

**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-graduação em Química**

**DESENVOLVIMENTO DE MODALIDADE  
CROMATOGRÁFICA BASEADA NA IDENTIDADE DIGITAL  
OXIDATIVA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**

**Vanessa Kienen**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira**

Maringá, Março de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, por estar sempre ao meu lado iluminando o meu caminho, por me dar forças para vencer todos os obstáculos e por conceder a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos mudar; coragem para mudar aquelas que podemos e sabedoria para distinguir uma das outras.

Aos meus pais, pois de vocês recebi o dom mais precioso a Vida. Já por isso sou infinitamente grata. Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela, mas sim revestiram minha existência com amor, carinho, incentivo, compreensão e dedicação.

Aos meus familiares e amigos, pelo amor e incentivo em todos os momentos de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças em todos os momentos.

Ao meu orientador e amigo Prof. Cláudio, pela orientação, paciência, confiança, amizade, incentivo e por compartilhar não apenas seus conhecimentos acadêmicos, mas também suas experiências de vida;

Aos Professores e amigos Willian, Juliana, Vitor, Maria Helena, Jesuí, Emerson, Elza, Helena, Fernanda, Daniela, Eduardo, Marcos, Adley e Edvani pelo incentivo, ajuda, colaboração, pelas idéias e pelos ensinamentos no laboratório e na vida.

Ao Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade;

Aos amigos Valquíria, Silvia, Janksyn, Lucas, Débora, Jaime, Guilherme, Danielle, Marina, Eduardo, Rafaela, Camila, Mirian, Aline, Paula, Joana, Luana, Helton, André, Solange, Michely, George, Manuela, Valéria, Mariele, Vagner e Victor pela amizade, incentivo e por me ajudar sempre nas horas em que mais precisei;

Ao Claudemir, Cristina, Edson, Ivania e Ana pela amizade e disposição em ajudar sempre que necessário;

Aos meus pais, Waldemiro e Lia pelo carinho, incentivo e compreensão;

A minha avó Anna por todo carinho e incentivo;

A toda minha família e amigos.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte da minha vida e que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

*Muito Obrigada.*

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
Lista de Abreviações .....	xiii
Resumo .....	xvii
Abstract.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Cromatografia.....	6
2.1.1. Classificação pela forma física.....	7
2.1.2. Classificação pela fase móvel.....	7
2.1.3. Classificação pela fase estacionária.....	8
2.1.4. Classificação pelo modo de separação .....	8
2.2. Cromatografia Líquida .....	9
2.2.1. Detectores .....	12
2.2.2. Classificação dos detectores .....	12
2.2.3. Detectores baseados na absorção de luz no UV/Vis. ....	13
2.2.3.1. Detectores baseados na absorção da radiação na região do UV /Vis. ....	14
2.2.3.1.1. Detectores UV de comprimento de onda fixo .....	15
2.2.3.1.2. Detectores UV de comprimento de onda variável.....	16
2.2.4. Detectores baseados em Espectrometria de Massas.....	17
2.2.5. Detectores baseados na Ressonância Magnética Nuclear .....	20
2.3. Impresão Digital .....	23
2.4. Processos Oxidativos Avançados .....	24
2.4.1. Processo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV.....	26
2.4.2. Processo Fotocatalítico.....	27
2.4.3. Processo Fenton.....	29
2.4.4. Processo Foto-Fenton .....	32
2.5. Sistemas de Análises Químicas em Fluxo.....	34
2.6. Extração em Fase Sólida.....	39
2.7. Análise Térmica.....	43

