preparadas com 3-metil-1-butanol ou pentanol nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C, estão apresentados na Tabela V. Estes resultados mostram que o R_h aumenta com o conteúdo de água na microemulsão, sendo este aumento mais acentuado quando pentanol é utilizado.

Tabela V – Raio hidrodinâmico (Rh) médio das microemulsões compostas de diferentes proporções de óleo de soja, SDS, pentanol ou 3-metil-1-butanol e água, em função da temperatura.

Álcool	% de água	Rh (nm \pm σ)		
		T = 25 °C	T = 40 °C	T = 60 °C
Pentanol ¹	5,0	2,4 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1
Pentanol ²	6,0	4,3 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	1,9 \pm 0,2
Pentanol ³	7,5	9,1 \pm 0,3	3,8 \pm 0,2	2,4 \pm 0,1
3-metil-1-butanol ⁴	5,5	2,7 \pm 0,3	2,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2
3-metil-1-butanol ²	6,0	3,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2
3-metil-1-butanol ³	7,5	6,2 \pm 0,8	3,7 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1

¹ 40,5 % óleo, 43,6 % de álcool, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água;

² 40,0 % óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6 % de água;

³ 39,7 % óleo, 42,1 % de álcool, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água;

⁴ 40,3 % óleo, 43,3 % de álcool, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água.

Considerando o pequeno raio das partículas (menor que 9 nm), o comportamento esperado é o raio não depender do ângulo. Somente à temperatura ambiente o raio hidrodinâmico das gotículas na microemulsão preparada com 3-metil-1-butanol é menor que aquele da microemulsão preparada com pentanol. Nas temperaturas de 40 °C e 60 °C, o raio das gotículas mostra os mesmos valores, dentro do erro experimental, para ambos co-surfactantes.

Entretanto, os resultados não evidenciam que os efeitos estéricos perdem importância quando a temperatura aumenta, porque as diferenças entre os raios hidrodinâmicos pode estar mascarada pelo fato de que os valores obtidos encontram-se no limite de precisão da técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Os valores de Rh não mostraram mudanças expressivas com a variação do ângulo de espalhamento (Figuras 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11). Especialmente para as gotículas de menor tamanho, à medida que a fração de água na microemulsão diminui, as gotículas tornam-se muito pequenas, e como já foi mencionado os valores obtidos se aproximam muito do limite de detecção da técnica utilizada, fato que pode ser responsável

pelas variações apresentadas. Verifica-se, ainda, que com o aumento da temperatura, as gotículas de água tornam-se menores e apresentam movimento mais rápido.

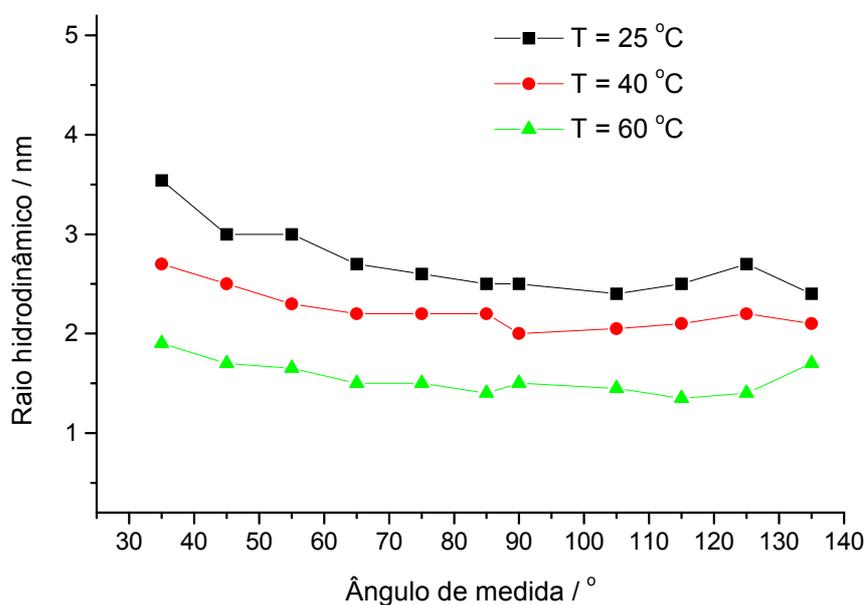


Figura 4.6 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,3 % óleo, 43,3 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

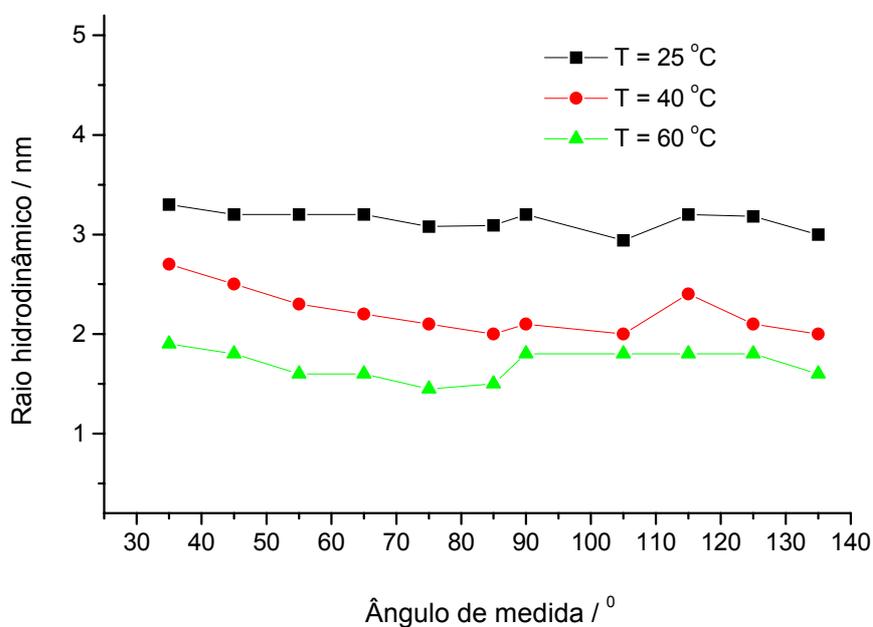


Figura 4.7 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,0 % óleo, 43,2 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

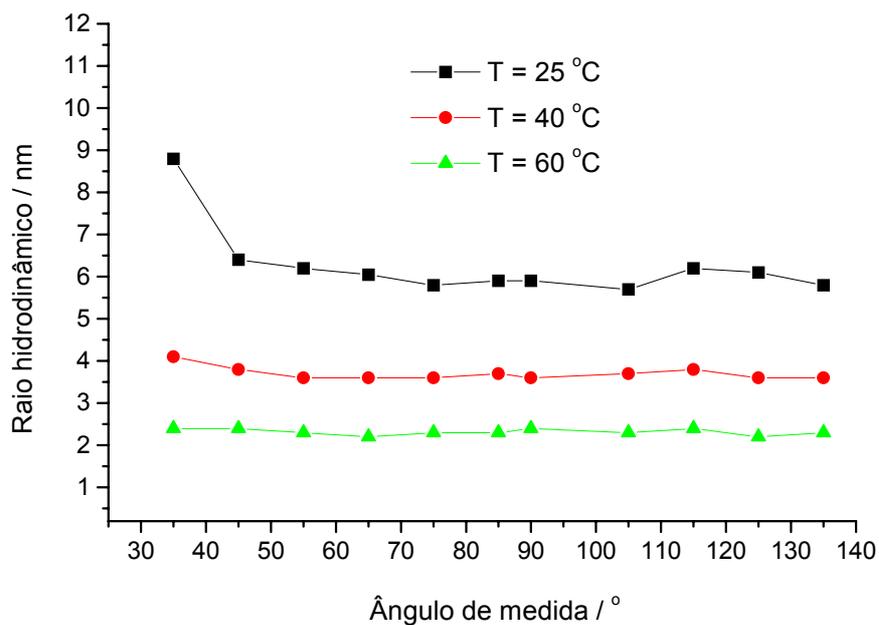


Figura 4.8 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 39,7 % óleo, 42,1 % de 3-metil-1-butanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

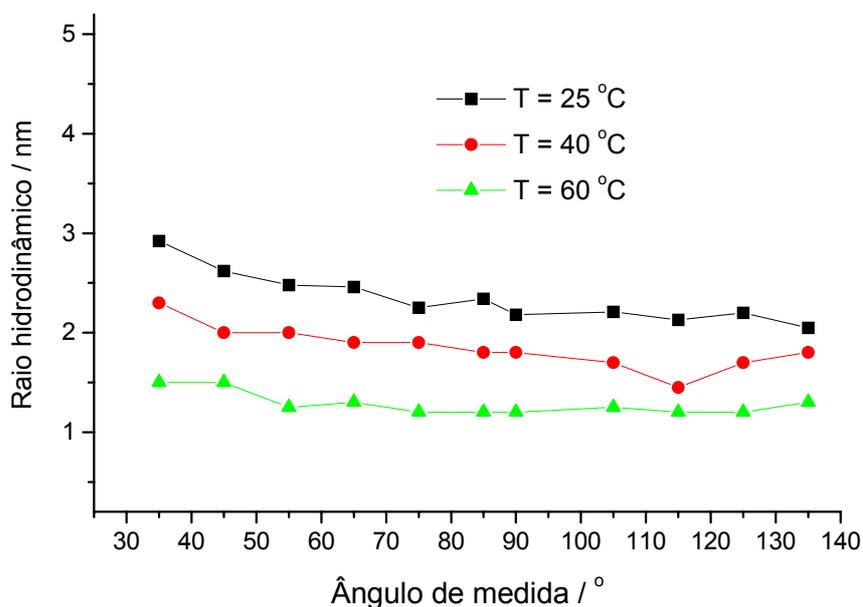


Figura 4.9 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,5 % óleo, 43,6 % de pentanol, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

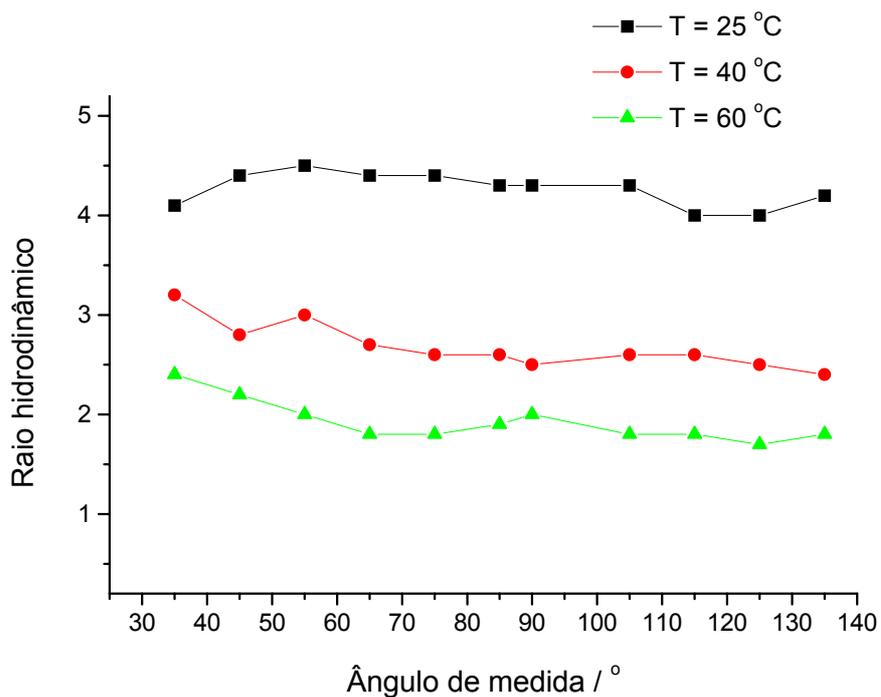


Figura 4.10 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 40,0 % óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

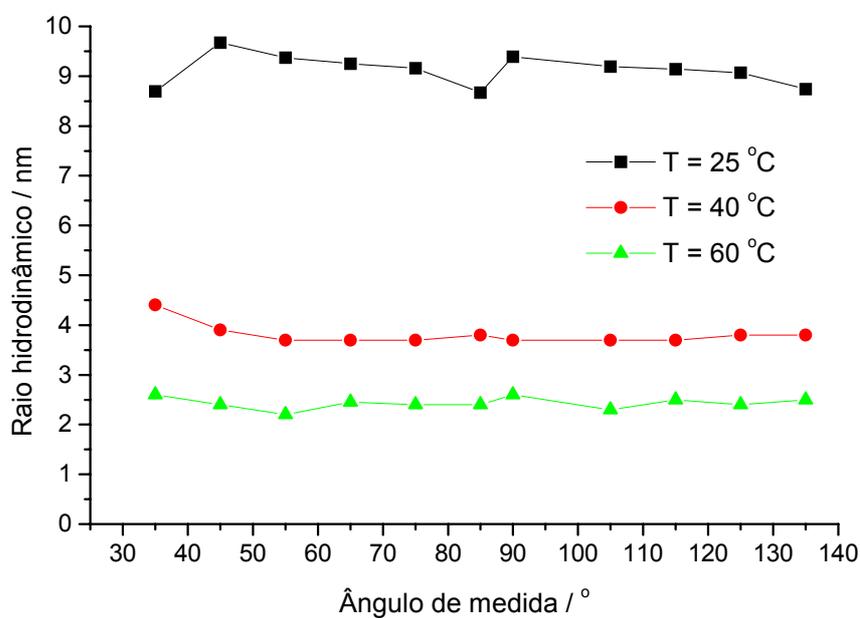


Figura 4.11 – Relação do raio hidrodinâmico com o ângulo de medida para a microemulsão contendo 39,7 % óleo, 42,1 % de pentanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água, nas temperaturas de 25, 40 e 60 °C.

4.4.1 Coeficiente de difusão translacional

As medidas da taxa de relaxação como uma função do quadrado do vetor de espalhamento permitiram a determinação do coeficiente de difusão das gotículas de água na microemulsão ($D_{w/o}$), sendo os valores obtidos respectivamente $6,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, empregando-se 3-metil-1-butanol e $5,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, empregando-se pentanol (Tabela VI). Os resultados mostraram que a difusão das gotículas é puramente translacional, ou seja, não existe influência de movimento rotacional (Figura 4.12, a e b), visto que as retas passam pela origem, dentro do erro experimental.

Considerando que um dos objetivos deste estudo foi executar medidas eletroquímicas em microemulsão de água em óleo de soja, adicionou-se ferroceno a este meio a fim de avaliar sua influência nos valores de $D_{w/o}$ obtidos por espalhamento de luz dinâmico. Como o ferroceno dissolve-se preferencialmente na fase oleosa e como se trata de uma molécula pequena em relação ao tamanho das gotículas nem sua presença ou sua concentração afetaram expressivamente os valores de $D_{w/o}$, os pequenos desvios observados nos valores da Tabela V foram atribuídos a erros experimentais.

Tabela VI – Valores do coeficiente de difusão ($D_{w/o}$) obtidos através das medidas de espalhamento de luz dinâmico para a microemulsão com 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água

Microemulsão	$D_{w/o} \text{ (cm}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$			
	Sem Fc*	$10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fc}$	$3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fc}$	$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ Fc}$
w/o – pentanol	$5,4 \cdot 10^{-8}$	$5,0 \cdot 10^{-8}$	$5,0 \cdot 10^{-8}$	$5,8 \cdot 10^{-8}$
w/o – 3-metil-1-butanol	$6,6 \cdot 10^{-8}$	$6,9 \cdot 10^{-8}$	$6,6 \cdot 10^{-8}$	$6,3 \cdot 10^{-8}$

*Fc = ferroceno

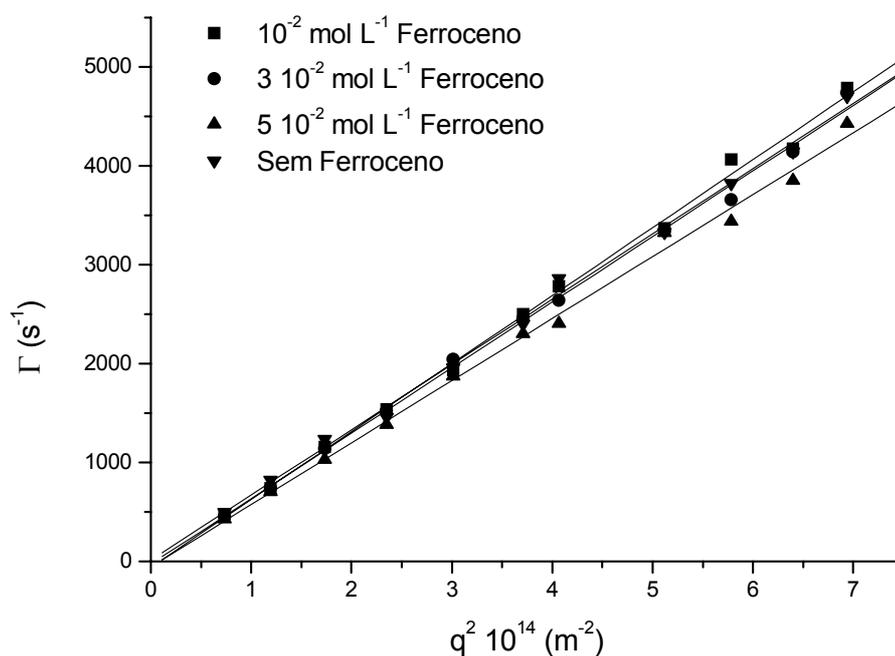
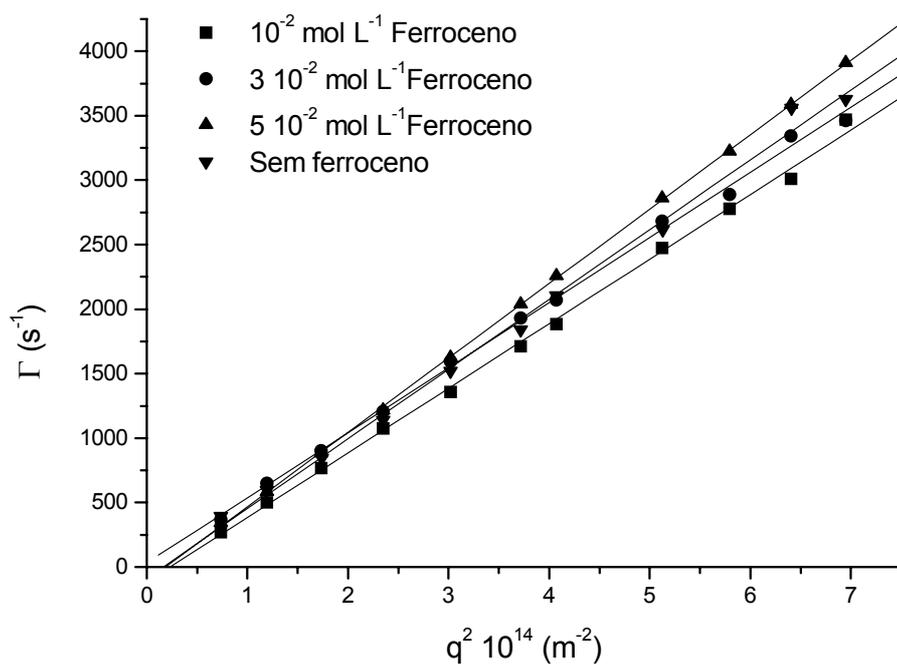


Figura 4.12 – Relação entre a taxa de relaxação (Γ) e o quadrado do vetor de espalhamento (q^2), para as microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6 % de água, (a) pentanol, (b) 3-metil-1-butanol. T = 25 °C.

A variação do coeficiente de difusão das gotículas de água com a temperatura normalizada em relação a viscosidade da microemulsão preparada com 3-metil-1-butanol está representada na Figura 4.13. O gráfico de $D_{w/o}$ versus a razão temperatura/viscosidade (T/η) produziu uma linha reta; apesar da incerteza relativamente grande, introduzida pela pequena faixa de temperatura experimentalmente acessível, a linearidade deste gráfico indica que as gotículas mantêm-se estáveis com o aumento da temperatura.

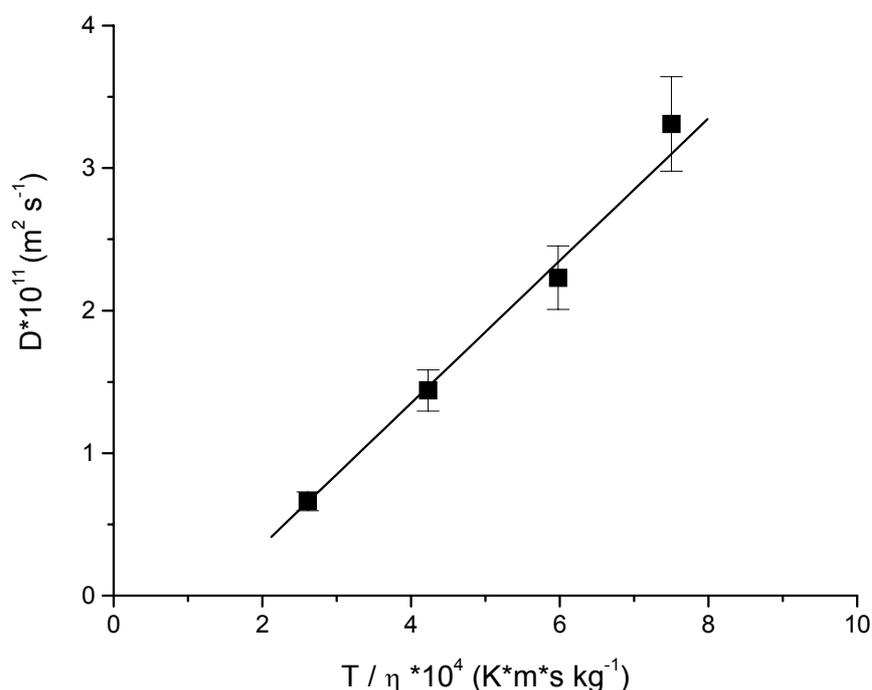


Figura 4.13 – Coeficiente de difusão translacional, D ($m^2 \cdot s^{-1}$) em função da relação temperatura absoluta sobre viscosidade, T/η ($K \cdot m \cdot s \cdot kg^{-1}$) para a composição com 40,0% de óleo, 43,2% de 3-metil-1-butanol, 10,8% de SDS e 6,0% de água.