3.OBJETIVOS.....	49
3.1. Objetivo geral .....	49
3.2. Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1. Materiais .....	50
4.2. Equipamentos e Acessórios .....	50
4.2.1. Espectrofotômetro .....	50
4.2.2. Potenciômetro.....	51
4.2.3. Extração em Fase Sólida .....	51
4.2.4. Cromatógrafo Líquido.....	51
4.2.5. Fonte de Luz Ultravioleta.....	52
4.2.6. Sistema de Análise por Injeção Sequencial.....	52
4.2.7. Liofilizador .....	53
4.2.8. Ressonância Magnética Nuclear.....	53
4.2.9. Espectrômetro de massas.....	54
4.2.10. Análise Térmica.....	54
4.3. Métodos .....	54
4.3.1. Preparação das soluções .....	54
4.3.2. Estudo de degradação dos compostos .....	55
4.3.3. Análise das Amostras .....	56
4.3.4. Condições das análises .....	57
4.3.4.1. Análise por Cromatografia Líquida.....	57
4.3.4.2. Análise por Ressonância Magnética Nuclear .....	58
4.3.4.3. Espectrometria de Massas .....	59
4.3.4.4. Análise Termogravimétrica. ....	59
4.3.5. Ensaio com Riboflavina e a Cianocobalamina. ....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
5.1. Ensaio com Riboflavina.....	60
5.2. Ensaio com Cianocobalamina.....	105
6. CONCLUSÕES .....	133
7.REFERÊNCIAS .....	135

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Princípio da detecção no UV/VIS. ....	14
Figura 2. Mecanismo simplificado da fotoativação de um semicondutor. ....	28
Figura 3. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA). ....	35
Figura 4. Sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA). ....	38
Figura 5. Classificação das técnicas de extração de acordo com a natureza do solvente utilizado. ....	40
Figura 6. Principais etapas empregadas em EFS visando o isolamento de um composto ou classe de compostos. ....	42
Figura 7. Curva termogravimétrica(TG) em vermelho e Curva termogravimétrica derivativa (DTG) em azul. ....	45
Figura 8. Curva típica de uma análise térmica diferencial. ....	47
Figura 9. Cromatógrafo Líquido. ....	52
Figura 10. Representação esquemática da montagem do sistema injeção sequencial (SIA) para a otimização das reações de clivagem dos composto. ....	53
Figura 11. Estrutura da Riboflavina. ....	60
Figura 12. Espectro eletrônico da riboflavina em solução aquosa. ....	61
Figura 13. Espectro eletrônico da reação degradação da riboflavina com o reagente de Fenton. ....	62
Figura 14. Cromatograma da solução padrão da Riboflavina 20,0 mg L <sup>-1</sup> . . ....	63
Figura 15. Curva de calibração da Riboflavina nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20 e 25 mg L <sup>-1</sup> . . ....	64
Figura 16. Representação esquemática do sistema SIA utilizado nas reações de Fenton. ....	65
Figura 17. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 8 para solução 1 e 2. ....	67
Figura 18. Representação esquemática do sistema SIA utilizado nas reações de Fenton sem a utilização do eluente no sistema. ....	68
Figura 19. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 9 para Amostras 3 e 4. ....	70

Figura 20. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 10 investigação da concentração da solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0; 0,1; 0,01; 0,005 e 0,001 mol L <sup>-1</sup> com monitoramento em 270 nm, sendo 1 riboflavina e 2 produto de oxidação. ....	73
Figura 21. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 10 investigação da concentração da solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0; 0,1; 0,01; 0,005 e 0,001 mol L <sup>-1</sup> com monitoramento em 295 nm, sendo 1 riboflavina e 2 produto de oxidação. ....	74
Figura 22. Curva de calibração da riboflavina nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; 15,0; 18,0; 24,0 e 28,0 mg L <sup>-1</sup> com injeção de 50 µL de amostra e monitoramento em 295 nm. ....	75
Figura 23. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 11 modificação do tamanho da bobina de reação e com/sem parada da amostra na bobina de reação, sendo 1 riboflavina e 2, 3 produtos de oxidação. ....	77
Figura 24. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 11 investigação da concentração de Fe(II) 100,0; 200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 1000,0 mg L <sup>-1</sup> , sendo 1 riboflavina e 2, 3 e 4 produtos de oxidação. ....	78
Figura 25. Cromatograma da riboflavina utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 12 com a investigação do volume do eluente (álcool etílico) 300, 250 e 200 µL. ....	81
Figura 26. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 13 investigação da utilização de luz UV. sendo 1 riboflavina e 2, 3 produtos de oxidação. ....	83
Figura 27. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 13 otimização da concentração da solução de Fe(II) 900,0 1000,0 1200,0 e 1500,0 mg L <sup>-1</sup> , sendo 1 riboflavina e 2, 3, 4 e 5 produtos de oxidação. ....	85
Figura 28. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 14 verificação da reprodutibilidade dos resultados e possibilidade de utilização da FE C18 e C8. Sendo 1,2 FE C8 e 3,4 e 5 FE C18. ....	88

Figura 29. Cromatograma da riboflavina e identidade digital oxidativa da riboflavina obtida após oxidação parcial utilizando-se da reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em sistema SIA com as porcentagens de cada produto de oxidação. . . . .	90
Figura 30. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 1 da riboflavina com tempo de retenção de 17,5 min. . . . .	91
Figura 31. Espectro UV/Vis do pico 2 (parcela da riboflavina que não sofreu oxidação) com tempo de retenção de 21,9 min. . . . .	92
Figura 32. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 3 da riboflavina com tempo de retenção de 29,5 min. . . . .	92
Figura 33. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 4 da riboflavina com tempo de retenção de 32,0 min. . . . .	93
Figura 34. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 5 da riboflavina com tempo de retenção de 34,4 min. . . . .	93
Figura 35. Espectro de RMN de H1 para a riboflavina em DMSO. . . . .	96
Figura 36. Espectro de RMN de H1 para o intermediário 4 em DMSO. . . . .	96
Figura 37. Espectro de RMN de H <sup>1</sup> para a riboflavina e a amostra degradada em DMSO. ....	97
Figura 38. Ampliação do Espectro de RMN de H <sup>1</sup> para a riboflavina e amostra sob a reação de Fenton em DMSO na região de deslocamento químico de 8 ppm. . . . .	98
Figura 39. Estrutura da Isoaloxazina. . . . .	98
Figura 40. Curva termogravimétrica (TG e DTG). . . . .	99
Figura 41. Curva termogravimétrica (TG e DTG) para a riboflavina. . . . .	100
Figura 42. Estrutura da Riboflavina com designação do anel isoalozaxina e ribitol. . . . .	101
Figura 43. Estrutura do produto de oxidação 1(242,23 g mol <sup>-1</sup> ) da riboflavina. . . . .	102
Figura 44. Estrutura do produto de oxidação 3(256,26 g mol <sup>-1</sup> ) da riboflavina. . . . .	103
Figura 45. Estrutura do produto de oxidação 4(218,22 g mol <sup>-1</sup> ) da riboflavina. . . . .	103
Figura 46. Estrutura do produto de oxidação 5(190,21 g mol <sup>-1</sup> ) da riboflavina. . . . .	104
Figura 47. Estrutura da Cobalamina. . . . .	105
Figura 48. Espectro eletrônico da cianocobalamina em solução aquosa. . . . .	107
Figura 49. Espectro de absorção na região do UV/Vis para a reação de degradação da cianocobalamina com o reagente de Fenton. . . . .	108
Figura 50. Cromatograma da solução padrão da Cianocobalamina 20,0 mg L <sup>-1</sup> . . . . .	109

Figura 51. Curva de calibração da Cianocobalamina nas concentrações de 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg L <sup>-1</sup> . .....	110
Figura 52. Cromatograma da solução padrão da cianocobalamina utilizando o sistema SIA com a otimização do eluente (etanol, etanol 17% e etanol 30%) utilizado na extração em fase sólida. ....	112
Figura 53. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 18. ....	114
Figura 54. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 19 investigação da concentração da solução de Fe(II) 200,0; 1000,0; 1200,0 e 1500,0 mg L <sup>-1</sup> . ....	116
Figura 55. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 19 modificação da vazão da FM 0,6; 0,8 e 1,0 mL min <sup>-1</sup> . ....	117
Figura 56. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 19 modificação no gradiente de eluição conforme as especificações da Tab 20 a 23.....	120
Figura 57. Curva de calibração da Cianocobalamina nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 20,0 e 30,0 mg L <sup>-1</sup> com Fase A/Fase C. ....	121
Figura 58. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 24 verificação da reprodutibilidade dos resultados. ....	123
Figura 59. Cromatograma da cianocobalamina e identidade digital oxidativa da cianocobalamina obtida após oxidação parcial utilizando-se reação Fenton (Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em sistema SIA com as porcentagens de cada produto de oxidação. ....	124
Figura 60. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 1 da cianocobalamina com tempo de retenção de 12,3 min. ....	125
Figura 61. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 2 da cianocobalamina com tempo de retenção de 13,4 min. ....	126
Figura 62. Espectro UV/Vis do pico 3 ( parcela da cianocobalamina que não sofreu oxidação) com tempo de retenção de 14,5 min. ....	126