As distribuições dos tempos de correlação como função da taxa de relaxação para diferentes conteúdos de água a 25 °C podem ser vistas na Figura 4.14 a e b, enquanto que as varianças relativas a estas distribuições podem ser observadas na Tabela VII. Para ambos co-surfactantes as distribuições são deslocadas para taxas de relaxação menores e os picos tornam-se mais estreitos quando o conteúdo de água na microemulsão aumenta. Em outras condições experimentais não há uma tendência clara. Para uma microemulsão de

octano/AOT/água, já foi descrito um decréscimo da polidispersão com o aumento do conteúdo de água.⁵

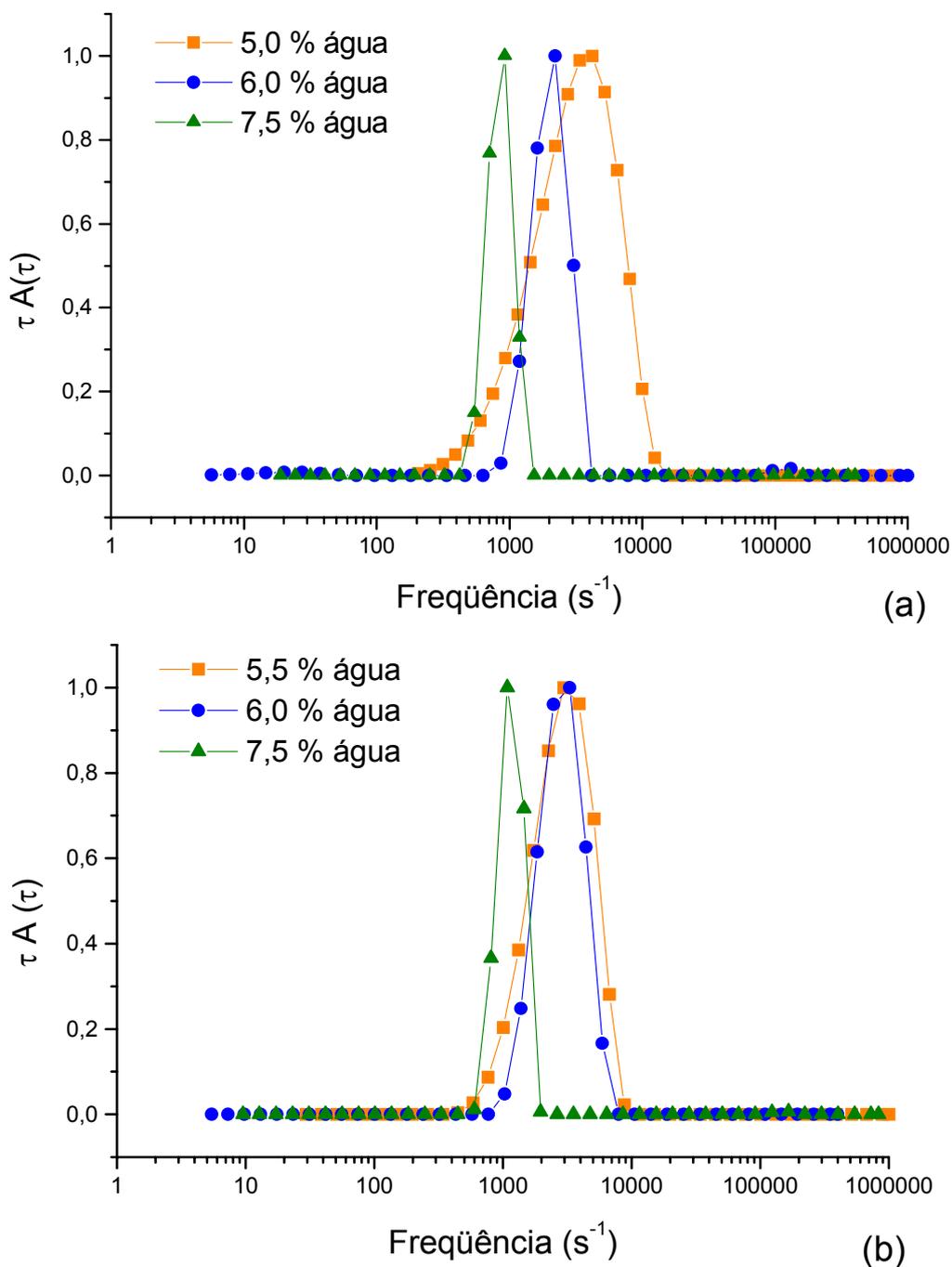


Figura 4.14 – Distribuição normalizada dos tempos de correlação como função da frequência (s^{-1}) para microemulsões com vários conteúdos de água à temperatura de 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°. (a) pentanol; (b) 3-metil-1-butanol.

Tabela VII – Variâncias das distribuições dos tempos de relaxação (CONTIN) para vários conteúdos de água e temperaturas. Ângulo de espalhamento: 90°

Conteúdo de água e co-surfatante	T = 25 °C	T = 40 °C	T = 60 °C
5% - pentanol	0,39	0,04	0,06
6% - pentanol	0,03	0,19	0,10
7,5% - pentanol	0,02	0,13	0,06
5% - 3-metil-1-butanol	0,22	0,25	0,29
6% - 3-metil-1-butanol	0,11	0,19	0,06
7,5% - 3-metil-1-butanol	0,02	0,07	0,10

A Figura 4.15 a e b mostra as distribuições do tempo de correlação como função da taxa de relaxação a diferentes temperaturas, para microemulsões preparadas com pentanol ou 3-metil-1-butanol contendo igual percentagem de água. À medida que a temperatura aumenta, as distribuições são deslocadas para taxas de relaxação mais altas, significando que o raio hidrodinâmico das gotículas torna-se cada vez menor.

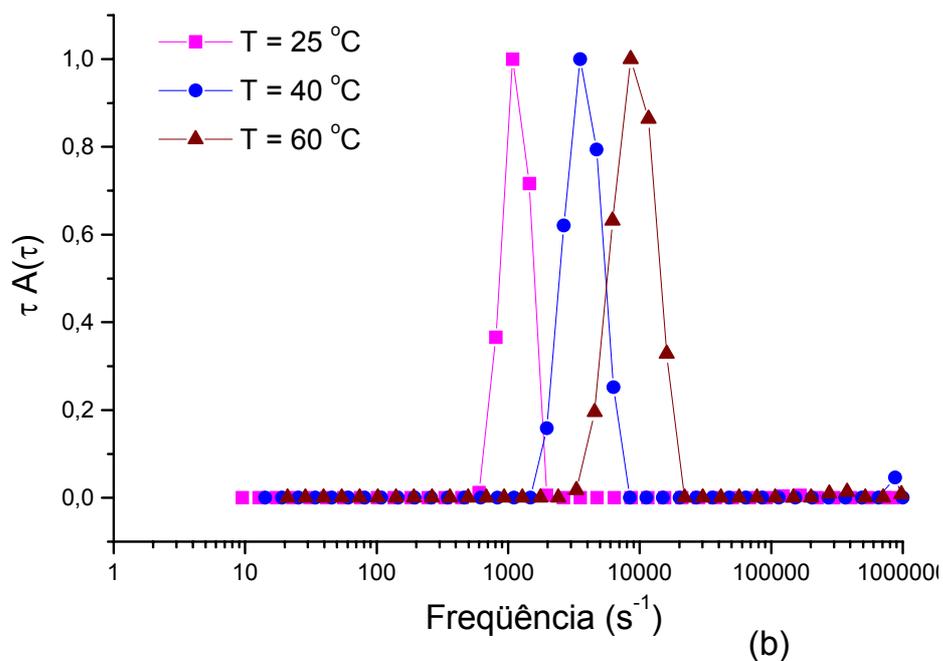
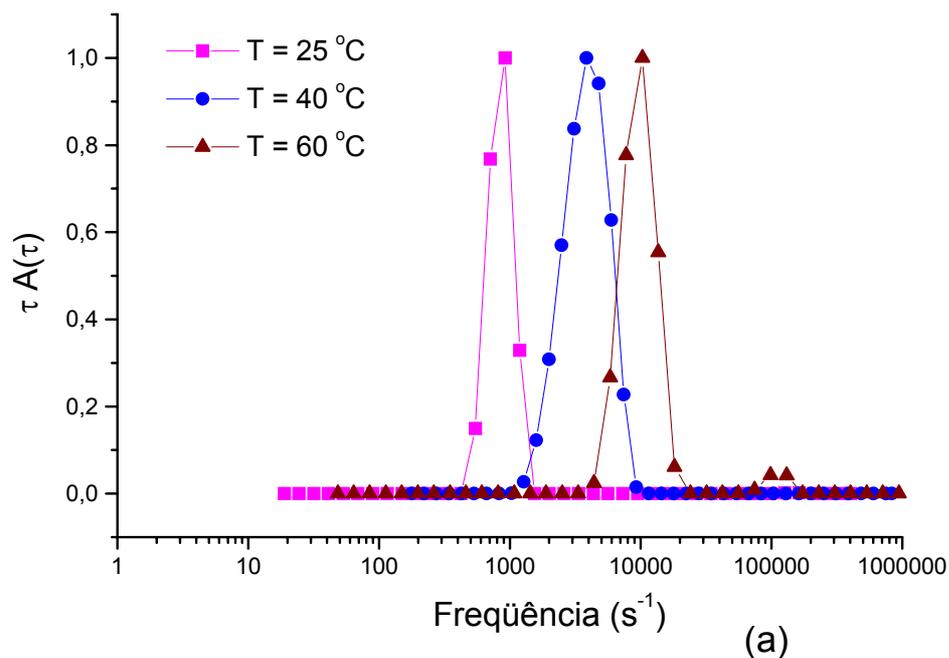


Figura 4.15 – Distribuições normalizadas do tempo de correlação como função da frequência (s^{-1}), para uma microemulsão com 7,5% de água, em várias temperaturas, a ângulo de espalhamento de 90° , contendo como co-surfactante: pentanol (a); 3-metil-1-butanol (b).

4.5 ABSORÇÃO MOLECULAR

Medidas de absorção molecular foram executadas na faixa de 400 a 800 nm, estas

indicaram que o óleo de soja e as microemulsões absorvem luz abaixo de 450 nm, enquanto que as microemulsões contendo $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno absorvem na região de 400 a 530 nm com um pico máximo de absorção a 480 nm. Assim, não existe interferência nos resultados de espalhamento de luz dinâmico por absorção de luz a 633 nm, que é o comprimento de onda empregado para estas medidas (Figura 4.16).

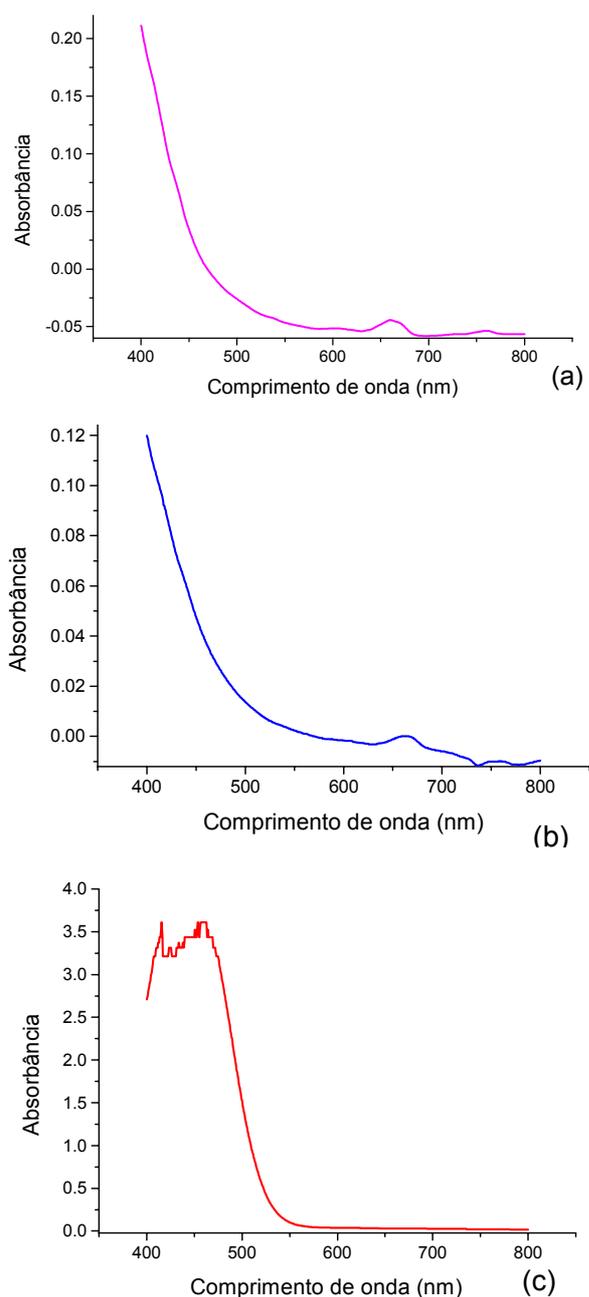


Figura 4.16 - Espectro de UV-visível do óleo (a); da microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS, 6,0 % de água, sem ferroceno (b) e com $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno (c).

4.6 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Os métodos eletroquímicos de análise por sua rapidez, baixo custo e sensibilidade tornam-se importantes instrumentos na química analítica. O emprego destes métodos para análise direta de óleos vegetais vem associado ao uso de solventes orgânicos, em geral tóxicos, assim, o preparo da amostra sob a forma de uma microemulsão constitui-se em uma alternativa viável e promissora.

4.6.1 Condutividade elétrica

Os valores de condutividade em função da temperatura e do conteúdo de água nas micromulsões são mostrados na Figura 4.17.

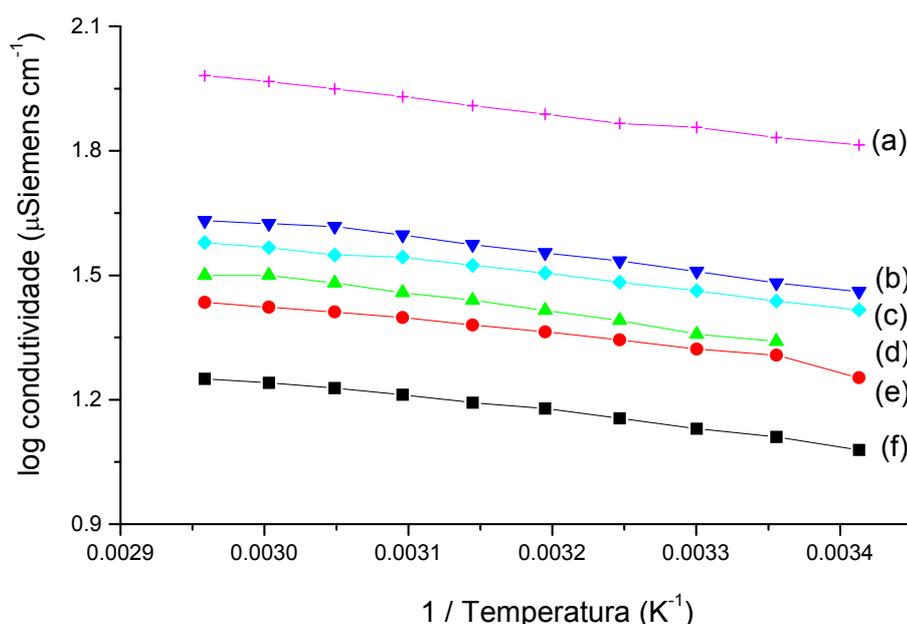


Figura 4.17 – Valores de condutividade para diferentes composições de microemulsões em função da temperatura. **a)** 39,7 % óleo, 42,1 % de pentanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água; **b)** água.40,0 % óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água; **c)** 39,7 % óleo, 42,1 % de 3-metil-1-butanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água; **d)** água.40,0 % óleo, 43,2 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 6 % de água; **e)** 40,5 % óleo, 43,6 % de pentanol, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água; **f)** 40,3 % óleo, 43,3 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água.

Observa-se que a condutividade se eleva com o aumento do teor de água na microemulsão, e também com a temperatura. Não foi verificada uma transição de percolação, isto é, um aumento brusco de condutividade em mais de duas ordens de magnitude com a elevação da temperatura.^{6, 7} Para as microemulsões com diferentes co-surfactantes e igual teor de água, observa-se também, que a condutividade daquela preparada com 3-metil-1-butanol é menor do que a preparada com pentanol.

De acordo com o modelo de flutuações de cargas das gotículas na microemulsão,⁷⁻¹¹ pode-se descrever a condutividade de uma microemulsão de w/o em condições de eletroneutralidade. Neste modelo, as gotículas tornam-se carregadas devido a flutuações espontâneas no número de contra-íons que residem no interior das mesmas, os quais são trocados entre as cabeças carregadas do surfactante na interface óleo-água. A magnitude destas flutuações está diretamente relacionada à energia que é requerida para carregar a gotícula. A condutividade é proporcional ao número de partículas condutoras por unidade de volume e a temperatura, e inversamente proporcional à viscosidade do solvente, de acordo com a seguinte expressão:

$$\kappa = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon k T}{2 \pi \eta} \frac{\varphi}{r^3} \quad (4.1)$$

onde κ é a condutividade, ε_0 é a constante dielétrica no vácuo, ε é a constante dielétrica do solvente, k é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente, T é a temperatura, φ é a fração volumétrica das gotículas e r é o raio.

A diferença na condutividade das microemulsões preparadas com pentanol ou 3-metil-1-butanol e SDS não deve estar ligada à viscosidade, já que as correspondentes emulsões (sistema contendo somente água, óleo e álcool) e também as microemulsões, mostraram valores muito similares de viscosidade. Por outro lado, a densidade de distribuição dos contra-íons dentro das gotículas é determinada pelo grau de dissociação do surfactante iônico.⁹ Para muitos surfactantes o grau de ionização das micelas em água muda por adição de um álcool.^{12 - 14} Assim, a mais baixa condutividade da microemulsão preparada com 3-metil-1-butanol com relação ao pentanol como co-surfactante, pode estar relacionada também ao baixo grau de ionização do surfactante SDS, levando a um menor número de gotículas carregadas.

Ainda, considerando que o raio hidrodinâmico da microemulsão preparada com 3-metil-1-butanol é menor do que o apresentado pela microemulsão com pentanol, para o mesmo teor de água, seria de se esperar que N fosse maior para a microemulsão contendo 3-metil-1-butanol. No entanto, verificou-se que a condutividade da microemulsão com 3-metil-1-butanol é menor do que no caso do isômero pentanol. Este fato leva à hipótese de que nem toda a água presente neste sistema esteja inserida nas gotículas significando que parte da água poderia estar dissolvida com o 3-metil-1-butanol na fase oleosa.

Com a intenção de obter subsídios que fundamentem a interpretação para as diferenças de condutividade observadas entre as microemulsões preparadas com pentanol e 3-metil-1-butanol, testaram-se vários outros álcoois como co-surfactantes, mantendo-se a razão 1:4 (SDS:álcool), e avaliaram-se algumas de suas propriedades. Entre os álcoois experimentados, somente o ciclohexanol produziu microemulsão em igual condição que os álcoois anteriormente citados, ou seja, contendo 40 % de óleo de soja. Entretanto, com menor concentração de óleo (20 %), 2-pentanol, 1-heptanol e 1-octanol produziram microemulsões estáveis, e na ausência de óleo de soja, 3-hexanol também foi capaz de formar uma microemulsão.

A condutividade da microemulsão preparada com ciclohexanol contendo 40 % de óleo foi de $28,9 \mu\text{S cm}^{-1}$, portanto, relativamente alta, quando comparada à microemulsão com 3-metil-1-butanol (ver Tabela III). Considerando que este álcool apresenta uma molécula volumosa, os efeitos estéricos também estariam contribuindo desfavoravelmente na formação do filme de surfactante/co-surfactante na interface água/óleo, este fato pode ser confirmado pelo raio hidrodinâmico das gotículas, que foi igual a 1,4 nm. Assim, acredita-se que um dos possíveis fatores responsáveis pela condutividade relativamente alta desta microemulsão é a elevada solubilidade em água do ciclohexanol (40 g L^{-1}).

Os resultados obtidos para as microemulsões com diferentes co-surfactantes contendo 20 % de óleo estão mostrados na Tabela VIII. Pode observar-se que no caso das microemulsões preparadas com álcoois lineares a condutividade das mesmas diminui com o aumento da cadeia do álcool. Este fato também está associado ao aumento de viscosidade, e à redução, tanto da solubilidade em água como da constante dielétrica do álcool. Ainda que os valores obtidos de raio hidrodinâmico encontrem-se no limite de

precisão da técnica, verifica-se que, para estes álcoois, há uma tendência de aumento no raio hidrodinâmico das gotículas de água com o aumento da cadeia do co-surfactante. Este fato deve ser favorecido pelo mais fácil arranjo das caudas apolares do álcool em função da maior afinidade com a cadeia apolar do surfactante. Diferenças expressivas entre as estruturas das microemulsões como função do co-surfactante empregado já foram reportadas.¹⁵

Quando álcoois como 2-pentanol e ciclohexanol são utilizados, verifica-se novamente que os efeitos estéricos exercem influência, já que os raios hidrodinâmicos são menores, comparativamente ao pentanol e ao hexanol, respectivamente. Desta forma, a maior solubilidade em água do ciclohexanol poderia explicar a maior condutividade da microemulsão contendo este álcool em relação àquela com hexanol. Entretanto, no caso do 2-pentanol, o qual apresenta elevada solubilidade em água, superior a todos os álcoois experimentados, este parâmetro não permite interpretar os valores de condutividade. Isto porque a microemulsão preparada com 2-pentanol apresenta condutividade inferior àquelas preparadas com 1-pentanol, 3-metil-butanol e ciclohexanol, ainda que as viscosidades dos dois primeiros álcoois sejam similares à do 2-pentanol. Por outro lado, observa-se na tabela VIII que a constante dielétrica do 2-pentanol é levemente inferior em comparação àquela do 1-pentanol, o que pode contribuir para o abaixamento da condutividade da microemulsão preparada com este álcool.

Tabela VIII – Características físico-químicas dos co-surfactantes e das microemulsões compostas de 8% de água, 14,2 % de SDS, 20% de óleo de soja e 57,8 % de co-surfactante, utilizando diferentes co-surfactantes, na proporção de 1:4 SDS:álcool.

Co-surfactante	Rh (nm)	Índice de refração	Viscosidade (cP±σ)	Condutividade (μS cm ⁻¹)	Solubilidade do álcool em água (g L ⁻¹) ¹	Viscosidade álcool (cP) ²	ε ¹ álcool
1-pentanol	1,9	1,421	9,8±0,2	94	27	3,619	15,13
Ciclohexanol	1	1,456	35,1±0,7	91	40	57,50	16,40
3-metil-1-butanol	1,9	1,420	10,3±0,1	74	25	3,692	14,70
2-pentanol	1,2	1,419	9,1±0,2	53	135	3,470	13,71
Hexanol	1,7	1,426	11,8±0,2	35	5,8	4,578	13,03
1-heptanol	2,1	1,430	16,6±0,3	15,5	1	5,810	11,75
Octanol	2,6	1,433	23,8±0,5	6,4	Insolúvel	7,298	10,30

Quando avaliadas as microemulsões preparadas com os diferentes co-surfactantes em ausência de óleo de soja, obtiveram-se valores de condutividade cerca de três vezes maiores, reproduzindo-se o comportamento mostrado na Tabela VIII.

Na ausência de óleo de soja tornou-se impossível determinar o raio hidrodinâmico das gotículas de água através de espalhamento de luz dinâmico, possivelmente as gotículas apresentavam dimensões muito reduzidas, e a técnica utilizada detecta partículas somente com o tamanho superior a 1 nm. O aumento da hidrofobicidade do meio, pela adição de óleo de soja, levou a uma maior agregação do conteúdo de água. Este fato pode ser comprovado pelo menor tamanho das gotículas na microemulsão contendo 20 % de óleo de soja (Tabela VIII), em relação aquela com 40 % de óleo (Tabela V) (na proporção de 1:4 - SDS:álcool).

4.6.2 Voltametria

Medidas por voltametria linear a 1 mV s^{-1} em um eletrodo de disco de Pt vs. um eletrodo de referência de AgCl/Ag foram feitas em microemulsões desaeradas, sendo o SDS o único eletrólito presente no meio. Observou-se uma onda no potencial $E_{1/2} = 1,2 \text{ V}$, a qual corresponde provavelmente à oxidação da água presente nas gotículas, visto que a corrente limite anódica observada experimentalmente aumenta com o teor de água na microemulsão (Figura 4.18 a e b). O potencial de 1,2 V é o esperado para a oxidação da água em um eletrodo de Pt vs. AgCl/Ag. Quando se faz uso de um eletrodo de Pt de quasi-referência o valor do potencial de meia-onda determinado para a oxidação da água é de 0,9 V (ver Tabela IX). Determinaram-se ainda os valores dos potenciais limite de oxidação do meio que são de 2,04 V para microemulsões preparadas usando pentanol e de 2,0 V para aquelas empregando o 3-metil-1-butanol.

Tabela IX – Dados eletroquímicos para a microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de álcool, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água. Condutividade, limites anódico e catódico e potenciais $E_{1/2}$ para a oxidação de H_2O 3 mol L^{-1} sem e com $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de Ferroceno (Fc) em um filme de Pt. $D_{w/o}$ e D_{Fc} calculados da Equação (2.10).

Microemulsão	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	^a Limite anódico (V)	^a Limite catódico (V)	^b $E_{1/2 w/o}$ (V)	^a $E_{1/2 Fc}$ (V)	^b $D_{w/o}$ ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	^a D_{Fc} ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
w/o SDS+pentanol	30,95	2,04	- 1,18	0,90	0,57	$1,42 \cdot 10^{-8}$	$5,2 \cdot 10^{-7}$
w/o SDS+3-metil-1-butanol	21,97	2,00	- 1,23	0,97	0,56	$0,90 \cdot 10^{-8}$	$5,1 \cdot 10^{-7}$

^aAgCl/Ag eletrodo de referência.

^bPt eletrodo de quasi-referência.

Pode-se observar que na temperatura ambiente os valores de condutividade das microemulsões são mais de 1000 vezes maiores do que $0,02 \mu\text{S cm}^{-1}$, que é o valor medido para o óleo de soja, e em torno de 100 e 20 vezes maior do que $0,24 \mu\text{S cm}^{-1}$ e $1,37 \mu\text{S cm}^{-1}$, que são os valores medidos para a água deionizada e água destilada, respectivamente.

Na região catódica, uma pequena onda é observada em torno de $-0,60 \text{ V}$ e, em $-1,20 \text{ V}$ ocorre um rápido aumento da corrente, provavelmente, devido à reação de redução da água. Por sua vez o potencial limite de redução do meio foi observado em $-1,18 \text{ V}$ para microemulsão preparada com pentanol e em $-1,23 \text{ V}$ para microemulsão contendo 3-metil-1-butanol.

Desta forma, seguindo um valor arbitrariamente escolhido de $0,1 \text{ A cm}^{-2}$ para a densidade de corrente, a janela eletroquímica para este meio está na faixa de potenciais de aproximadamente $-1,20$ a $2,00 \text{ V vs. AgCl/Ag}$ (ver Tabela IX).

A Figura 4.18 a e b mostra os voltamogramas das microemulsões nas quais variou-se o teor de água. A corrente limite para a oxidação da água contida nas gotículas aumenta ligeiramente ao aumentar-se o conteúdo de água na microemulsão, enquanto que o potencial de meia onda tende a tornar-se menos positivo. Adicionalmente, quando pentanol é usado como co-surfactante, os valores da corrente limite para oxidação da água são maiores que no caso da microemulsão contendo 3-metil-1-butanol. Este fato pode estar relacionado tanto com o menor número de gotículas como também com a menor

quantidade de água no interior das mesmas, no caso da microemulsão com 3-metil-1-butanol, considerando que na temperatura ambiente, o raio das gotículas nesta microemulsão é 25,6 % menor do que aquele mostrado pelas gotículas da microemulsão com pentanol (Tabela V). Entretanto, pode ser observado do perfil das curvas voltamétricas que a cinética da reação de transferência de carga para a microemulsão com 3-metil-1-butanol é mais lenta. Esta característica está provavelmente relacionada à mais baixa condutividade desta microemulsão, que é ao redor de 30% e 60% menor, respectivamente para as microemulsões com 6,0% e 7,5% de água, do que as apresentadas quando pentanol é usado como surfactante.

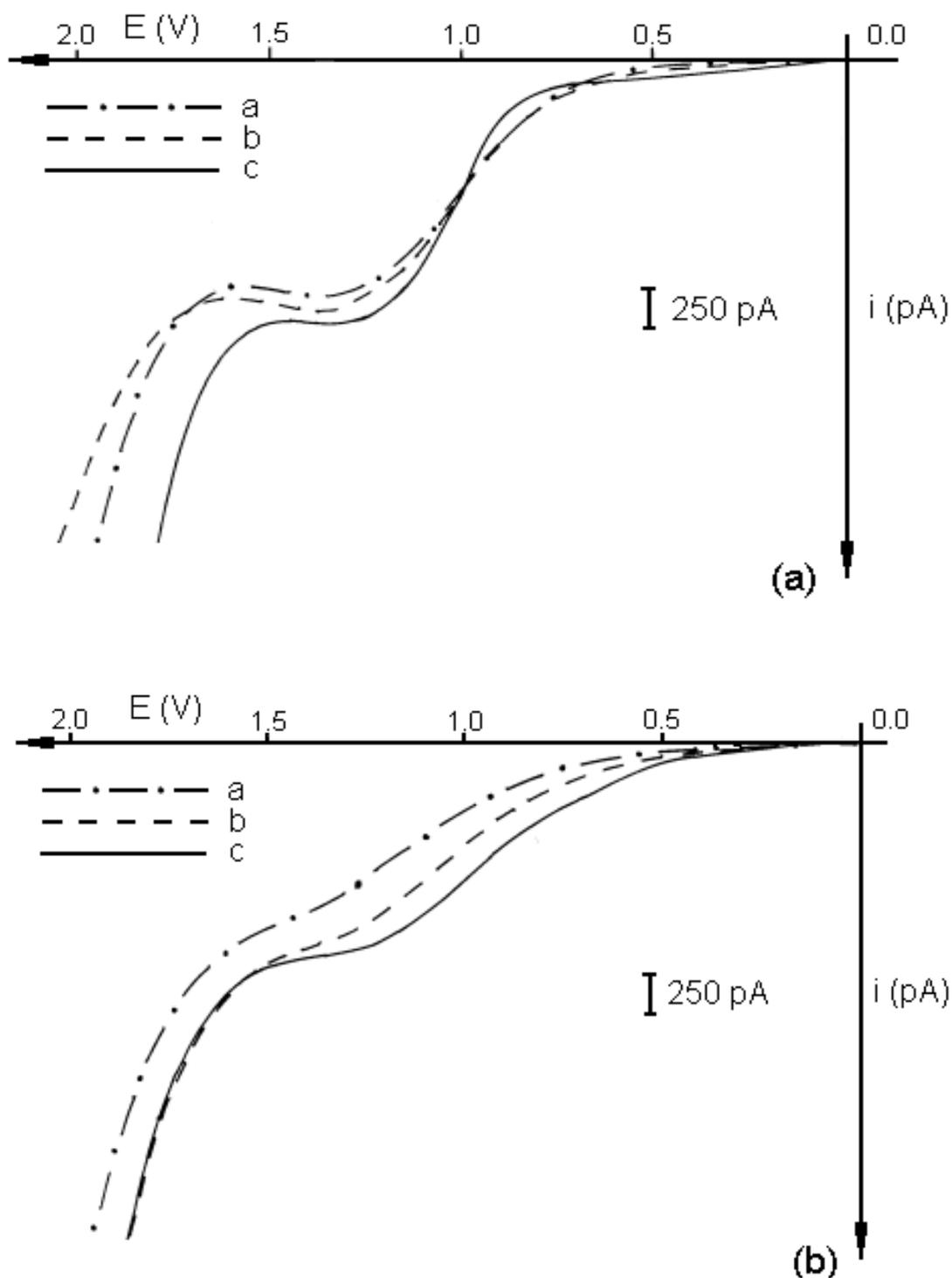


Figura 4.18 – Voltamogramas da oxidação da água em microemulsões contendo **(A)**: a) 40,5 % de óleo, 43,6 % de pentanol, 10,9 % de SDS e 5,0 % de água; b) 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água; c) 39,7 % de óleo, 42,1 % de pentanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água. **(B)**: a) 40,3 % de óleo, 43,3 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 5,5 % de água; b) 40,0 % de óleo, 43,2 % de 3-metil-1-butanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água; c) 39,7 % de óleo, 42,1 % de 3-metil-1-butanol, 10,7 % de SDS e 7,5 % de água. Eletrodo de trabalho ume de Pt vs. Pt *quasi* referencia e $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

A concentração de água nas microemulsões, calculada a partir das medidas de massa e volume, é de 3 mol L^{-1} , sendo que o valor do coeficiente $D_{w/o}$ para as gotículas de água obtidos dos experimentos voltamétricos (oxidação da água) foram calculados usando a equação 2.10. Os valores obtidos para os coeficientes de difusão são todos da ordem $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e diminuem ligeiramente quando o conteúdo de água na microemulsão aumenta. Este comportamento é esperado, levando em consideração que o tamanho das gotículas aumenta com o conteúdo de água (ver Tabela V). Entretanto, para todos os conteúdos de água examinados neste trabalho, os coeficientes de difusão obtidos dos experimentos eletroquímicos são menores do que aqueles obtidos por espalhamento de luz dinâmico (Tabela X). Pode-se verificar que as razões entre os valores obtidos para $D_{w/o}$ por medidas de espalhamento de luz dinâmico e aqueles calculados a partir da equação 2.10 variam entre aproximadamente 2 e 7 para as microemulsões contendo pentanol, e entre aproximadamente 4 e 9 para as microemulsões contendo 3-metil-1-butanol.

Tabela X – Valores de coeficiente de difusão obtidos por medidas eletroquímicas ($D_{w/o}$ electrochem.) e de espalhamento de luz dinâmico ($D_{w/o}$ DLS) para as microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 10,8 % de SDS, 38,5 % de pentanol ou 3-metil-butanol e diferentes % de água. T = 25 °C.

Co-surfactante – % água na microemulsão	$D_{w/o}$ electrochem. ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	$D_{w/o}$ DLS ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
Pentanol – 7,5 %	$1,10 \cdot 10^{-8}$	$2,10 \cdot 10^{-8}$
3-metil 1-butanol – 7,5 %	$0,70 \cdot 10^{-8}$	$2,90 \cdot 10^{-8}$
Pentanol – 6,0 %	$1,42 \cdot 10^{-8}$	$5,40 \cdot 10^{-8}$
3-metil 1-butanol – 6,0 %	$0,90 \cdot 10^{-8}$	$6,60 \cdot 10^{-8}$
Pentanol – 5,0 %	$1,38 \cdot 10^{-8}$	$9,40 \cdot 10^{-8}$
3-metil 1-butanol – 5,5 %	$0,90 \cdot 10^{-8}$	$7,70 \cdot 10^{-8}$

Supondo que o valor do coeficiente de difusão das espécies contidas nas gotículas é o mesmo que o das próprias gotículas¹⁶ estes resultados podem ser explicados, em parte, pela carga líquida positiva apresentada por uma fração das

gotículas, como discutido acima.⁷ Conseqüentemente o transporte das gotículas até a superfície do eletrodo é dificultado por componentes de migração desfavoráveis. Além disto, também se considera a dificuldade das moléculas de água em quebrar a barreira apolar em torno da gotícula e difundirem até a superfície do eletrodo antes da reação de transferência de carga acontecer.¹⁶

Na região catódica a redução da água deve ser facilitada por um componente de migração em direção ao eletrodo devido à carga líquida positiva localizada no interior das gotículas de água, o que pode explicar que nenhuma onda de redução seja observada nas condições experimentais deste estudo. Entretanto, supondo que para a reação de redução da água o valor do coeficiente de difusão $D_{w/o}$ seja próximo daquele encontrado por medidas de espalhamento de luz dinâmico, a corrente limite será, teoricamente, em torno de 6 nA, calculada a partir da equação 2.10 usando o valor de $D_{w/o} = 5,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (ver Tabela VI).

As microemulsões com igual conteúdo de água, quando avaliadas por DLS, mostram que as gotículas de água na microemulsão com 3-metil-1-butanol, movem-se mais rápido que aquelas preparadas com pentanol. Entretanto, quando se avalia o coeficiente de difusão por métodos eletroquímicos, em igual concentração de água, o comportamento é inverso, ou seja, a microemulsão preparada com pentanol mostra um coeficiente de difusão mais alto para a água. Por outro lado, o menor valor do coeficiente de difusão da água calculado quando 3-metil-1-butanol é utilizado, pode estar relacionado a um aumento da energia necessária para romper a monocamada em torno da gotícula de água.

Em função da maior estabilidade, condutividade e perfil das curvas voltamétricas das microemulsões preparadas com 1-pentanol como co-surfactante, esta microemulsão foi escolhida para dar continuidade aos estudos eletroquímicos.

As propriedades eletroquímicas das microemulsões de w/o podem ser medidas usando uma sonda química adequada. Neste sentido, ferroceno foi utilizado devido a sua limitada solubilidade em água, difusão controlada por transferência de carga eletroquímica, estabilidade, excelente resposta eletroquímica e adsorção na superfície

do eletrodo negligenciável.¹⁷⁻²¹ Adicionalmente, o potencial de meia onda de oxidação da água e as características das microemulsões não são afetados significativamente pela presença de ferroceno.²²⁻²⁴

A Figura 4.19 mostra os voltamogramas de microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, sem ferroceno e com $2 \cdot 10^{-2}$, $3 \cdot 10^{-2}$ e $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno, os quais foram obtidos empregando-se um eletrodo de disco com $1 \mu\text{m}$ de raio com a velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} , um eletrodo de quasi-referência e um eletrodo auxiliar, todos em Pt.

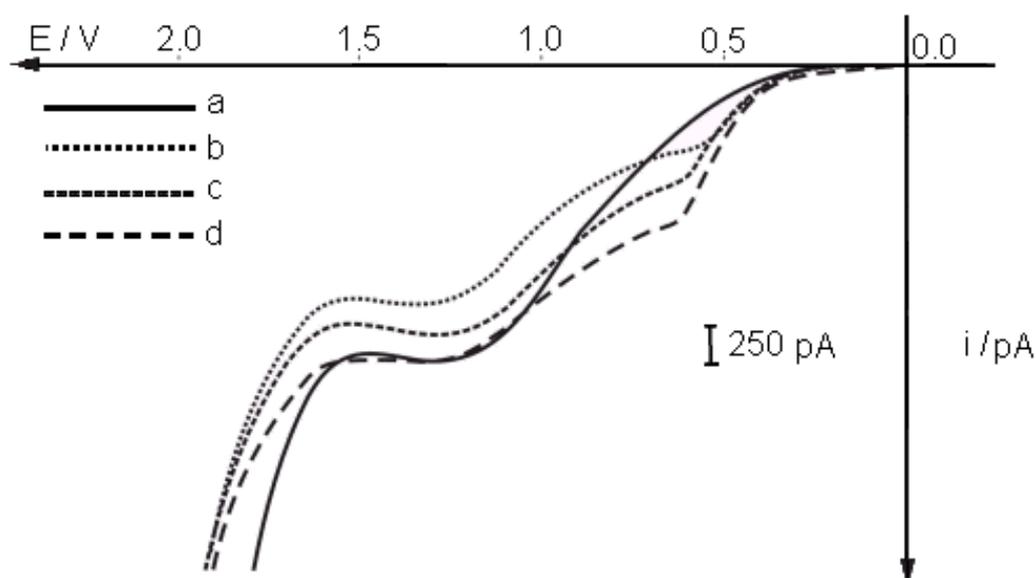


Figura 4.19 – Voltamograma das microemulsões contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, (a) sem ferroceno e (b) com $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ferroceno; (c) com $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; (d) com $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de trabalho um eletrodo de Pt, eletrodo de referência Pt quasi-referência e $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

A onda em $E_{1/2} = 0,50 \text{ V}$ vs. um eletrodo de Pt quasi-referência é atribuída à oxidação do ferroceno, considerando que a mesma só aparece quando este composto está

dissolvido na microemulsão. Verificou-se também, que a corrente limite varia linearmente com a concentração de ferroceno (Figura 4.20) obedecendo a seguinte equação:

$$y = 284,9 \cdot 10^{-12} X + 10^{-10} \quad r^2 = 0,99795 \quad (4.2)$$

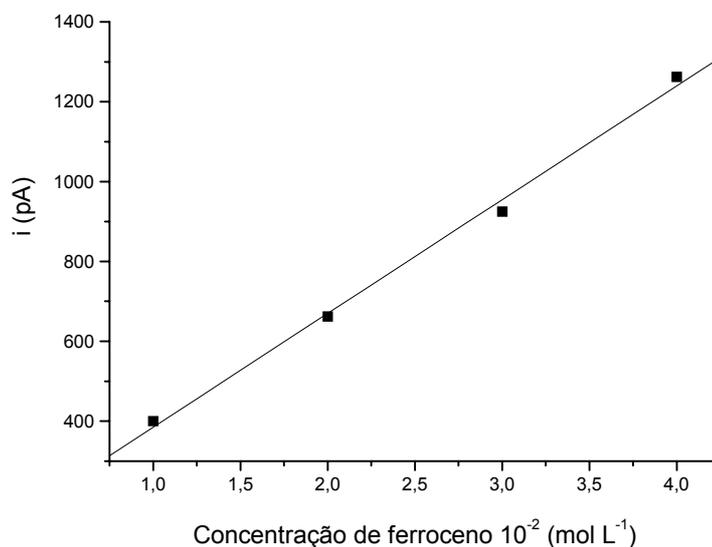


Figura 4.20 – Relação entre concentração de ferroceno e corrente limite para reação de oxidação em uma de Pt vs. quasi referência Pt, na microemulsão contendo pentanol como co-surfactante, $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

O potencial de oxidação do ferroceno na microemulsão estudada apresenta uma boa reprodutibilidade; ele é mais anódico do que o potencial formal em acetonitrila ($E^{\circ} = 0,415 \text{ V vs. um eletrodo de referência de calomelano, SCE}$), do que em água ($E^{\circ} = 0,163 \text{ V vs. SCE}$) e também do que em uma microemulsão composta de CTAB/butanol/octano/água, com diferentes conteúdos de água, ($E_{1/2} = \text{entre } 0,39 \text{ e } 0,24 \text{ V vs. SCE}$), sendo que o potencial diminui com maior concentração de água no meio.²⁵

Por outro lado, como esperado, os voltamogramas das microemulsões na região catódica não são alterados pela presença de ferroceno.