Figura 63. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 4 da cianocobalamina com tempo de retenção de 23,3 min. ....	127
Figura 64. Curva termogravimétrica (TG e DTG) para a cianocobalamina. ....	128
Figura 65. Curva termogravimétrica diferencial (DSC) da cianocobalamina. ....	129
Figura 66. Estrutura da Cianocobalamina com as possíveis ordens de clivagem. ....	131
Figura 67. Estrutura do produto de oxidação 1 ( $1223,4 \text{ g mol}^{-1}$ ) da cianocobalamina. ....	131
Figura 68. Estrutura do produto de oxidação 2 ( $1077,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) da cianocobalamina. ....	132
Figura 69. Estrutura do produto de oxidação 4 ( $912,80 \text{ g mol}^{-1}$ ) da cianocobalamina. ....	132

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Potenciais padrão de redução de alguns oxidantes em meio ácido. ....	24
Tabela 2. Tipos de Processos Oxidativos Avançados. ....	25
Tabela 3. Comparativo entre características básicas de SIA e FIA. ....	36
Tabela 4. Condições para a reação de degradação da riboflavina e cianocobalamina com o reagente de Fenton. ....	55
Tabela 5.. Condições do estudo da reação de degradação com o reagente de Fenton. ....	56
Tabela 6. Método de eluição utilizado no sistema cromatográfico CL para a análise da riboflavina.....	57
Tabela 7. . Método de eluição utilizado no sistema cromatográfico CL para a análise da cianocobalamina. ....	58
Tabela 8. Sequência de passos para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA testes iniciais (amostras 1 e 2). ....	66
Tabela 9. Sequência de passos para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA para as Amostras 3 e 4. ....	69
Tabela 10. Sequência de passos para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA, modificação da concentração solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	71
Tabela 11. Sequência de passos para a reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA com a modificação do tamanho da bobina de reação e com/sem parada da amostra na bobina de reação. ....	76
Tabela 12. Sequência de passos para realizar a degradação da riboflavina pelo sistema SIA, modificação do volume de eluente 300, 250 e 200 µL. ....	80
Tabela 13. Sequência de passos para a reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA com a inserção de luz (UV) na bobina de reação. ....	82
Tabela 14. Sequência de passos otimizados para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA. ....	87
Tabela 15. Relação entre temperatura, massa e a massa molar da riboflavina a partir da análise termogravimétrica. ....	102
Tabela 16. Estrutura e nome da cobalamina de acordo com a substituição do grupo R. ....	106

Tabela 17. Sequência de passos utilizados pelo sistema SIA para cianocobalamina com a otimização do eluente (etanol, etanol 17% e etanol 30%) utilizado na extração em fase sólida. ....	111
Tabela 18. Sequência de passos utilizados pelo sistema SIA para realizar a degradação da cianocobalamina com reagente de Fenton. ....	113
Tabela 19. Sequência de passos utilizados pelo sistema SIA para realizar a degradação da cianocobalamina com reagente de Fenton verificação da concentração da solução de Fe(II). ....	115
Tabela 20. Especificações do gradiente de eluição (90-10)% para a análise da cianocobalamina. ....	118
Tabela 21. Especificações do gradiente de eluição (80-20)% para a análise da cianocobalamina. ....	118
Tabela 22. Especificações do gradiente de eluição (75-25)% para a análise da cianocobalamina. ....	119
Tabela 23. Especificações do gradiente de eluição (70-30)% para a análise da cianocobalamina. ....	119
Tabela 24. Sequência de passos otimizados para realizar a degradação da cianocobalamina com a reação de Fenton pelo sistema SIA. ....	122
Tabela 25. Relação entre temperatura, massa e massa molar da cianocobalamina a partir da análise termogravimétrica. ....	130