Observa-se ainda, confirmando os dados da literatura, que o $E_{1/2}$ em torno de

0,9 V da onda anódica atribuída à oxidação da água para a microemulsão de w/o não se altera na presença de ferroceno.

O valor do coeficiente de difusão do ferroceno não mostrou diferenças apreciáveis em função do co-surfactante usado (pentanol ou 3-metil-1-butanol), sendo os respectivos valores $5,2 \cdot 10^{-7}$ e $5,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, os quais mostram concordância com aqueles obtidos em uma microemulsão formada por CTAB, butanol, hexadecano e água ($5,7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$),²⁵ e aproximam-se dos obtidos em uma microemulsão formada por dodecil sulfonato de sódio, *n*-heptano, butanol e água (entre $0,8$ e $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$),²⁶ sendo portanto inferiores aos descritos para a difusão do ferroceno em água ($7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).²⁶

Por comparação dos valores de coeficiente de difusão para a oxidação do ferroceno dissolvido na fase oleosa e para a oxidação da água nas gotículas da microemulsão, observa-se que D_{Fc} é, respectivamente, 60 e 40 vezes maior que $D_{\text{w/o}}$ para as microemulsões contendo, respectivamente, pentanol ou 3-metil-1-butanol e 6 % de água. Considerando que as gotículas de água estão envolvidas por um filme de caudas apolares de ânions dodecil sulfato e cadeias de pentanol ou 3-metil-1-butanol,²⁷ sua difusão através do meio orgânico contínuo deve ser menor que a das moléculas de ferroceno, dissolvidas no meio contínuo. Ainda, o íon ferricínio, presente próximo ao eletrodo, dificulta a migração das gotículas carregadas positivamente e conseqüentemente a taxa da reação de oxidação da água diminui, sendo esperada a potencialização desta dificuldade com o aumento da concentração de ferroceno.

Os valores do coeficiente de difusão $D_{\text{w/o}}$ obtidos dos experimentos de oxidação da água parecem incluir a difusão das gotículas e a difusão das moléculas de água do interior das gotículas para a superfície do eletrodo.¹⁶

As Figuras 4.21 e 4.22 mostram os resultados obtidos por voltametria cíclica para a microemulsão preparada com pentanol e contendo $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno, em diferentes velocidades de varredura de potencial.

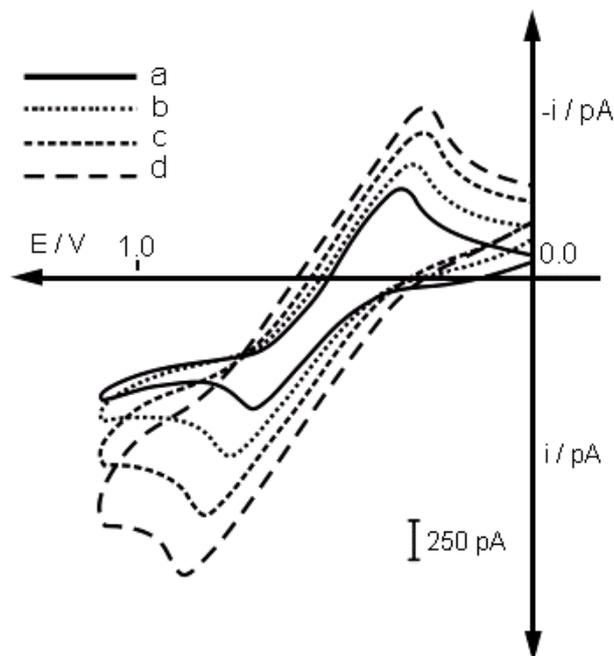


Figura 4.21 – Voltamograma da microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS, 6,0 % de água e $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno; (a) $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$; (b) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (c) $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; (d) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Eletrodo de trabalho ume de Pt, eletrodo de referência de AgCl/Ag.

A voltametria cíclica com ultramicroeletrodo de Pt requer usualmente elevadas velocidades de varredura,²⁸ alcançando valores de ordem de 10.000 V s^{-1} .²⁹

Os voltamogramas típicos de voltametria cíclica mostrados na Figura 4.21 indicam que a diminuição dos coeficientes de difusão em meios viscosos como as microemulsão permite o emprego desta técnica analítica, alcançando-se estados transientes do sistema de oxidação-redução em tempos mais longos do que em meio aquoso.

Tomando-se, por exemplo, um eletrodo planar,³⁰ a espessura da camada de difusão δ é dada por:

$$\delta = (\pi D t)^{1/2} \quad (4.3)$$

onde D é o coeficiente de difusão e t o tempo.

Caracterizando-se o eletrodo por uma dimensão r , para simplificar o modelo, o tempo necessário para que ele alcance o estado estacionário é proporcional à sua superfície.³¹ Para tempos suficientemente curtos de aplicação de um potencial, qualquer eletrodo planar, independentemente do tamanho, comporta-se como um eletrodo planar infinitamente grande, ou seja, o transporte de massa se dá em regime transiente. Com tempos mais longos, o transporte de massa em relação ao eletrodo muda para um regime estacionário. Ou seja, uma razão $\delta/r=0,1$ corresponde predominantemente a um transporte de massa em regime transiente enquanto uma razão $\delta/r=10$ corresponde a um estado estacionário. A Tabela XI compara os tempos necessários para alcançar o estado transiente ($\delta/r=0,1$) em um um de $1 \mu\text{m}$ de raio para uma espécie hipotética cujo coeficiente de difusão diminui comparativamente ao da água em outros meios com maior viscosidade, como é o caso das microemulsões.

Tabela XI - Tempos característicos de estado transiente ($\delta/r=0,1$) em um um de $1 \mu\text{m}$ de raio para diferentes valores de coeficiente de difusão

D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
t (s)	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}

Portanto, em razão do coeficiente de difusão do ferroceno na microemulsão ($5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) ser menor daquele obtido em solventes orgânicos ($1,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em THF contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutylamônio)³² e do que o da maioria das espécies em solução aquosa (da ordem de $10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), é possível realizar neste meio medidas por voltametria cíclica em um ultramicroeletrodo empregando velocidades de varredura convencionais.

A partir dos voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 4.21 para a oxidação do ferroceno em um ultramicroeletrodo de Pt, foram obtidos os dados da Tabela XII.

Tabela XII - Potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) e correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) obtidos por voltametria cíclica, em diferentes velocidades de varredura. Ultramicroeletrodo de Pt de 1 μm de raio vs. eletrodo de referência de AgCl/Ag em microemulsão contendo 20 mol L⁻¹ de ferroceno.

v	E_{pa} / Volt	E_{pc} / Volt	i_{pa} / pA	i_{pc} / pA
5	0,68	0,43	500	575
10	0,69	0,38	575	850
20	0,72	0,35	675	875
50	0,79	0,30	925	1050
100	0,83	0,26	1100	1100
200	0,87	0,25	1150	1125

A Figura 4.22 mostra que a relação entre i_{pa} e $v^{1/2}$ é linear para as velocidades de varredura do potencial de 5, 10, 20, 50 e 100 mV s^{-1} , porém a 200 mV s^{-1} houve uma mudança nesta tendência e, a 500 mV s^{-1} , as curvas apresentaram distorções significativas.

O comportamento verificado para oxidação do ferroceno em microemulsão, que mostra a perda da linearidade da relação corrente de pico anódica *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura, quando a velocidade aumenta, indica que o processo de transferência de carga neste meio se dá sob condições de quase-reversibilidade, pois com o aumento da velocidade de varredura, o processo passa a sofrer controle cinético. Ainda, considera-se que nas velocidades superiores a 100 mV s^{-1} pode haver um acúmulo do produto da reação (íon ferricínio) nas imediações do eletrodo, dificultando a chegada do ferroceno à superfície do eletrodo de trabalho. Este acúmulo ocorre provavelmente em função da viscosidade elevada da microemulsão e por ser o íon ferricínio solúvel preferencialmente nas gotículas de água. Assim sendo, sua difusão da superfície do eletrodo para o centro do sistema ocorre lentamente.

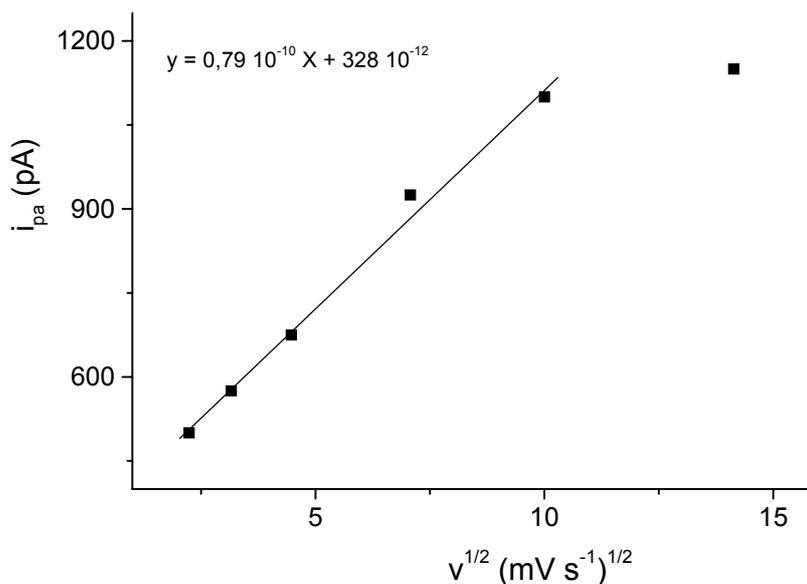


Figura 4.22 – Relação entre $v^{1/2}$ e corrente de pico anódica, para microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS, 6,0 % de água e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ferroceno. Eletrodo de trabalho ume de Pt vs. eletrodo de referência de AgCl/Ag, $v = 10, 20, 50, 100, 200$ e 500 mV s^{-1} .

A condição de reversibilidade para o processo de transferência de um elétron de uma espécie eletroativa no estado estacionário, pode ser estimada através do critério de Tomes ($\Delta E = E_{3/4} - E_{1/4}$), cujos dados são obtidos do voltamograma.³³ Dados mais precisos sobre a reversibilidade ou não do sistema requerem a análise matemática da curva *E versus* $[(i_{lim} - i)/i]$ ^{22,34} (ver Figura 4.23). Para a oxidação do ferroceno em microemulsões, constatou-se uma certa irreversibilidade do processo, pois o valor encontrado para o coeficiente angular da reta foi de 0,095, portanto superior a 0,059, valor que indica a reversibilidade para processos envolvendo 1 elétron.

Ainda, a partir dos testes de diagnóstico da teoria da voltametria cíclica, confirmou-se que o processo se aproxima das condições de quasi-reversibilidade (Tabela XII e Figura 4.22).^{35, 36}

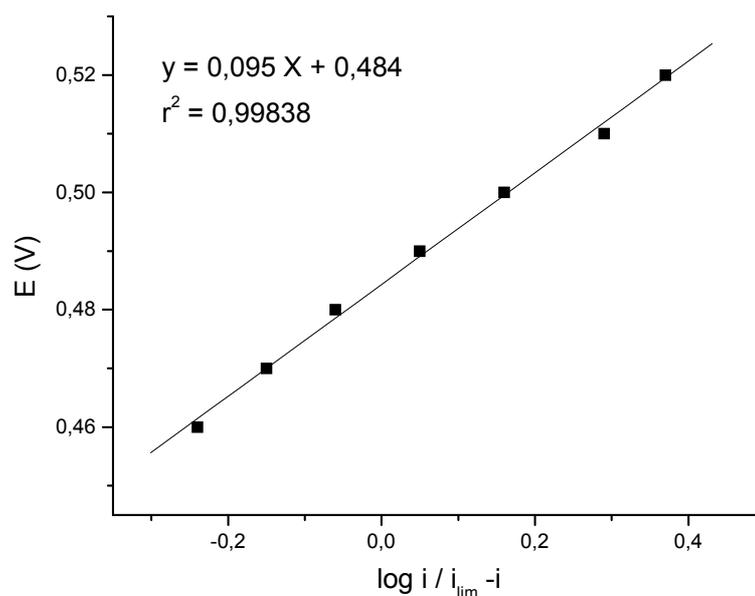


Figura 4.23 - Relação E vs. $\log i / (i_{lim} - i)$ obtida a partir de um voltamograma linear da oxidação de $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno em microemulsão. Ume de Pt vs. AgCl/Ag e velocidade de varredura 1 mV s^{-1} .

Considerando que os ácidos graxos livres presentes nos óleos vegetais resultam da decomposição dos triacilgliceróis (TAGs), os quais apresentam caráter eletroativo e cuja natureza indica a origem do óleo, foram realizados experimentos para investigar seu comportamento eletroquímico. Os TAGs presentes no óleo de soja são formados pelos ácidos oléico (21,4 %), linoleico (56,1 %), linolênico (7,2 %) e palmítico (15,3 %),³⁷ portanto, os ácidos graxos correspondentes podem ser encontrados livres no óleo.

Os voltamogramas de uma microemulsão sem e com a adição de ácido oléico nas concentrações de $3, 5$ e $7 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e, pentanol como co-surfactante foram conduzidos na velocidade de varredura de 2 mV s^{-1} usando um ume de Pt em meio desaerado (Figura 4.24).

Considerando que a corrente limite da onda com $E_{1/2}$ em torno de -0.60 V observada na região catódica aumenta linearmente com a concentração de ácido oléico na microemulsão ($r^2 = 0,99993$), ela foi atribuída à redução deste composto.

Observa-se ainda que o $E_{1/2}$ é levemente deslocado para potenciais mais negativos com o incremento da concentração de ácido graxo.

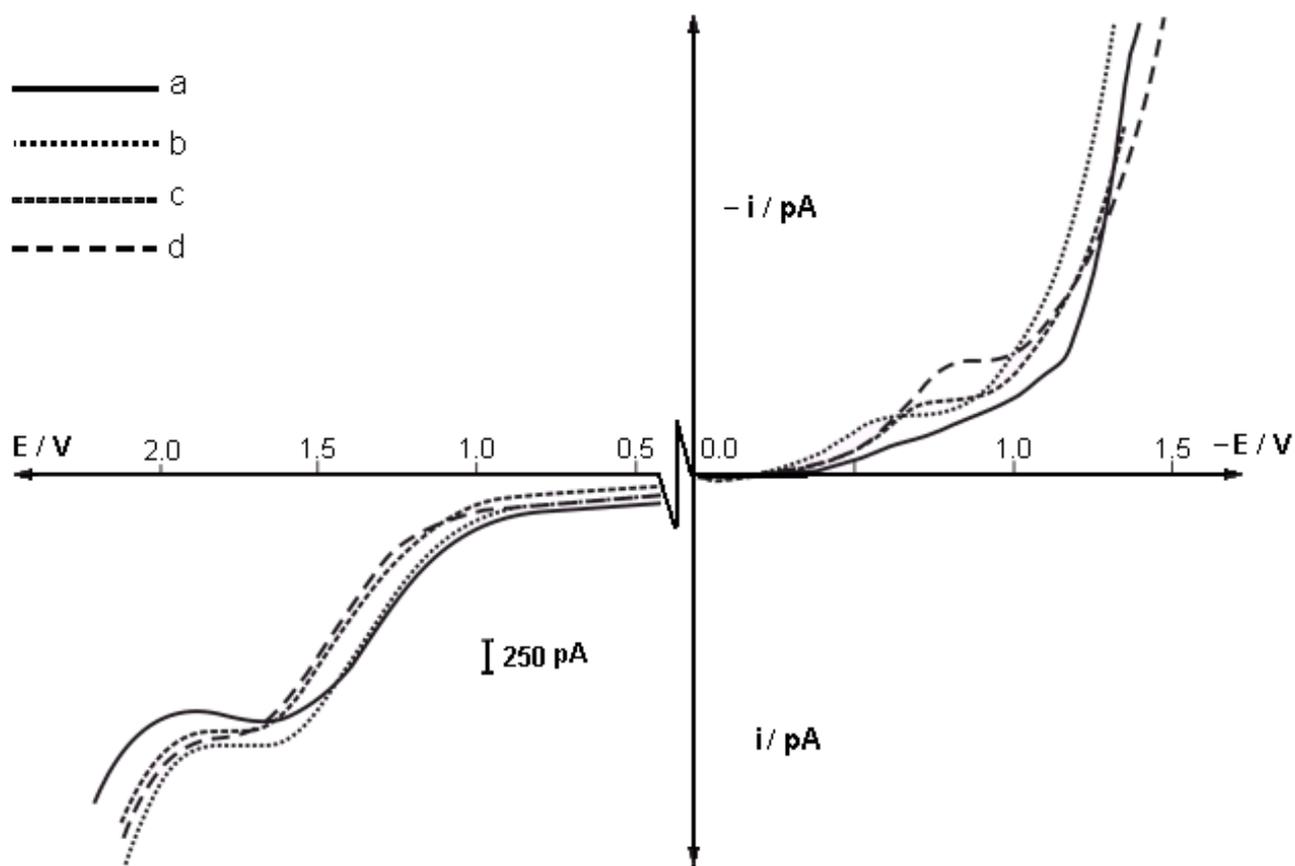


Figura 4.24 – Voltamograma da microemulsão contendo 40,0 % de óleo, 43,2 % de pentanol, 10,8 % de SDS e 6,0 % de água, (a) sem ácido oléico; (b) com $3 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ de ácido oléico, (c) com $5 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹; (d) com $7 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ de ácido oléico. Eletrodo de trabalho ume de Pt, eletrodo de referência AgCl/Ag e $v = 2$ mV s⁻¹.

A eletro-redução dos ácidos graxos é, de fato, a redução do hidrogênio do grupo carboxílico, formando o ânion carboxilato.³⁸ Verifica-se que nenhuma onda de oxidação

adicional aparece na região anódica na presença de ácido oléico e nenhuma mudança expressiva na corrente limite da oxidação da água é observada. Entretanto, um leve deslocamento para potenciais mais positivos dos valores de $E_{1/2}$ para a oxidação da água, bem como o deslocamento de $E_{1/2}$ na região catódica, indicam um decréscimo na condutividade elétrica das microemulsões. Estes resultados confirmam os dados da literatura de que a oxidação dos ácidos graxos livres em eletrodo de Pt ocorre somente em elevadas densidades de corrente ($>1 \text{ A cm}^{-2}$).³⁸

A pequena onda de redução observada em -0.60 V para a microemulsão sem a adição de ácido oléico (veja Figura 4.24) indica a presença de baixas quantidades de ácidos graxos livres no óleo de soja.

Desta forma, os resultados descritos indicam que métodos eletroanalíticos, empregando ultramicroeletrodos, permitem determinações quantitativas de espécies em microemulsões de água em óleo de soja. Enfatiza-se que não é do nosso conhecimento que estudos eletroquímicos em microemulsões de água em óleos vegetais, do tipo w/o, tenham sido reportadas na literatura até o momento.

4.7 ELETROFORESE CAPILAR

4.7.1 Estudos utilizando microemulsões

Uma microemulsão reversa constituída por uma pequena quantidade de tampão aquoso, dodecil sulfato de sódio e um excesso de 1-pentanol, na razão de 1:4 SDS:álcool, foi investigada neste trabalho como BGE e como meio para introduzir as amostras de gordura diretamente no capilar. Uma série de solutos neutros e aniônicos foram usados como analitos, e o possível mecanismo capaz de explicar a separação observada será discutido na sequência. Hidrocarbonetos como fase orgânica são normalmente empregados em RMEEKC, porém não é do nosso conhecimento que solventes polares imiscíveis em água como 1-pentanol na forma de microemulsão tenham sido usados como eletrólito de corrida até a realização do presente estudo.

No trabalho de Fung-Kee-Fung e Post,³⁹ foi utilizada uma microemulsão de w/o contendo bis(2-etil-hexil)sulfosuccinato de sódio (AOT), água e decano; Altria e colaboradores⁴⁰ empregaram uma microemulsão composta por SDS, água, butanol e octano em estudos similares.

Uma propriedade interessante das microemulsões reversas (w/o), constituídas por uma pequena quantidade de tampão aquoso, dodecil sulfato de sódio e um excesso de 1-pentanol, é a habilidade de dissolver simultaneamente gorduras e soluções aquosas, por exemplo, com um conteúdo ótimo de 15 % de água: mais do que 30 % de gordura foi dissolvido na microemulsão contendo SDS e 1-pentanol na razão de 1:4.⁴¹ Esta propriedade foi usada para determinar anilina em óleo vegetal sem extração prévia.⁴²

4.7.1.1 Estudos preliminares e separação dos solutos sondas

Usando polaridade negativa, obteve-se a separação de diversos solutos adicionados à microemulsão. Entretanto, a reprodutibilidade dos tempos de migração não foi satisfatória. Diversos modificadores de parede, como: 0,01 a 1 % de HEC, 0,1 % PVA e 1×10^{-4} a 2×10^{-2} % de brometo de hexadimetrina foram experimentados na

tentativa de contornar este problema, porém, não se obteve sucesso com qualquer destes. A reprodutibilidade só foi melhorada quando se executou o condicionamento prévio do capilar com NaOH seguido por IBPI, como indicado na parte experimental.

A Figura 4.25 mostra dois eletroferogramas com os picos de diversos solutos, entre os 23 solutos avaliados, incluindo compostos aniônicos e neutros com diferentes hidrofobicidades, salicilato e ftalato mostraram o mais curto e mais longo tempo de migração, respectivamente, sendo eles $16,0 \pm 1,5$ e $22,5 \pm 2,0$ min obtidos de 10 injeções executadas em dias diferentes. O tempo de migração do salicilato mostrou-se sempre muito mais curto que o de qualquer outro soluto, com uma diferença de aproximadamente 2,5 min em relação ao pico do soluto mais próximo, 3,4,5-trimetoxibenzoato (aprox. 18,5 min), os outros solutos apareceram compreendidos dentro de uma janela de aproximadamente 4 min. Piromelitato também saiu no mais longo tempo de migração, sobrepondo-se ao pico de ftalato, enquanto tereftalato saiu próximo, porém a um tempo de migração um pouco menor (aprox. 22 min).

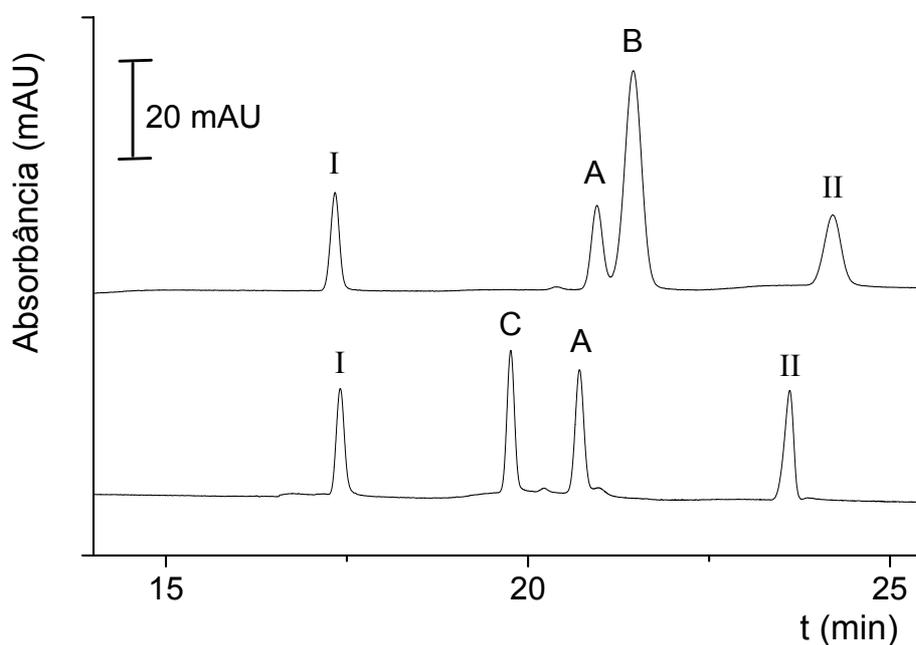


Figura 4.25 – Eletroferogramas obtidos em um BGE constituído por uma microemulsão de w/o preparada com um tampão aquoso de Tris $4 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹ em pH 8,4, registrado a 240 nm. Solutos ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada soluto injetados em microemulsão): salicilato (I), 2-aminoantraquinona (A), anilina (B), 3,4,5-trimetoxibenzoato (C) e ftalato (II).

Para remover a incerteza devida ao deslocamento dos picos ao longo do eixo do tempo entre sucessivas injeções, e para melhor comparar os resultados obtidos com diferentes condições de trabalho, salicilato e ftalato foram usados como referências do tempo de migração. Para este propósito, usou-se:

$$t_R' = (t_{II} - t_R) / (t_{II} - t_I) \quad (4.4)$$

onde t_R , t_I e t_{II} são os tempos de migração do soluto, do salicilato e do ftalato, respectivamente. De acordo com a Eq. (4.4), t_R' deveria aproximar-se de 1 para solutos com tempo de migração curto, próximo ao do salicilato, e de 0 para solutos com longos tempos de migração, próximo ao do ftalato. Os valores de t_R' para uma série de solutos aniônicos e neutros com diferentes hidrofobicidades, injetados na presença de salicilato e ftalato, são mostrados na Tabela XIII.

Tabela XIII – Tempo de migração relativo (t_R') e mobilidade relativa (μ_r) de acordo com as equações 4.4 e 4.8 e, desvio padrão (σ) do tempo de migração absoluto, para diversos solutos em uma microemulsão de w/o com fase contínua polar

Tampão e pH	Soluto (carga)	t_R'	μ_r	σ
Tris, pH 8.4	Ftalato (-2)	0	0	1,47
	Piromelitato (-4)	0	0	1,47
	DMSO (0)	0,15	0,12	1,10
	Tereftalato (-2)	0,19	0,13	0,41
	DMFA (0)	0,21	0,17	1,50
	Sulfaguanidina (0)	0,23	0,19	1,19
	N-Metilformamida (0)	0,30	0,23	-
	PG (provavelmente 0)	0,31	0,25	0,18
	OG (provavelmente 0)	0,31	0,25	0,18
	Acetona (0)	0,32	0,26	0,69
	5-Sulfônico salicilato (-2)	0,36	0,30	-
	Tri-linoleína (0)	0,38	0,32	0,81
	Tri-oleína (0)	0,38	0,32	0,81
	α -Tocoferol (provavelmente 0)	0,38	0,32	0,81
	Anilina (0)	0,40	0,32	1,38
	Tolueno (0)	0,41	0,35	-
	tert-butil-hidroxianisol (provavelmente 0)	0,44	0,37	0,22
	tert-butil-hidroquinona (provavel. 0)	0,44	0,37	0,22
	2-aminoantraquinona (0)	0,47	0,39	0,56
	Sulfaquinoxalina (0)	0,50	0,43	1,07
Benzoato (-1)	0,52	0,44	1,15	
Tri-metoxibenzoato (-1)	0,62	0,54	2,24	
Salicilato (-1)	1	1	0,86	
Tris, pH 9.5	PG (0)	0,33	0,28	1,66
	OG (0)	0,33	0,28	1,66
Etanolamina, pH 10	PG (0)	0,30	0,26	0,39
	OG (0)	0,30	0,26	0,39
Dipentilamina, pH 10	PG (0)	0,29	0,24	1,44
	OG (0)	0,29	0,24	1,44

Diversos solutos neutros, incluindo acetona, DMSO, N-metilformamida, DMFA, anilina e tolueno, foram injetados como potenciais marcadores de EOF. Com indicado na Tabela XIII, os picos destes compostos foram distribuídos ao longo de uma ampla faixa de tempos de migração. A polaridade negativa usada para observar os picos, indicou um EOF invertido, e provavelmente o tempo de migração do mesmo não estaria longe daquele dos marcadores hidrofóbicos, como anilina e tolueno, que localizam-se preferencialmente na fase contínua; entretanto, um valor confiável não pôde ser determinado, em função destes solutos hidrofóbicos também poderem interagir com a superfície hidrofóbica das gotículas e com os íons dodecil sulfato livres na fase contínua. Com um EOF invertido, e usando polaridade negativa, a ordem esperada para os picos em MEKC e MEEKC, no sentido de baixos para altos tempos de migração, é: piromelitato < ânions com dupla carga < ânions com carga simples < solutos neutros. Entretanto, a ordem realmente observada foi: ânions com carga simples < solutos neutros < ânions com dupla carga ~ piromelitato. Este fato sugere que o mecanismo de separação em uma microemulsão de w/o é mais complexo que em outros meios. O possível mecanismo de separação que poderia explicar os resultados obtidos, também confere um significado físico-químico para t_R' , e estes são propostos e discutidos adiante, no item 4.7.1.8.

4.7.1.2 Influência da temperatura, pH e composição do tampão

Para avaliar a influência da temperatura, pH e composição do tampão, usou-se misturas de salicilato, ftalato, tereftalato, piromelitato e PG ou OG. Utilizando-se tampão Tris pH 8,4, nas temperaturas de 35 e 45 °C verificou-se uma redução nos tempos de migração em relação à temperatura de 25 °C, provavelmente pela diminuição da viscosidade da microemulsão. Entretanto, os valores t_R' permaneceram aproximadamente os mesmos.

Alterando-se o pH do tampão Tris de 8,4 para 9,0 ou 9,5, não se observou mudanças significativas dos tempos de migração absolutos ou relativos destes solutos. Também não houve alterações expressivas quando substituiu-se o tampão Tris por etanolamina a pH 9,0 e 10,0, e por dipentilamina a pH 10,0 (veja Tabela XIII). Como mostrado na Figura 4.26, quando o pH do tampão Tris foi reduzido para 7,0, os tempos de migração absolutos de todos os solutos aumentaram, mas a localização relativa dos picos,

estimada por t_R' , permaneceu a mesma. Resultados similares foram também obtidos com trietanolamina em pH 7,8. Os mais longos tempos de migração obtidos nestes valores de pH podem ser explicados assumindo-se uma redução do EOF. A janela de separação, delimitada pelos picos do salicilato e do ftalato, foi ampliada pela redução do pH, de aproximadamente 6,5 min em pH 8,4 para aproximadamente 10 min em pH 7.0.

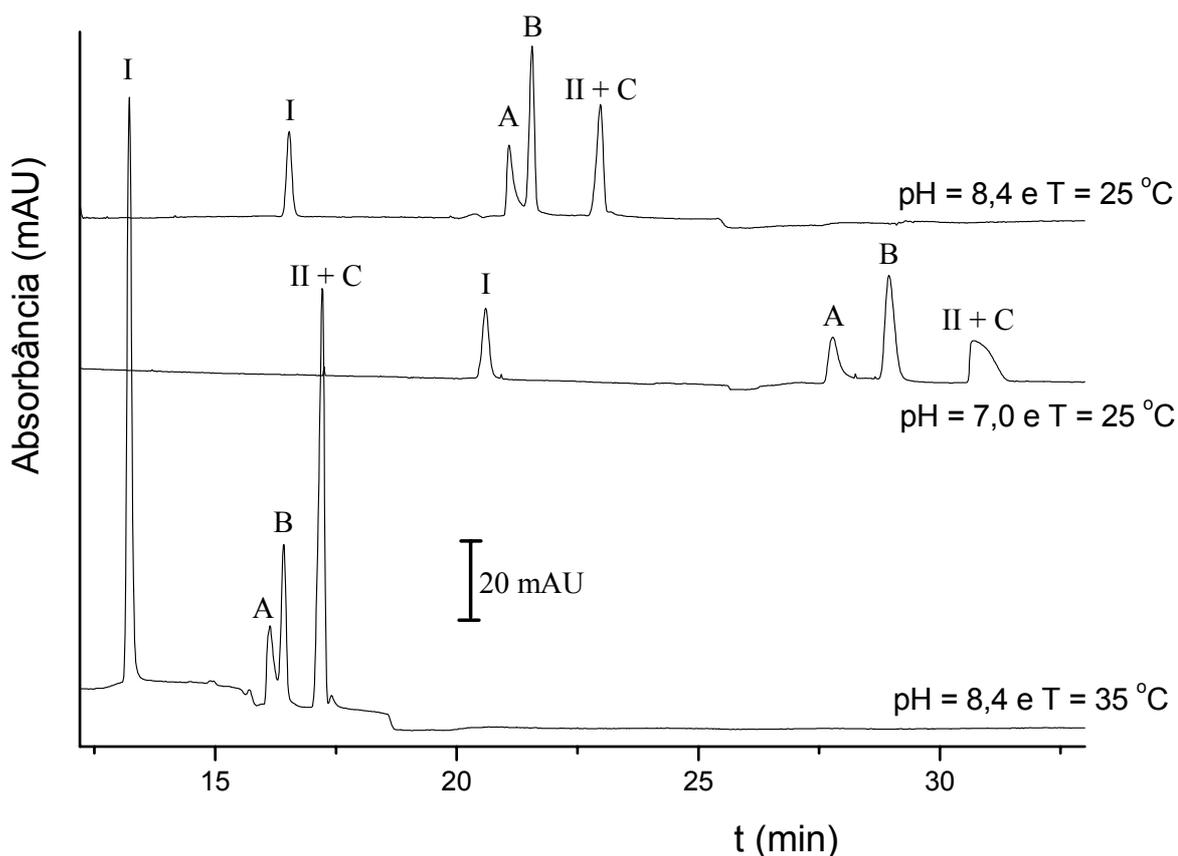


Figura 4.26 – Eletroferogramas obtidos nos valores de pH e temperatura indicados nos traços; BGE constituído por uma microemulsão de w/o preparada com um tampão aquoso de Tris $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,4, registrado a 240 nm. Solutos: salicilato (I), OG (A), tereftalato (B), piromelitato (C) e ftalato (II).

4.7.1.3 Injeção de óleos vegetais e gorduras

Os dados da Tabela XIII foram primeiramente obtidos por injeção da microemulsão na ausência de gordura, então, misturas de salicilato, ftalato e outros solutos,

foram também preparadas em azeite de oliva refinado, diluídas na proporção de 1:4 (p/p) com a microemulsão e injetadas. Constatou-se que os tempos de migração dos solutos não foram modificados pela presença do azeite, entretanto, como pode-se ver na Figura 4.27, surgiu um pico adicional em $t_R' = 0,38$ (aprox. 18,6 min). A existência do mesmo pico em $t_R' = 0,38$ foi verificada quando injetou-se microemulsões preparadas sem gordura, mas aditivada com salicilato e ftalato, contendo TAGs como trioléina ou trilinoléina. O espectro de UV deste pico mostrou que ele não apresenta um máximo de absorção, mas uma absorbância residual, por crescer abaixo de 205 nm. Este espectro mostrou-se muito similar aquele obtido para o pico em $t_R' = 0,38$, que surgiu na presença do azeite de oliva. Assim, considerou-se que este pico é oriundo dos componentes da gordura, principalmente dos TAGs insaturados.

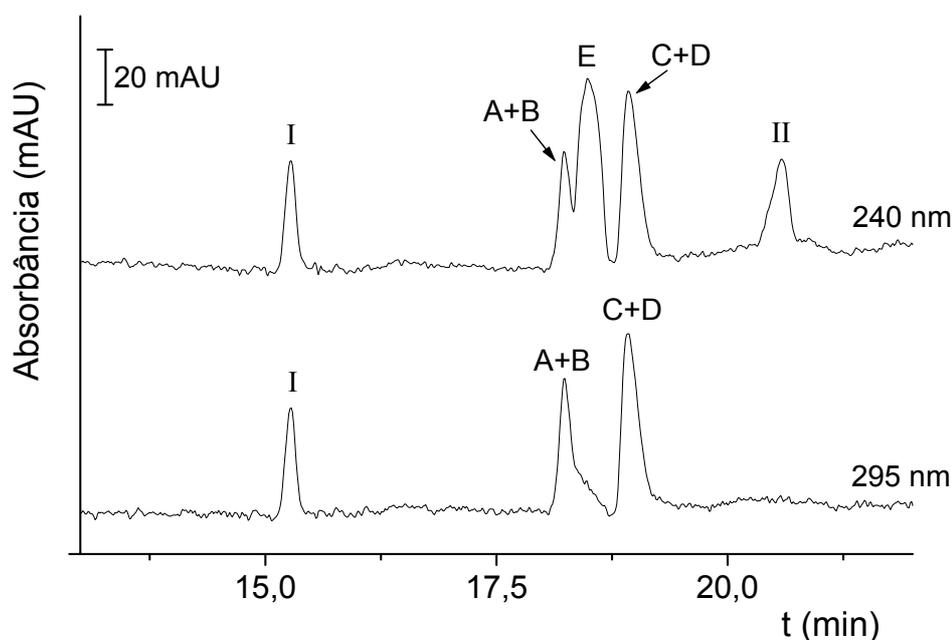


Figura 4.27 – Eletroferogramas monitorados nos comprimentos de onda indicados nos traços; BGE constituído por uma microemulsão de w/o preparada com um tampão aquoso de Tris $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,4, registrado a 240 nm. Amostra de azeite de oliva aditivada com salicilato (I), BHA (A), BHQ (B), PG (C), OG (D) e ftalato (II) foi misturada com a microemulsão (razão 1:4 em peso) e injetada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada soluto na mistura); pico E refere-se aos TAGs do azeite de oliva.

Investigou-se também a possibilidade de detecção dos antioxidantes sintéticos e tocoferóis nas amostras de óleos vegetais. Como mostrado na Figura 4.27, os tempos de migração dos pares PG/ OG e BHA/ BHQ ficaram próximos ao dos TAGs, entretanto, os picos dos antioxidantes sintéticos foram bem observados em 295 nm, onde os fenóis têm um máximo de absorção e a absorvidade dos TAGs é baixa. Talvez devido a redução da viscosidade das microemulsões, o tempo de migração relativo dos TAGs diminuiu por aumento da temperatura do capilar, sendo $t_R' = 0,38$ a 25 °C, mas $t_R' = 0,51$ a 45 °C. Ainda assim, os pares PG/ OG e BHA/ BHQ não foram resolvidos mesmo usando de diferentes tampões ou aumento da temperatura do capilar.

Verificou-se que α -tocopherol também apresenta um $t_R' = 0,38$, coincidindo com o tempo de migração dos TAGs. Assim, preparou-se em microemulsão uma amostra de azeite de oliva aditivado com 0,35 % de α -tocopherol e injetou-se em CE. Constatou-se que na mistura, o α -tocopherol poderia ser distinguido dos TAGs através da observação em diferentes comprimentos de onda, pois α -tocopherol produz um pico mais intenso em 295 nm do que em 240 nm. Também, usou-se o software MATLAB para recuperar o electroferograma do α -tocopherol sem a interferência dos TAGs ou outro componente do óleo. A repetibilidade dos tempos de migração relativos dos TAGs foi avaliada através da injeção de azeite de oliva refinado em dias diferentes, obteve-se assim $t_R' = 0,38 \pm 0,02$ ($n = 7$). Quando substituiu-se o azeite de oliva por óleo de soja, milho ou girassol, ou ainda por gordura animal (toucinho de porco), os resultados obtidos foram idênticos aqueles mostrados nos eletroferogramas na Figura 4.27.

4.7.1.4 Mobilidade das gotículas e partição entre as fases

Para os propósitos deste trabalho, distinguem-se dois tipos de microemulsões w/o, ou seja, aquelas constituídas por um surfactante aniônico, água e um excesso de hidrocarboneto, a qual tem uma fase contínua apolar (microemulsão NCP), e aquelas que têm uma fase contínua polar (microemulsão PCP), na qual um solvente polar, como 1-pentanol, é usado em maior quantidade que um hidrocarboneto. O possível mecanismo de separação e a importância relativa destes dois tipos de sistema de microemulsões são discutidos a seguir. Do ponto de vista de RMEEKC, uma diferença importante é que os

íons livres não podem estar presentes na fase contínua de uma microemulsão NCP, pois esta não poderá solvatá-los, sendo que a situação oposta é viabilizada em uma microemulsão PCP. Assim, em microemulsões NCP, a carga líquida das gotículas seria zero, em função das cargas das cabeças do surfactante estarem compensadas por aquelas dos íons contidos nas gotículas, e não devem existir íons na fase contínua para carregar a superfície externa das gotículas. Por outro lado, contra-íons associados poderiam carregar a superfície externa das gotículas nas microemulsões PCP. Assim, as cargas negativas do surfactante na interface das gotículas poderia estar compensada pelos cátions do interior e por aqueles associados externamente. Contudo, a carga líquida das gotículas de água em microemulsões PCP deve ser pequena, menor do que a das gotículas de óleo em microemulsões de o/w, em função da menor polaridade e constante dielétrica de solventes polares imiscíveis em relação a água.

As consequências são que em microemulsões NCP a mobilidade das gotículas de água em relação à fase contínua seria zero, e em microemulsões PCP a mobilidade deve ser diferente de zero, embora com valores inferiores aos encontrados em fases contínuas aquosas, como micelas (MEKC) e microemulsões o/w (MEEKC). Em MEKC e MEEKC normal, um soluto neutro que está sofrendo partição entre as fases, necessariamente exibirá uma mobilidade diferente de zero, que torna possível a separação, enquanto que em RMEEKC a eficiência da separação dos solutos neutros, vista exclusivamente através da partição entre as fases, não é factível usando uma microemulsão NCP, e seria possível com uma PCP, entretanto, com rendimentos de separações inferiores àqueles produzidos por soluções micelares e microemulsões o/w. Ainda, desde que todos os íons livres estejam contidos dentro das gotículas aquosas, os solutos iônicos não seriam separados usando uma microemulsão NCP. Ao invés disto, em microemulsões PCP, solutos iônicos capazes de ser solvatados pela fase contínua polar seriam separados por sua própria mobilidade eletroforética e pela partição entre as duas fases. Esta última contribuição pode ser importante para solutos iônicos, desde que os íons livres na fase contínua podem ter grande mobilidade, enquanto que, independentemente de suas cargas, íons contidos dentro das gotículas exibiriam baixa mobilidade.