## LISTA DE ABREVIACES

Abs	Absorbância
A	Analito
AE	Analito extraído
<i>b</i>	Caminho ptico
Bc	Banda de condução
Bv	Banda de valência
BC	Bobina Coletora
BR	Bobina de Reação
<i>c</i>	Concentração
$\lambda$	Comprimento de onda
C	Carregador (gua destilada)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL	Cromatografia Líquida (mesmo termo que CLAE)
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
CP	Cromatografia em Papel
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia em Fase Gasosa
CSC	Cromatografia Supercrítica
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
CL-UV/Vis	Cromatografia Líquida com arranjo fotodiodo na região do UV/Vis
CL-UV/Vis-EM	Cromatografia Líquida com análise sequencial com detector arranjo fotodiodo na região do UV/Vis e por Espectrometria de Massas

CL-RMN	Cromatografia Líquida acoplada à Ressonância Magnética Nuclear
CL-EFS-RMN	Cromatografia Líquida associada a Extração em Fase Sólida com Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
C8	Octilsilano
C18	Octadecilsilano
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Álcool etílico
CH <sub>3</sub> OH	Álcool metílico
CHCl <sub>3</sub>	clorofórmio
C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Riboflavina (Vitamina B2)
C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	Cianocobalamina (Vitamina B12)
D	Descarte
D <sub>2</sub> O	Água Deuterada
DMSO	Dimetil Sulfóxido Deuterado
DMFS	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
DTG	Análise Termogravimétrica Derivativa
DTA	Análise Térmica Diferencial
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
$\epsilon$	Absortividade Molar
$e^-$	Elétron
$e^-/h^+$	Elétron/lacuna
$e^-_{BC}$	Elétron na Banda de Condução
EM	Espectrometria de Massas
ELL	Extração Líquido-Líquido
EAS	Extração Acelerada por Solvente
EFS	Extração em Fase Sólida

ES	Extração fluido Supercrítico
ESBA	Extração Sortiva em Barras de Agitação
EPH	Eletrodo Padrão de Hidrogênio
ESI	Eletrospray
F	Solução de Fe(II)
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FS	Fase Sólida
Fe(II)	Solução de ferro (II) (sulfato ferroso)
Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fenton
Fe(III)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fenton like
Fe(II)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	Foto Fenton
FIA	Análise por injeção em Fluxo
H	Solução de peróxido de hidrogênio
$h^+_{BV}$	Lacuna na banda de valência
$h\nu$	Energia na forma de radiação ultravioleta
HCl	Ácido Clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	Peróxido de hidrogênio com radiação Ultravioleta
HO•	Radical peroxil
HO <sub>2</sub> •	Radical hidroperoxil
IPA	Ionização à Pressão Atmosférica
ICPA	Ionização Química à Pressão Atmosférica
IR	Infravermelho
m/z	Relação massa/carga
MEFS	Microextração em Fase Sólida

MELL	Microextração Dispersiva Líquido-Líquido
MFL	Microextração em Fase Líquida
MFC	Microextração em Fluxo Contínuo
$\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$	Acetato de amônio
NaOH	Hidróxido de Sódio
POA	Processos Oxidativos Avançados
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SIA	Análise por Injeção Sequencial
TG	Análise Termogravimétrica
$\Delta T$	Delta de temperatura
$\text{TiO}_2$	Dióxido de Titânio
UV/Vis	Radiação ultravioleta e visível
Vis	Vísivel
VS	Válvula Solenóide

# **Desenvolvimento de Modalidade Cromatográfica Baseada na Identidade Digital Oxidativa de Compostos Orgânicos.**

Palavras Chaves: Cromatografia Líquida, Processos Oxidativos Avançados (reações de Fenton), Análise por Injeção Sequencial e Identidade Digital Oxidativa.

Autora: Vanessa Kienen

Orientador: Prof. Dr Cláudio C. Oliveira

## **RESUMO**

No presente trabalho uma nova modalidade cromatográfica baseada na identidade digital oxidativa de compostos orgânicos foi desenvolvida possibilitando a separação e identificação de substâncias orgânicas utilizando a cromatografia líquida com detectores espectrofotométricos. Para o desenvolvimento desta modalidade cromatográfica foi utilizado um sistema de análise por injeção sequencial (SIA - *Sequential Injection Analysis*) em conjunto com as reações de Fenton ( $\text{Fe(II)}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para promover a clivagem de compostos orgânicos eluídos da coluna cromatográfica, bem como para gerenciar o processo de extração em fase sólida para isolamento/pré-concentração, e re-introdução dos produtos da reação no cromatógrafo líquido para obtenção da identidade oxidativa.