Provavelmente em função dos íons estarem aprisionados dentro das gotículas, solutos aniônicos (ácido benzóico e derivados) não foram separados em uma microemulsão de água/ AOT/ decano, entretanto, um soluto neutro (benzofenona) apareceu em um tempo

de migração ligeiramente menor que dos solutos aniônicos.³⁹ Benzofenona provavelmente sofreu partição entre as fases, mas as gotículas não eram carregadas e não se moviam em relação a fase contínua, desta forma, a separação de solutos aniônicos não teria sido produzida por nenhuma destas formas. Adicionalmente à partição entre as fases, outro mecanismo de separação estaria presente nesta microemulsão NCP. Como será discutido na secção 4.7.1.6, uma possível explicação da separação observada pode ser derivada da presença de percolação da fase aquosa através da fase contínua orgânica.

Para a microemulsão PCP usada neste trabalho, a aparente mobilidade eletroforética das gotículas seria indicada pelos marcadores hidrofílicos. Tendo em vista que, os picos dos marcadores hidrofílicos neutros usados ficaram distribuídos ao longo de uma ampla faixa de tempos de migração, os valores de t_R' em ordem crescente foram: 0,15 para DMSO, 0,21 para DMFA, 0,30 para N-metilformamida e 0,32 para acetona. Considerando que a interação hidrofóbica destas pequenas moléculas com os ions do surfactante não é favorecida, a separação destes seria atribuída à partição entre as fases. As importantes diferenças entre os tempos de migração destas moléculas suportam a hipótese da mobilidade das gotículas ser diferente de zero em microemulsão PCP. Ainda, os grandes valores dos tempos de migração dos marcadores hidrofílicos como DMSO, e o menor tempo de migração das moléculas pequenas e hidrofóbicas como a anilina e tolueno, sugerem que em relação à fase contínua, as gotículas movem-se em sentido contrário, em direção ao cátodo. Este fato se tornaria possível pela presença de cátions solvatados na interface gotícula/monocamada.

4.7.1.5 Influência da hidrofobicidade e carga dos solutos

Quando avaliou-se os diversos pares de solutos, relacionados pelas estruturas moleculares, como 2-aminoantraquinona/ anilina, tri-metoxibenzoato/ benzoato e sulfaquinoxalina/ sulfaguanidina, verificou-se que existe uma relação entre os tempos de migração e a hidrofobicidade (Tabela XIII), ou seja, o mais hidrofóbico de cada par aparece sempre em menor tempo de migração. Este fato pode ser explicado pela existência de partição entre as fases e interações hidrofóbicas com os íons do surfactante na fase contínua.

Devido à possível mobilidade catiônica das gotículas, a partição entre as fases retardaria o soluto mais hidrofílico do par e, devido às interações hidrofóbicas com os íons do surfactante, o soluto mais hidrofóbico seria adicionalmente acelerado em direção ao ânodo (próximo ao detector).

Nenhum dos fenóis usados mostrou variações relevantes de t_R' quando submetidos aos diferentes pHs produzidos pelos vários tampões empregados (7,0 a 10,0), sugerindo assim, que todos eles estavam protonados em todos os experimentos realizados. De acordo com os seus pK_a em água, estariam presentes em pH 8,4 fenóis em forma neutra (como BHA, com $pK_a = 12,5$) e aniônica (como galatos de alquila com $pK_a = 7,8$), entretanto, sabe-se que em função do acúmulo de cargas negativas, em meios organizados contendo SDS a desprotonação ocorre em 2 a 3 unidades de pH maior que o pH indicado pelo correspondente pK_a em água.⁴³⁻⁴⁶ Também devido à constante dielétrica mais baixa e acidez mais alta do solvente em relação à água, a protonação é favorecida em 1-pentanol. Desta forma, assumindo-se que todos os fenóis usados estavam protonados, considera-se que os ânions de carga simples saíram sempre em menores tempos de migração do que os solutos neutros (veja Tabela XIII). Os mais baixos tempos de migração dos derivados do ácido benzóico ($1 > t_R' > 0,5$) em relação aos fenóis protonados e outros solutos neutros ($0,5 > t_R' > 0,2$) indicam que, adicionalmente à partição entre as fases e às interações hidrofóbicas com os íons do surfactante, a carga influenciou fortemente no mecanismo de separação dos ânions com carga simples em relação aos solutos neutros.

O mecanismo discutido acima pode explicar a ordem de hidrofobicidade decrescente dentro dos pares formados por solutos com uma estrutura química semelhante, bem como a ordem em função das cargas, porém, o fato dos solutos neutros saírem antes daqueles com dupla carga como tereftalato, e este aparecer antes de ftalato e piromelitato (que saem juntos) ainda não foi explicado. Uma possível explicação para este fato é que os solutos mais hidrofílicos, como ftalato e piromelitato, estejam aprisionados dentro das gotículas de água. Isto explicaria o porquê destes dois íons, apesar de apresentarem diferente número de cargas, não terem sido separados um do outro, e poderia também suportar a hipótese da mobilidade catódica das gotículas em relação à mobilidade do EOF. Esta evidência foi reforçada pelo tereftalato que é muito menos solúvel em água que ftalato, assim, este estaria parcialmente presente na fase contínua; este fato explicaria seu menor tempo de migração em relação ao ftalato. O outro ânion de dupla carga, 5-

sulfônico-salicilato, em função de sua estrutura molecular particular, exibe um comportamento intermediário ao do salicilato e outros ânions de dupla carga.

4.7.1.6 Influência da percolação

Em microemulsão NCP, o início da percolação da fase aquosa através da fase oleosa é percebido pelo incremento da condutividade, que ocorre bruscamente quando a quantidade de água sobrepassa um valor crítico. Algum grau de percolação entre as fases foi constatado neste estudo, em especial para 20 % de água, valor que está ligeiramente acima da região de início da percolação (18 % de água), descrita por Fung-Kee-Fung.³⁹ A mobilidade dos solutos presentes na fase dispersa é provavelmente modificada pela percolação. Utilizando-se uma microemulsão NCP e polaridade negativa, Fung-Kee-Fung relata que benzofenona apresenta menor tempo de migração que os derivados de ácido benzóico.³⁹ Um possível mecanismo que explique essa situação é aquele que considera as interações hidrofóbicas da benzofenona com os íons AOT na fase aquosa. Íons AOT livres deveriam estar presentes na fase aquosa em concentração acima da concentração micelar crítica. Quando a percolação está presente, os solutos associados aos íons AOT na fase aquosa poderiam migrar de uma gotícula para outra, adquirindo assim, alguma mobilidade anódica.

A possível presença de percolação entre as fases na microemulsão PCP, usada neste estudo, foi estudada por meio de medidas de condutividade, os resultados são mostrados no gráfico da Figura 4.28 de condutividade *versus* a percentagem de água para uma microemulsão constituída de SDS/ 1-pentanol na razão de 1:4 m/m. A região abaixo de 7,5% de água não foi examinada, em função de não ser possível solubilizar o SDS na mistura em concentrações de água inferiores a esta, de fato, o primeiro ponto da curva foi medido na presença de certa turbidez. A curva da Figura 4.28 foi obtida usando somente água, mas a condutividade das microemulsões preparadas com 15 % de solução aquosa do tampão Tris $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,4 foi quase a mesma daquela preparada com 15 % de água pura. A significativa concentração de íons do surfactante livres na fase contínua, com alguma contribuição de percolação, pode explicar a condutividade, que foi bastante alta ($0,65 \text{ mS cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) apesar do baixo conteúdo de água (15 %), que corresponde a uma razão de 1-pentanol/ água de aproximadamente 4,5. O incremento da condutividade, apesar

de não mostrar valores críticos de variação por duas ordens de grandeza, pode ser interpretado como devido à presença de percolação a muito baixas concentrações de água, aumentando progressivamente quando a quantidade de água também aumenta. Além disso, nota-se no gráfico da Figura 4.28 que há duas tendências de incremento da condutividade, até cerca de 18% de água a taxa de incremento é mais baixa que acima de 18%, sugerindo que ocorre uma mudança na microestrutura da microemulsão. Como sugerido para a microemulsão NCP, o efeito de uma baixa ou moderada percolação pode ser o incremento da mobilidade dos solutos na fase dispersa. Usando polaridade negativa, os íons de SDS livre, que estariam presentes na fase aquosa, arrastariam os solutos associados até o ânodo, contribuindo assim para a separação dos solutos hidrofóbicos e hidrofílicos.

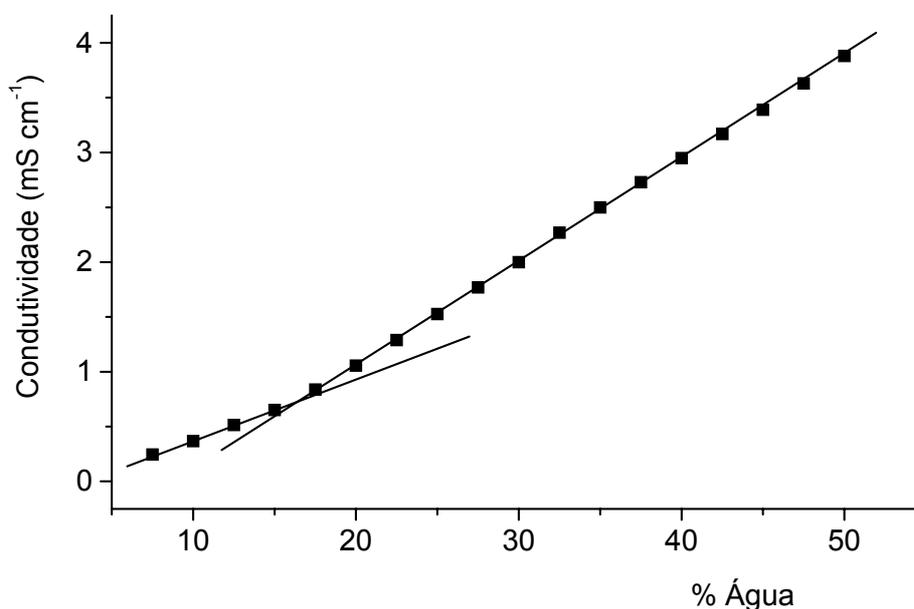


Figura 4.28 – Condutividade *versus* percentagem de água para a microemulsão constituída por água e 1:4 SDS/ 1-pentanol (25 ± 1 °C).

4.7.1.7 Resumo dos mecanismos de separação propostos em microemulsões de w/o

Ao longo da discussão acima, foi proposto para explicar a separação de solutos neutros em microemulsão de w/o PCP os seguintes mecanismos: (i) a partição entre as fases em um meio onde as gotículas de água têm uma carga líquida positiva, assim exibindo uma mobilidade catódica; (ii) a associação dos solutos hidrofóbicos com os íons

livres do surfactante na fase contínua; e (iii) em presença de percolação, a contribuição das interações hidrofóbicas dos solutos com os íons livres do surfactante na fase dispersa, os quais estão resumidos na Tabela XIV. Adicionalmente, a alta mobilidade dos ânions monocarregados em microemulsão PCP foi explicada como devida à presença das cargas, enquanto que a aparente baixa mobilidade dos ânions de dupla carga e do piromelitato foi explicada assumindo-se que estes íons estariam aprisionados dentro das gotículas.

Os mecanismos também explicam a separação extremamente pobre observada em microemulsão NCP.³⁹ Primeiro, os íons livres não podem ser separados pela partição entre as fases, porque eles não estão presentes na fase contínua, e solutos neutros também não podem ser separados pelo mecanismo de partição entre as fases, porque a mobilidade das gotículas não carregadas em relação a da fase contínua é zero. Além disto, considerando que não existem íons livres do surfactante presentes na fase contínua apolar, a modificação da mobilidade dos solutos neutros pelas interações hidrofóbicas com os íons do surfactante nesta fase é impossibilitada. A separação pobre encontrada em microemulsão NCP poderia ser explicada pelas interações hidrofóbicas dos solutos com os íons livres do surfactante na fase dispersa quando existe percolação.

Tabela XIV – Mecanismos de separação propostos de solutos neutros e aniônicos em microemulsão w/o constituída por surfactantes aniônicos

Mecanismo	Efeito esperado
Mobilidade das gotículas e partição entre as fases	<ul style="list-style-type: none"> - Devido falta de carga e de mobilidade das gotículas em relação à fase contínua, os solutos neutros não devem sofrer partição entre as fases nas microemulsão NCP, impossibilitando separações por este mecanismo. - Os baixos tempos de migração dos marcadores hidrofóbicos como tolueno, os tempos de migração intermediários dos marcadores hidrofílicos como DMSO e ainda, os tempos longos de ftalato e piromelitato, sugerem que as gotículas apresentam uma mobilidade catódica líquida em microemulsão PCP constituída por água, SDS e <i>1-pentanol</i>. Em função da mobilidade das gotículas, a partição entre as fases contribui para a separação dos solutos neutros em microemulsão PCP. - Utilizando microemulsão PCP e modo de polaridade reversa, os ânions aprisionados dentro das gotículas sofrem um retardo de tempo em relação aos solutos neutros hidrofílicos. Solutos neutros e aniônicos (se estiverem presentes na fase contínua) são acelerados em direção ao detector, tanto mais quanto maior a hidrofobicidade do soluto; devido à presença de carga, os ânions migram primeiro.
Associação com íons livres do surfactante na fase contínua	<ul style="list-style-type: none"> - Em microemulsão NCP não existem íons livres do surfactante na fase contínua. - Em microemulsão PCP, a mobilidade anódica tanto dos solutos neutros como dos aniônicos são reforçadas por associações solvofóbicas com os íons livres do surfactante na fase contínua. No modo de polaridade reversa, este fato incrementa a separação dos pares de solutos hidrofóbicos e hidrofílicos de estruturas moleculares semelhantes.
Percolação de fases e associação com íons do surfactante na fase dispersa	<ul style="list-style-type: none"> - A percolação normalmente está presente em microemulsão PCP, mas em microemulsão NCP esse efeito deve ser mais expressivo. - A percolação pode incrementar a mobilidade catódica de solutos neutros e aniônicos e, as associações solvofóbicas com os íons do surfactante na fase aquosa, também podem contribuir para a separação.

4.7.1.8 Fatores de retenção e mobilidades

Em MEKC, o fator de retenção, k , ou razão entre a quantidade de soluto nas fases micelar e contínua, é normalmente calculada para solutos neutros. Um fator equivalente pode ser definido em RMEEKC, como a razão entre a quantidade de soluto nas fases contínua e dispersa:

$$k = \frac{t_R - t_{EOF}}{t_{EOF} \left[1 - \frac{t_R}{t_G} \right]} \quad (4.5)$$

onde t_{EOF} é o tempo de migração do EOF da fase contínua, e t_G é o tempo de migração das gotículas, que em MEEKC e RMEEKC é equivalente ao tempo de migração das micelas em MEKC. Baseando-se na interpretação dada acima, t_G seria provavelmente marcado por ftalato e por piromelitato; no entanto, como mencionado anteriormente, não se encontrou um marcador confiável para o t_{EOF} , pois, solutos pequenos, hidrofóbicos e neutros, como tolueno e anilina, provavelmente, interagiram com a superfície das gotículas e com os íons de dodecil sulfato livres na fase contínua. Portanto, valores confiáveis de k e mobilidade eletroforética do EOF (μ_{EOF}), e das gotículas e solutos em relação ao EOF (μ_G e μ_R), respectivamente, não puderam ser obtidos.

Em ausência de um marcador adequado do EOF, para calcular a mobilidade eletroforética dos solutos em relação a das gotículas, torna-se conveniente descrever a migração em RMEEKC. Assim, admitindo ftalato como um marcador adequado para as gotículas, a mobilidade aparente das gotículas seria aproximadamente dada por:

$$\mu_{aG} = \mu_G + \mu_{EOF} \approx \frac{L'}{t_{II} E} = -3,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad (4.6)$$

onde L' é o comprimento do capilar do extremo de injeção até a janela de detecção; E é o campo elétrico, calculado como a razão entre a voltagem aplicada e o comprimento total do

capilar; o sinal negativo indica o movimento global anódico da gotícula. A diferença entre as mobilidades eletroforéticas dos solutos e das gotículas pode ser calculada como:

$$\mu_{RG} = \mu_R - \mu_G = \mu_{aR} - \mu_{aG} = \frac{L'}{E} \left(\frac{1}{t_R} - \frac{1}{t_{II}} \right) \quad (4.7)$$

onde μ_{aR} é a mobilidade aparente do soluto. Valores pequenos de t_R' na Tabela XIII, correspondem a solutos com baixos valores de μ_{aR} , ou seja, aqueles que apresentam mobilidades eletroforéticas positivas (catiônica) pequenas, próxima a das gotículas, enquanto que os grandes valores de t_R' e μ_{aR} dos ânions de carga simples, indicam altas mobilidade eletroforéticas anódicas. O valor excepcionalmente alto de $t_R' = 1$ do salicilato poderia ser explicado devido ao pequeno tamanho do ânion, no qual a solvatação é inibida por uma ponte de hidrogênio intramolecular. Este não é um valor máximo absoluto de mobilidade aniônica, mas pode ser convenientemente usado como um valor de referência que aumenta a reprodutibilidade dos dados obtidos em diferentes injeções. Usando-se a Eq. (4.7) para calcular o valor de μ_{RG} para o salicilato (μ_{RGI}) e dividindo μ_{RG} por μ_{RGI} , tem-se:

$$\mu_r = \frac{\mu_{RG}}{\mu_{RGI}} = \frac{t_{II} - t_R}{t_{II} - t_I} \frac{t_I}{t_R} = t_R' \frac{t_I}{t_R} \quad (4.8)$$

onde $\mu_{RGI} = -1,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$; os outros solutos mostram mobilidades de ordem de grandeza igual aquela das gotículas. De acordo com a Eq. (4.8), a correção dos valores de t_R' pelo fator t_I / t_R origina as mobilidades relativas (μ_r). Os valores de μ_r calculados através da Eq. (4.8) para os demais solutos, são mostrados na Tabela XIII.

4.7.2 Estudos utilizando meios não aquosos

A injeção direta de amostras de óleos vegetais em um sistema NACE, sem prévia extração, usando um BGE miscível em óleo ainda não foi investigada. Neste

trabalho estudou-se o uso de uma mistura de propanol com moderadas quantidades de metanol, que foi capaz de suportar a injeção direta do óleo vegetal no capilar. Considerando os estudos executados em metanol ^{47,48} e o caráter ácido dos álcoois primários quando comparados com água, esperava-se que valores muito altos de pH seriam necessários para ionizar fenóis em misturas de metanol/ propanol. Assim, as misturas foram preparadas com KOH, a fim de torná-las condutivas e fortemente alcalinas. Diversos ácidos carboxílicos e antioxidantes sintéticos adicionados às amostras foram separados em um curto intervalo de tempo, bem como biofenóis e outros compostos hidroxiaromáticos naturalmente presentes em óleos vegetais, ainda, realizou-se a quantificação dos tocoferóis presentes em óleo de soja.

4.7.2.1 Seleção da mistura de solventes

Constatou-se que o óleo de soja é miscível na razão mínima de 1:1 v/v com os seguintes solventes polares: propanol, 1-pentanol, acetona, tetrahydrofurano e 1,4-dioxano, mas não é miscível com metanol, etanol ou acetonitrila. Algumas propriedades físicas do metanol e dos solventes nos quais o óleo é miscível e, que são importante no contexto de NACE, são apresentadas na Tabela XV. As mobilidades dos íons são mais altas em solventes de baixas viscosidades e a constante dielétrica é essencial para manter os íons separados. Uma grande condutividade térmica e uma baixa condutividade elétrica, na presença de tampões moderadamente concentrados, são características desejáveis para minimizar efeitos produzidos por aquecimento devido ao efeito Joule. Finalmente, um baixo corte ótico é necessário para a detecção direta por UV-vis da maioria dos solutos orgânicos. Como pode ser deduzido dos dados da Tabela XV, entre os solventes polares que mostram boa miscibilidade com o óleo, tetrahydrofurano e dioxano têm uma constante dielétrica muito baixa, acetona absorve fortemente abaixo de 340 nm, e 1-pentanol é o mais viscoso de todos. Assim, propanol mostrou o melhor balanço entre as características requeridas, e portanto, foi o solvente selecionado. Outras características apropriadas apresentadas por propanol são o alto ponto de ebulição (97 °C) e um grande momento dipolar (3,1 Debye).

Tabela XV - Constantes físicas do metanol e de outros solventes polares que apresentam miscibilidade com pelo menos 50 % de óleo de soja

Solvente	Viscosidade (cP) ^{A 2}	Constante dielétrica ²	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) ^B	Corte óptico (nm) ^{C 49}
Metanol	0,544	33 (20 °C)	1830	210
15:85/metanol:propanol	1,680	-	200	215
Propanol	1,945	20,8 (20 °C)	130	215
1-pentanol	3,619	15,1 (25 °C)	14	220
Acetona	0,306	21,0 (20 °C)	36	340
Tetrahidrofurano	0,456	7,5 (25 °C)	0,11	240
1,4-dioxano	1,177	2,2 (20 °C)	0,04	230

^A Viscosidade dinâmica a 25° C.

^B Condutividade elétrica a 25 °C para um tampão 80 mM de dipentilamina + 40 mM de ácido acético.

^C Comprimento de onda de corte óptico no UV para o qual a transmitância T é 50 %.

As propriedades do propanol podem ser ainda melhoradas, por exemplo, a viscosidade pode ser reduzida, enquanto que a constante dielétrica pode ser aumentada, sem perda da miscibilidade com o óleo, por mistura com moderadas quantidades de metanol. Um gráfico mostrando a miscibilidade do óleo na mistura metanol – propanol é apresentado na Figura 4.29. A miscibilidade do óleo na mistura dos dois solventes decresce rapidamente com mais de 15 % de metanol; desta maneira, exceto nos estudos de influência da concentração de metanol, os BGEs foram preparados com a mistura 15:85 v/v, metanol/propanol.

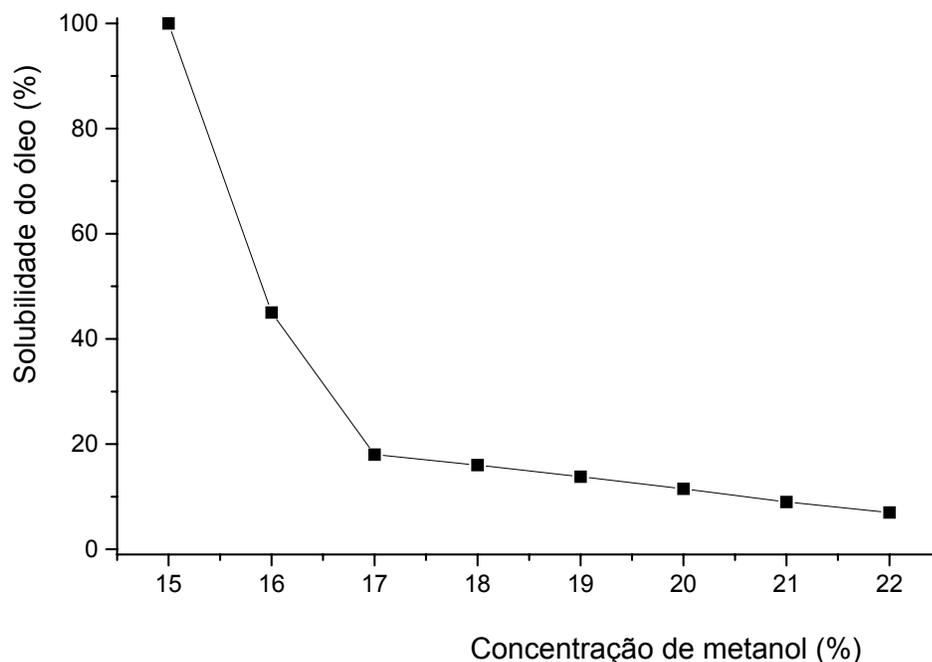


Figura 4.29 – Miscibilidade do óleo de soja com a mistura propanol - metanol a 25 °C.

4.7.2.2 Otimização das condições de separação

Um BGE alcalino constituído por $8 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de dietilamina e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético foi primeiramente experimentado. O pK_a da dietilamina é 10,8 em água a 25 °C, considerando o que ocorre com amônia e outras aminas em metanol, o correspondente pK_a é provavelmente cerca de 1 unidade maior em metanol e outros álcoois primários.^{47,50} Usando polaridade negativa (ânodo próximo ao detector), obtiveram-se picos bem resolvidos de ácido salicílico, ácido benzóico e ácido tri-metoxibenzóico, além de um pico intenso entre 22-25 min, que corresponde aos triacilgliceróis (TAGs) do óleo de soja (Figura 4.30). Entretanto, a reprodutibilidade foi baixa e os picos dos tocoferóis naturais do óleo não foram observados com este BGE. Resultados similares foram obtidos quando dietilamina foi substituída por etanolamina, butilamina ou dodecilamina. Assim, os ácidos carboxílicos foram separados pelos tampões de aminas, mas os fenóis não, provavelmente

devido ao aumento no valor de pKa (4 a 5 unidades) dos mesmos em meio alcoólico em relação ao meio aquoso.^{47,50}

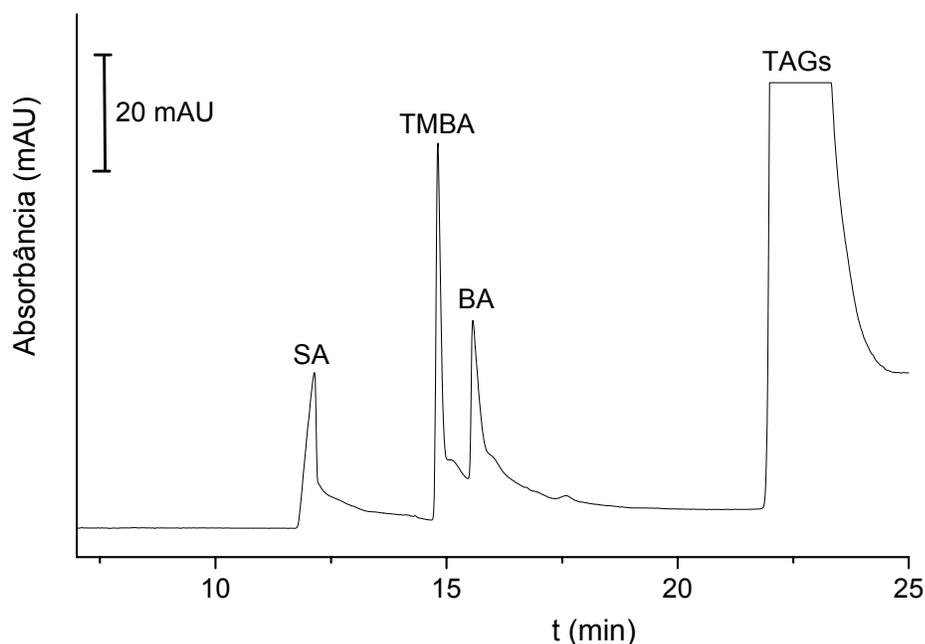


Figura 4.30 – Eletroferograma obtido com um BGE constituído por uma solução $8 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de dietilamina e $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético em uma mistura de metanol/propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm. As soluções dos ácidos salicílico (SA), trimetoxibenzóico (TMBA) e benzóico (BA) foram preparadas em óleo de soja refinado ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada), diluídas 1:1 com propanol e injetadas.

A reprodutibilidade foi bastante melhorada por substituição do tampão de alquilamina/ ácido acético por $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de KOH. De acordo com a teoria, a solução de um álcali forte tem uma grande capacidade tamponante,⁵¹ assim, julgou-se que a adição de um ácido ou base fracos seria desnecessária. A Figura 4.31 mostra um eletroferograma obtido por injeção de óleo de soja aditivado com ácido salicílico, BHA e BHT, onde se pode observar os picos bem resolvidos do ácido salicílico e do BHA e, a ausência do pico do BHT, além do pico devido aos TAGs do óleo. Além destes, foram também observados diversos picos de menor intensidade, que foram atribuídos a α -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol e β -tocoferol (não resolvidos), e outros compostos hidroxiaromáticos do óleo.

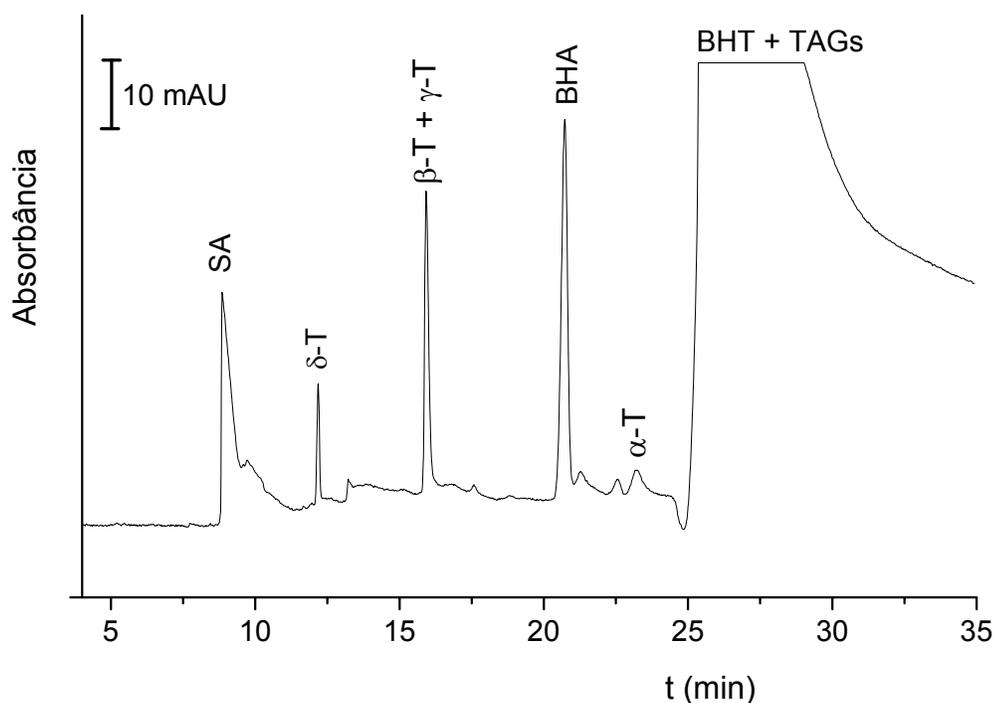


Figura 4.31 – Eletroferograma obtido com um BGE constituído por uma solução $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm. As soluções de ácido salicílico (SA), BHA e BHT foram preparadas em óleo de soja refinado ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada), diluídas 1:1 com propanol e injetadas.

A presença dos picos do TAG indica que o EOF tem sentido anódico, ainda, confirmando este fato, verificou-se uma perturbação na linha base, na ausência de óleo, em aproximadamente 26 min, que foi provavelmente produzida pela ausência de metanol na solução injetada, indicando assim, o tempo de migração do EOF. Os tempos de migração dos solutos diminuíram por aumento da temperatura do capilar de 25 para 35 e 45 °C; sendo este fato atribuído a mais baixa viscosidade do BGE que produziu maiores mobilidades eletroforéticas e eletrosmótica. A resolução foi levemente reduzida por aumento da temperatura, assim, 25 °C foi a temperatura adotada. Uma amostra de óleo de soja, aditivada com ácido salicílico e com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT, foi usada para

estudar a influência da concentração de KOH. No eletroferograma da Figura 4.31, obtido com $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de KOH, BHT não foi resolvido do pico dos TAGs.

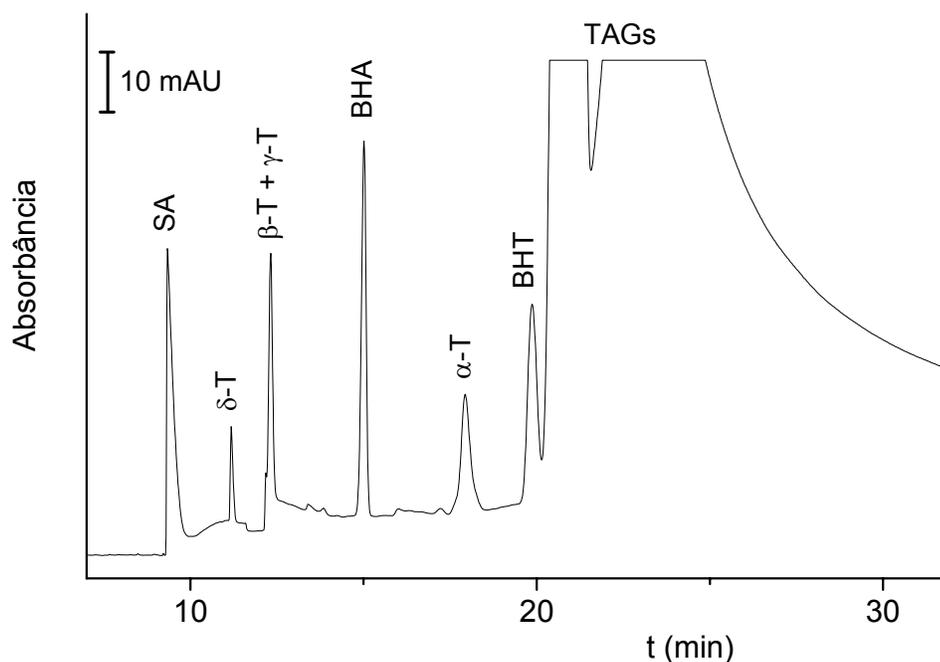


Figura 4.32 – Eletroferograma obtido por injeção de óleo de soja refinado aditivado com ácido salicílico (SA), BHA e BHT; BGE constituído por uma solução $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/ propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm.

Como mostrado na Figura 4.32, os picos dos solutos adicionados, ácido salicílico, BHA e BHT, e aqueles dos tocoferóis naturais do óleo, i.e. α -tocoferol, $(\gamma+\beta)$ -tocoferóis (par não resolvido) e δ -tocoferol, foram bem resolvidos por aumento da concentração de KOH para $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Entretanto, diferenças significativas não foram observadas quando se incrementou a concentração de KOH até $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Por outro lado, o uso de uma concentração de $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de KOH aumentou o tempo de análise e diminuiu a reprodutibilidade, assim, $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de KOH foi a concentração selecionada. Eletroferogramas similares aos da Figura 4.32 foram obtidos por uso de $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de KOH e por injeção de amostras de óleo de oliva aditivado com ácido salicílico e antioxidantes sintéticos. Estes eletroferogramas mostraram uma perturbação na linha base em aproximadamente 21 min.

A influência da concentração de metanol é mostrada na Figura 4.33. Em relação ao uso de 100 % de propanol, tanto o tempo de análise quanto a resolução foram incrementados pela adição de 10 % metanol ao BGE. O tempo de análise diminuiu pelo aumento da concentração de metanol até 15 % (Figura 4.32) e 20 % (Figura 4.33), mas aumentou novamente quando se usou 25 % de metanol. Isto indica a presença de fatores opostos que influenciam o EOF, como redução de viscosidade com pequenas concentrações de metanol, e adsorção dos TAGs nas paredes do capilar com concentrações de metanol superiores a 20 %. Uma corrente instável e pouco reproduzível foi observada com 25 % de metanol. De acordo com a Figura 4.29, este fato foi atribuído a separação de fases dentro do capilar. Desta maneira, 15 % de metanol, foi o percentual adotado, levando em conta resolução, curto tempo de análise e reprodutibilidade.

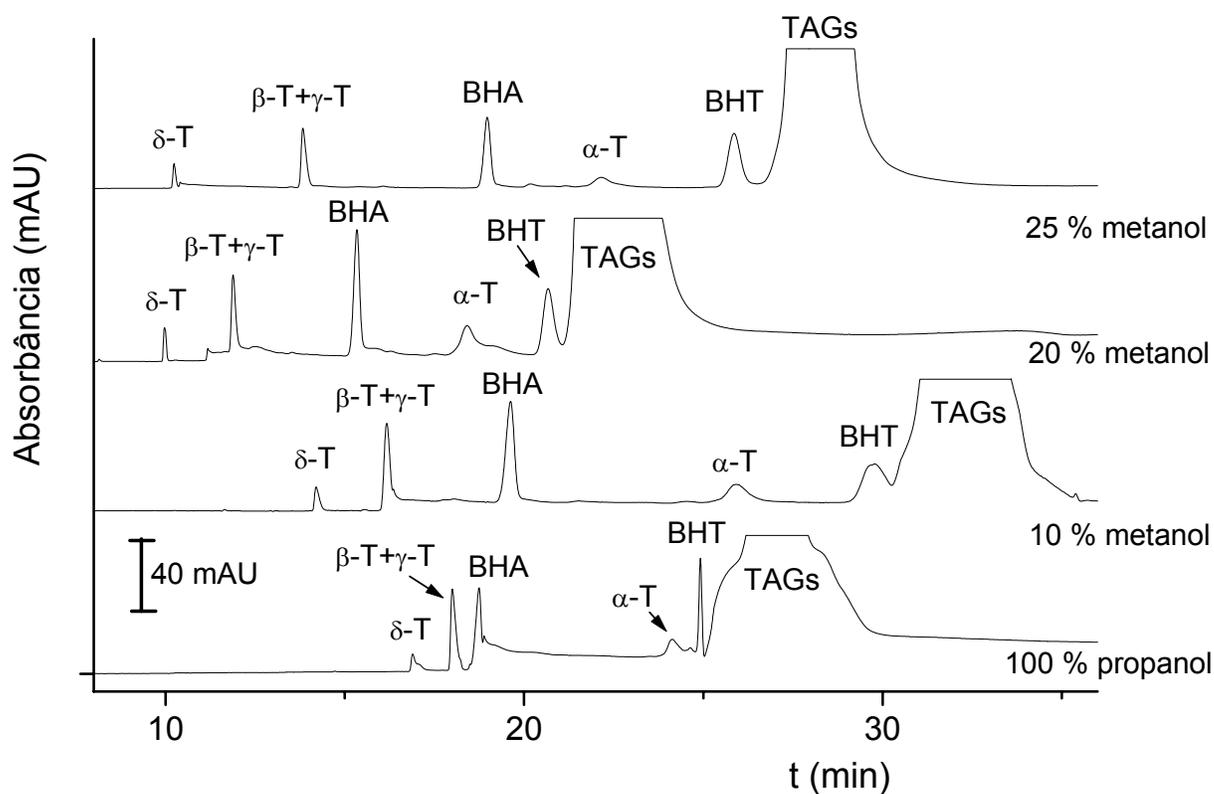


Figura 4.33 – Eletroferogramas obtidos por injeção de óleo de soja com BHA e BHT; BGE constituído por uma solução $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em propanol/metanol, com concentrações variadas de metanol (indicadas nos traços); monitoramento feito a 220 nm.

4.7.2.3 Separação de componentes naturais de óleos vegetais

Objetivando-se verificar a potencialidade dos procedimentos para caracterização de óleos vegetais, injetou-se no capilar óleo de palma virgem, azeite de oliva extra virgem, óleo de gérmen de trigo e óleo de soja bruto, diluídos 1:1 com propanol. Como mostrado na Figura 4.34, os picos dos quatro tocoferóis, bem como do tirosol e outros compostos hidroxiaromáticos, foram identificados nos respectivos eletroferogramas.

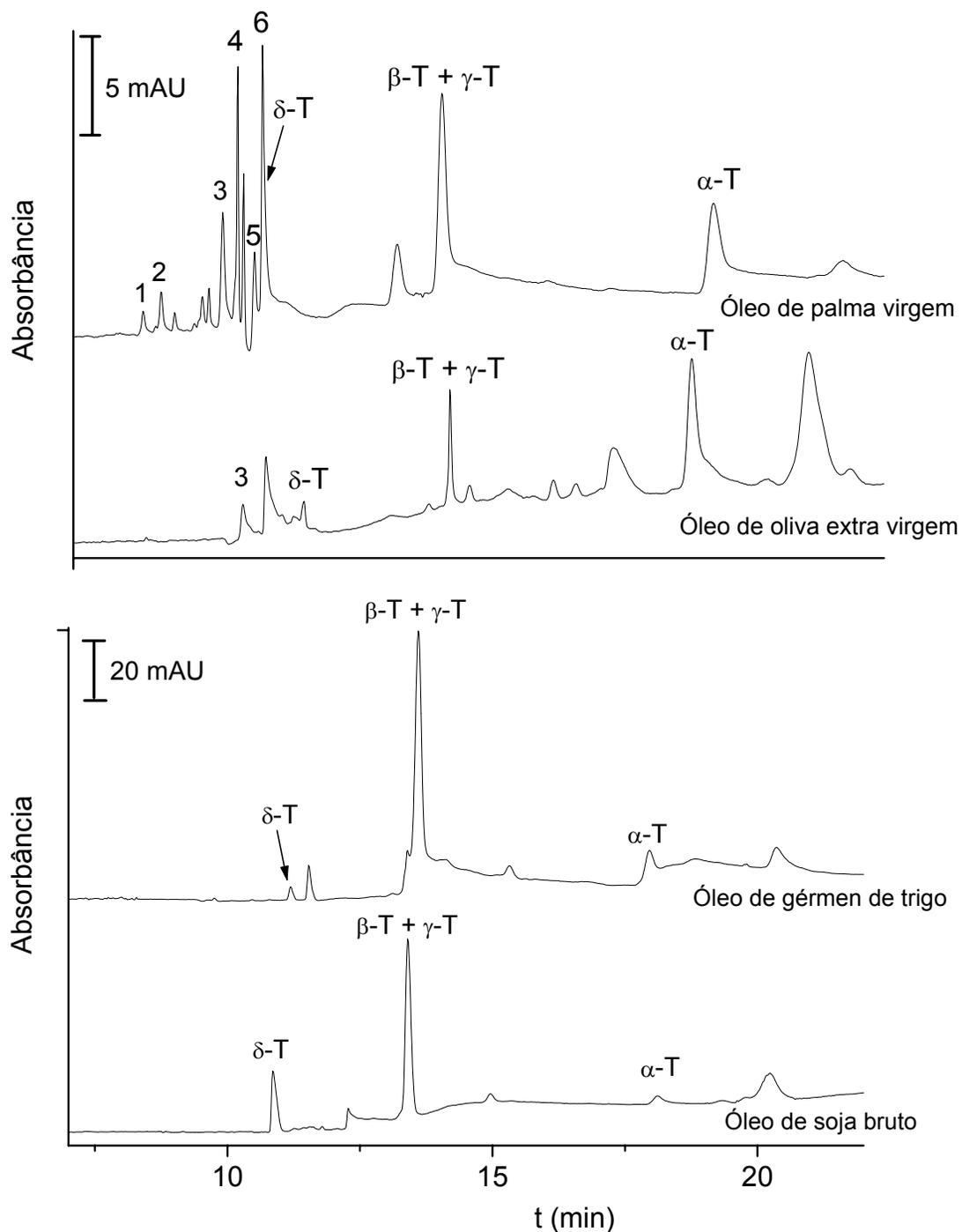


Figura 4.34 – Eletroferogramas obtidos por injeção de diversos óleos, usando um BGE $4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de propanol/ metanol (85:15 v/v), monitorando-se a 220 nm. O número nos picos indica metil parabeno (1), 2,4-dihidroxibenzoato (2), tirosol (3), p-comarato (4), trans-cinamato e p-anisato (pico não resolvido) (5), e ferulato (sobreposto ao δ -T) (6).

A polaridade dos tocoferóis aumenta na seguinte ordem: $\alpha < \beta = \gamma < \delta$, à medida que o número de grupos metil em seus anéis cromanol diminuiu. A ordem do tempo de migração observada nos eletroferogramas foi $\delta < \beta = \gamma < \alpha$, indicando assim uma maior mobilidade anódica para as vitaminas-E mais polares. A polaridade de β e γ -tocoferóis é quase a mesma, considerando que a única diferença estrutural entre eles é a posição dos 2 grupos metil, que explicam a falta de resolução deste par; entretanto, a resolução entre os pares δ -T/ ($\beta + \gamma$)-T e ($\beta + \gamma$)-T/ α -T foi acentuadamente grande. Em função da dupla ligação na cadeia lateral, tocotrienóis são levemente mais polares que os correspondentes tocoferóis.⁵² Assim, seguindo a tendência de polaridade observada com os tocoferóis, os tocotrienóis deveriam aparecer localizados em tempos de migração menores que aqueles dos tocoferóis análogos. Diversos picos não identificados nos eletroferogramas dos óleos de palma virgem e gérmen de trigo (Figura 4.34) referem-se provavelmente aos tocotrienóis.

Como mostrado na Figura 4.35, os tocoferóis e diversos hidroxiaromáticos não identificados foram separados de um protetor labial contendo óleo de rícino e tocoferóis adicionados (Lipolèvres, La Roche-Posay); por ser uma amostra sólida, esta foi diluída com propanol na proporção respectiva de 1:4. As figuras 4.34 e 4.35 mostram a capacidade de aplicação deste procedimento para o controle de qualidade de matérias primas e produtos industriais contendo óleos vegetais.

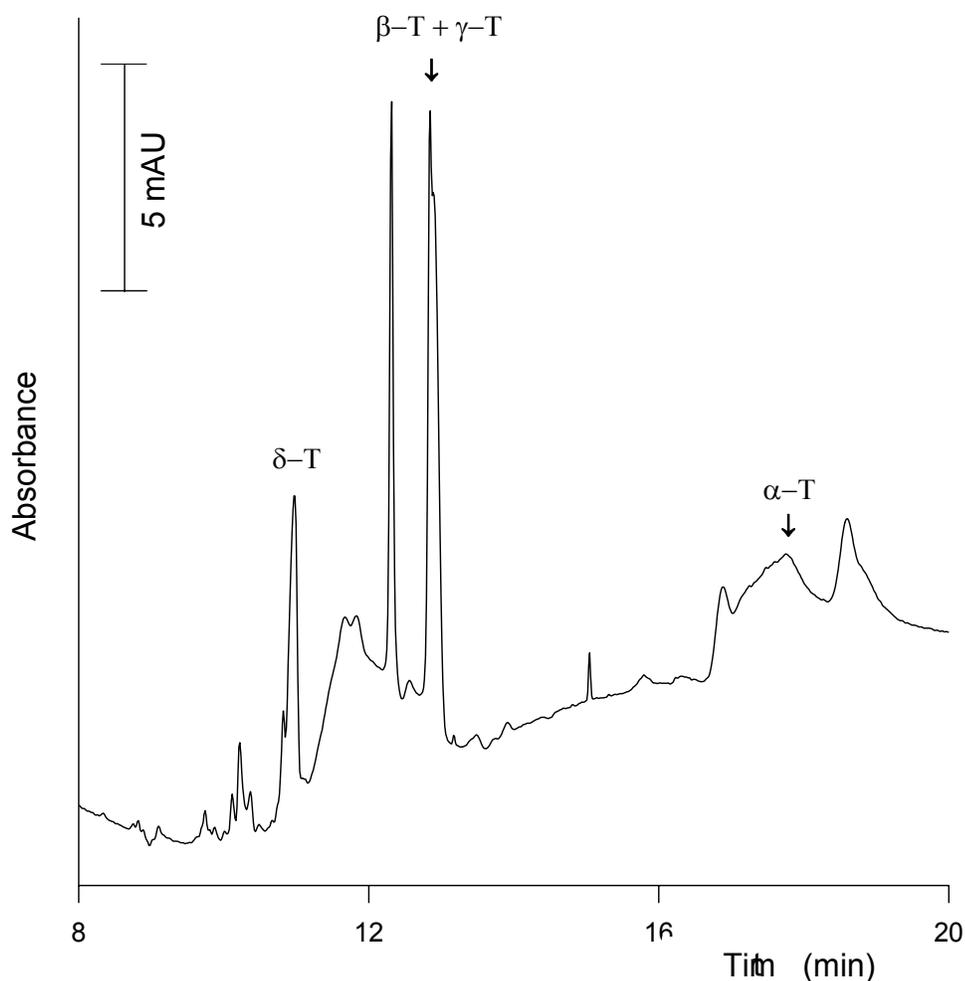


Figura 4.35 – Eletroferograma do protetor labial dissolvido em propanol (1:4), obtido com um BGE constituído por uma solução $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KOH em uma mistura de metanol/propanol (15:85, v/v); monitoramento feito a 220 nm.

Eletroferogramas similares ao da Figura 4.35, também mostrando os picos dos tocoferóis e outros hidroxiaromáticos não identificados foram obtidos por diluição com propanol (1:1p/v) de produtos farmacêuticos contendo óleo de amendoim (Progeffik, progesterona, Effik), óleo de rícino e terebentina (Otocerum, gotas para ouvido, Reig Jofré), também tendo-se observado o pico de $\beta + \gamma$ tocoferóis em suplemento alimentar contendo óleo de plantas das famílias Onagraceae e Boraginaceae (Primuvit, Diet-SES). Na

Tabela XVI estão mostrados os tocoferóis e demais picos observados em preparações farmacêuticas contendo óleos vegetais variados.

Tabela XVI - Picos observados em diversas preparações farmacêuticas contendo óleos vegetais

Preparações (Laboratório)	Óleos	Picos observados
Lipolèvres, protetor labial (La Roche-Posay)	rícino com tocoferol adicionado	α -T, ($\beta + \gamma$)-T, δ -T e 9 não identificados
Progeffik, progesterona (Effik)	amendoim	α -T, ($\beta + \gamma$)-T, δ -T e 2 não identificados
Otocerum, gotas para ouvido (Reig Jofré)	rícino e terebentina	α -T, ($\beta + \gamma$)-T, δ -T e 8 não identificados
Primuvit, suplemento alimentar (Diet-SES)	plantas das famílias Onagraceae e Boraginaceae	($\beta + \gamma$)-T

4.7.2.4 Estudos quantitativos

Foram construídas curvas de calibração utilizando amostras de óleo de soja aditivadas com concentrações crescentes de α -tocoferol (6 pontos: de 120 até 720 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e δ -tocoferol (6 pontos de 200 até 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Empregou-se como padrão interno 1-naftol, que produziu um pico nítido com tempo de migração de aproximadamente 7 min, portanto, menor que aqueles mostrados pelos componentes naturais do óleo. Assim, preparou-se uma solução a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 1-naftol em propanol e diluíram-se as amostras de óleo na proporção de 1:1 com esta solução, sendo realizada na sequência a injeção no capilar.

Obtiveram-se relações lineares entre a área dos picos e a concentração, sendo determinados os coeficientes de correlação $r^2 = 0,992$ e $0,999$ para α -tocoferol e δ -

tocoferol, respectivamente, e as inclinações das duas curvas de calibração foram estatisticamente as mesmas. Desta forma, uma única curva de calibração obtida com um dos tocoferóis pode ser usada para avaliar a concentração dos outros componentes da série. As concentrações encontradas no óleo de soja refinado, aplicando-se o método da adição de padrão foram 29, 269 e 96 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para α -tocoferol, $(\beta + \gamma)$ -tocoferol e δ -tocoferol, respectivamente. Tomando-se as variações na linha base entre os picos, estimou-se o limite de detecção para os tocoferóis entre 3 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o qual é menor do que os valores descritos pelos procedimentos de cromatografia eletrocínética capilar para os quais este limite é de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.⁵³

4.8 REFERÊNCIAS

-
- ¹ Budavari, S. (Ed.). *The Merck Index: an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals*. 12th. Merck & CO Inc.: New Jersey, 1996.
- ² Lide, D.R. (Edt.). *Handbook of Chemistry and Physics*. 78th. CRC Press: Boca Raton, 1997-1998.
- ³ Cazabat, A.M.; Langevin, D.; *J. Chem. Phys.* **1981**, 74, 3148.
- ⁴ Hellweg, T.; Von Klitzing, R.; *Physica A* **2000**, 283, 349.
- ⁵ Patzlaff, T.; Janich, M.; Seifert, G.; Graener, H.; *Chem. Phys.* **2000**, 261, 381.
- ⁶ Kozlovich, N.; Puzenko A.; Alexandrov, Y.; Feldman, Y.; *Colloids Surf. A* **1998**, 140, 299.
- ⁷ Eicke, H.F.; Borkovec, M.; Das-Gupta, B.; *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 314.
- ⁸ Alvares, E.; García-Rio, L.; Mejuto, J.C.; Navaza, J.M.; Pérez-Juste, J.; *J. Chem. Eng. Data*, **1999**, 44, 846.
- ⁹ Hall, D.G.; *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 429.
- ¹⁰ Pan, H.Y.; *Chem. Phys. Letters* **1991**, 185, 344.
- ¹¹ Bumajdad, A. Eastoe, J.. *J. Colloid and Interface Sci.* **2004**, 274, 268.
- ¹² Larsen, J.W.; Tepley, L.B.; *J. Colloid Interf. Sci.* **1974**, 49, 113.
- ¹³ Miyagishi, S.; *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1975**, 48, 2349.
- ¹⁴ Hamdlyyah, M.A. Al-Mansour, L.. *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 2236.
- ¹⁵ Stilbs, P.; Rapacki, K.; Lindman, Björn; *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, 95, 583.
- ¹⁶ Myers, S.A.; Mackay, R.A.; Btajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* **1993**, 65, 34.
- ¹⁷ Mackay, R.A.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **1981**, 15, 131.
- ¹⁸ Georges, J., Berthod, A.; *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 175, 143.
- ¹⁹ Pohjakallio, M., Sundholm, G., Talonen, P.; *J. Electroanalytical Chem.* **1996**, 401, 191.
- ²⁰ Chen, J.; Ikeda, O.; Aoki, K.; *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 496, 88.
- ²¹ Morikita, T.; Yamamoto, T.; *J. Organometallic Chem.* **2001**, 637-639, 809.

-
- ²² Santhanalakshmi, J.; Anadhi, K.; *J. Colloid Interf. Sci.* **1995**, *176*, 226.
- ²³ Tomkins, R.P.T.; Popovych, O.; *Nonaqueous Solution Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, 1979.
- ²⁴ Beckmann, A., Schneider, A., Gründler, P.; *Electrochem. Communications* **1999**, *1*, 46.
- ²⁵ Mackay, R.A.; Myers, S.A.; Bodalbhai, L.; Brajter-Toth, A.; *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1084.
- ²⁶ Mo, C.; Zhong, M.; Zhong, Q.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *493*, 100.
- ²⁷ Klier, J.; Tucker, C.J.; Kalantar, T. H.; Green, D.P.; *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1751.
- ²⁸ Amatore, C.; Maisonhaute, E.; Simonneau, G. ; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *486*, 141.
- ²⁹ Amatore, C. In *Microelectrodes*, Fleischmann, M.; Pons, S.; Rolison, D.R.; Schmidt, P.; *Ultramicroelectrode*, Datatech Systems, Inc., 1987.
- ³⁰ Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods*, Wiley & Sons, Inc.: New York, Capítulo 4, 1980.
- ³¹ Stulik, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Marecek, V.; Kutner, W.; *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1483.
- ³² Cassoux, P.; Dartiguepeyron, R.; Fabre, P.L.; Montazon, D.; *Electrochim. Acta* **1985**, *30*, 1485.
- ³³ Charlot, G.; Badoz-Lambling, J.; Trémillon, B.; *Les Réactions Électrochimiques*, Masson: Paris, 1959.
- ³⁴ Daniele, S.; Baldo, M.A.; Bragato, C.; *Electrochem. Comm.* **1999**, *1*, 37.
- ³⁵ Greef, R.; Peat, R.; Peter, L.M.; Pletcher, D.; Robinson, J.; *Instrumental Methods in Electrochemistry*, New York: John Wiley & Sons, 1985.
- ³⁶ Ohsawa, Y.; Aoyagui, S.; *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *136*, 353.
- ³⁷ Zambiasi, R.C.; *PhD. Thesis, The Role of Endogenous Lipid Components on Vegetable Oil Stability*, University of Manitoba, Canada, 1997.
- ³⁸ Lund, H.; Baizer, M. M.; *Organic Electrochemistry*, 3rd ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990
- ³⁹ Fung-Kee-Fung, C. A.; Post, S.; *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **2001**, *24*, 1133.
- ⁴⁰ Altria, K.D.; Broderick, M.F.; Donegan, S.; Power, J.. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 645.

-
- ⁴¹ Esteve-Romero, J. S.; Simó-Alfonso, E. F.; Alvarez-Coque, M. C. G.; Ramis-Ramos, G.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *235*, 317.
- ⁴² Noguera-Ortí, J. F.; Villanueva-Camañas, R. M.; Ramis-Ramos, G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387*, 127.
- ⁴³ Sebastiano, R.; Lapadula, M.; Righetti, P.G.; Gelfi, C.; Citterio, A.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 4189.
- ⁴⁴ Pelizzetti, E.; Pramauro, E.; *Anal. Chim. Acta* **1985**, *169*, 1.
- ⁴⁵ Rychlovsky, P.; Nemcová, I.; *Talanta* **1988**, *35*, 211.
- ⁴⁶ Ramis-Ramos, G.; Esteve-Romero, J. S.; García-Alvarez-Coque, M. C.; *Anal. Chim. Acta* **1989**, *223*, 327.
- ⁴⁷ Porras, S. P.; Riekkola, M. L.; Kenndler, E.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1485.
- ⁴⁸ Demianova, Z.; Sirén, H.; Kuldvee, R.; Riekkola, M. L.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 4264.
- ⁴⁹ Calmet-Fontané, J.; García-Monjo, J.; *Manual Práctico del Laboratorio Químico y Farmacéutico*, Barcelona, 1979.)
- ⁵⁰ Riekkola, M. L.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3865.
- ⁵¹ Van Slyke, D. D.; *J. Biol. Chem.* **1922**, *52*, 525.
- ⁵² Kamal-Eldin, A.; Görden, S.; Pettersson, J.; Lampi, A. M.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 217.
- ⁵³ Fanali, S.; Catarcini, P.; Quaglia, M. G.; Camera, E.; Rinaldi, M.; Picardo, M.; *J. Pharm. Biom. Anal.* **2002**, *29*, 973.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROEMULSÕES

Microemulsões de água em óleo de soja contendo diversos co-surfactantes, apresentaram gotículas de dimensões nanométricas. Quando preparadas com os co-surfactantes 3-metil-1-butanol, pentanol e hexanol, sua estabilidade termodinâmica se manteve entre 10 e pelo menos 70 °C, para os dois primeiros compostos e entre 18 e pelo menos 70 °C para o último. A estabilidade termodinâmica das microemulsões depende ainda da concentração de eletrólitos dissolvidos no meio, havendo, para cada composição, uma concentração limite acima da qual ocorre a desestabilização. De modo geral, o aumento do teor de co-surfactante em relação ao surfactante conferiu maior estabilidade termodinâmica às diferentes composições de microemulsões.

As gotículas mostraram um caráter de difusão translacional, não sendo detectada a influência de movimento rotacional nos resultados de espalhamento de luz. O menor raio hidrodinâmico das gotículas nas microemulsões preparadas com 3-metil-1-butanol, 2-pentanol e ciclohexanol em relação aos demais álcoois investigados, evidenciou a influência de efeitos estéricos na interface gotícula/óleo, bem como da polaridade da fase oleosa. Com o aumento da temperatura o raio hidrodinâmico diminuiu, indicando que as gotículas não tendem a se agregar.

Os valores de condutividade elétrica aumentaram com a temperatura e com o conteúdo de água na microemulsão. Entretanto, para o mesmo conteúdo de água o valor da condutividade elétrica foi maior para a microemulsão preparada com pentanol, do que para

qualquer outro álcool testado, indicando que a geometria, a viscosidade, a solubilidade do álcool em água e a constante dielétrica influenciaram na condutividade da microemulsão.

5.2 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

Valores de condutividade elétrica maiores que os obtidos para o óleo de soja e para a água deionizada e uma janela eletroquímica de aproximadamente 3 V foram encontrados tanto para a microemulsão preparada com o pentanol como para aquela com o 3-metil-1-butanol nas condições experimentais deste estudo.

Medidas eletroquímicas realizadas na microemulsão evidenciaram a oxidação da água das gotículas e do ferroceno e a redução do ácido oléico. Os menores valores de $D_{w/o}$ obtidos a partir das medidas eletroquímicas, em relação aos obtidos por espalhamento de luz dinâmico, mostraram que o transporte das moléculas de água até a superfície do eletrodo é provavelmente dificultado, simultaneamente, por um componente de migração desfavorável conferido por uma carga líquida positiva nas gotículas; pela barreira apolar em torno das mesmas e pela difusão das moléculas de água do interior das gotículas para a superfície do eletrodo, antes da reação de transferência de carga acontecer.

Também está relacionada com a migração desfavorável das gotículas, uma taxa de oxidação mais baixa para as moléculas de água na presença de ferroceno, que é acentuada pelo incremento da concentração de ferricínio próximo ao eletrodo, evidenciando novamente, a presença de uma carga positiva na gotícula da microemulsão.

Os valores de corrente limite para a oxidação da água são menores quando 3-metil-1-butanol é utilizado como co-surfactante, do que quando pentanol é empregado, mostrando assim que a cinética dos processos de transferência de carga é menos favorável para a primeira microemulsão.

Ensaio de oxidação do ferroceno em microemulsão w/o por voltametria cíclica em um ultramicroeletrodo de Pt, empregando velocidades de varredura convencionais, evidenciaram que os baixos coeficientes de difusão neste meio permitem a realização de medidas em estado transiente, o que não é possível em meio aquoso. Estes ensaios

evidenciaram ainda que a oxidação do ferroceno na microemulsão se aproxima das condições de quasi-reversibilidade.

A dependência linear com a concentração das correntes limites anódica e catódica, respectivamente, na oxidação do ferroceno e na redução do ácido oléico, indica que determinações eletroanalíticas quantitativas, empregando ultramicroeletrodos, podem ser conduzidas em microemulsões de água em óleo de soja.

5.3 ESTUDOS POR ELETROFORESE CAPILAR

5.3.1 Empregando micromulsões

Utilizando cromatografia eletrocínética de microemulsões reversas, obteve-se a separação eficiente de uma ampla variedade de solutos neutros e aniônicos de diferentes hidrofobicidades.

Empregando-se uma microemulsão de w/o produziram-se separações dentro de uma grande janela de tempos de migração (6,5 e 10 min a pHs 8,4 e 7,0). Esta microemulsão exibiu alta condutividade (mesmo na ausência de tampão), correntes muito estáveis e uma tolerância superior a dos tampões aquosos à flutuações de temperatura e de voltagem.

Obteve-se uma adequada reprodutibilidade dos tempos de migração relativos através do condicionamento do capilar com um sal quaternário de amônio e uso dos picos do salicilato e do ftalato como referência, minimizando assim, as oscilações nos tempos de migração devidas às variações do EOF.

Ftalato e piromelitato mostraram ser os marcadores mais adequados do tempo de migração das gotículas aquosas e, na ausência de marcadores confiáveis do EOF, é possível usar as mobilidades dos solutos em relação à mobilidade aparente das gotículas; ainda, reduziu-se a incerteza devida às variações do EOF, expressando a mobilidade dos solutos como uma fração da mobilidade do ftalato, o que conferiu um significado físico-

químico para o uso dos picos do salicilato e do ftalato como referências dos tempos de migração.

Tanto amostras hidrofóbicas como hidrofílicas podem ser injetadas nas microemulsões estudadas, que apresentaram ainda como característica a compatibilidade com óleos vegetais e outras amostras de gordura, as quais podem ser diretamente injetadas após uma simples diluição com a microemulsão (até 30 % de gordura é tolerada sem segregação de fase).

5.3.2 Empregando meios não aquosos

O procedimento de injeção direta descrito neste trabalho, permitiu obter rapidamente um perfil característico e reprodutível dos biofenóis presentes em óleos vegetais, o qual pode ser útil para a caracterização e propósito de detecção de fraudes.

Tocoferóis, ácidos carboxílicos aromáticos e antioxidantes sintéticos, como BHA e BHT, também podem ser resolvidos. O procedimento pode ainda ser usado para quantificar estes compostos.

A injeção direta apresenta como vantagem, em relação à extração prévia, a redução da manipulação da amostra, responsável muitas vezes por baixas recuperações dos analitos e, conseqüente minimização dos riscos de alterar sua concentração.

ANEXO