Este método consiste na associação da cromatografia líquida com detectores espectrofotométricos com arranjo fotodiodo (UV/Vis), utilizando as reações de Fenton para promover a clivagem dos compostos, possibilitando o desenvolvimento de uma modalidade cromatográfica que é baseada em uma primeira separação dos constituintes orgânicos de uma amostra por cromatografia líquida, seguida de nova separação após oxidação parcial dos componentes desta amostra, o que permite obter sinais distintos para os dois cromatogramas. No primeiro, os picos de cada constituinte da amostra não submetida ao processo de oxidação

e no segundo, diversos picos para cada espécie analisada anteriormente que devem refletir os produtos formados após o processo de oxidação parcial dos constituintes da amostra, fornecendo um conjunto de dados relativos aos produtos formados que podem ser utilizados para fornecer a identidade digital oxidativa de cada composto separado.

Ao final do processo cromatográfico, os cromatogramas fornecem informações a respeito do tempo de retenção dos analitos, que podem ser relacionados com o tempo de retenção de substâncias presentes em soluções padrão, os espectros na região UV/Vis dos compostos analisados (riboflavina e cianocobalamina), bem como os sinais dos produtos de oxidação para cada espécie com seus respectivos espectros e a relação entre as áreas dos picos para cada espécie formada o que permitiu identificar com maior confiabilidade os compostos analisados. Com a obtenção das identidades digitais oxidativas da riboflavina e da cianocobalamina é possível utilizar o método proposto na separação e identificação de compostos orgânicos que são eluidos de uma coluna cromatográfica sem recorrer ao uso de equipamentos sofisticados e de alto custo como o espectrômetro de massas e a ressonância magnética nuclear.

# **Development of Chromatographic Modality Based on Digital Oxidative Identity of Organic Compounds.**

Key Words: Liquid Chromatography, Advanced Oxidation Processes (Fenton reactions), Sequential Injection Analysis and Oxidative Digital Identity.

Author: Vanessa Kienen

Adviser: Prof. Dr. Cláudio C. Oliveira

## **ABSTRACT**

In this paper a new method based on chromatographic digital oxidation of organic compounds has been developed enabling the separation and identification of organic compounds using liquid chromatography with spectrophotometric detectors. A sequential injection analysis (SIA) was used in conjunction with the Fenton reactions (Fe (II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) to promote cleavage of organic compounds eluted from the chromatography column and how to manage the process of solid phase extraction for isolation/preconcentration, and re-introduction of the reaction products in the liquid chromatograph to obtain the oxidative identity.

This approach combined liquid chromatography with photodiode array detectors (UV/Vis) using the Fenton reactions for to promote the cleavage of compounds, allowing the development of a chromatographic method that is based on an initial separation of the organic constituents a sample by liquid chromatography followed by further separated after partial oxidation of the components of the sample, which achieves distinct peaks for the two chromatograms. First, original peaks of each sample constituent unoxidized and second, several peaks for each species should reflect that the previously formed products after the

process of partial oxidation of the constituents of the sample, providing a set of data the products formed which was used to provide oxidative digital identity of each compound separately.

At the end of the chromatographic process, the chromatograms provide information regarding the retention time of the analyte, which is related to the retention time of substances in standard solutions, UV/Vis spectrum of the compounds analysis (riboflavin and cyanocobalamin) , as well as signs of oxidation products for each species with their respective spectra and the relationship between the peak areas for each species formed which enabled the identification with higher reliability compounds analyzed. With the acquisition of digital identities of oxidative riboflavin and cyanocobalamin is possible to use the proposed method for the separation and identification of organic compounds that are eluted from a chromatographic column without the use of sophisticated and expensive equipment as the mass spectrometer and the nuclear magnetic resonance.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento urbano e industrial há a necessidade de se desenvolver métodos analíticos que possibilitem análises de diversas amostras em diferentes áreas da ciência, bem como a necessidade de automação dos procedimentos de análises objetivando aumentar a capacidade de processamento de amostras e obter resultados com um maior grau de confiabilidade que, possam ajudar no desenvolvimento científico e tecnológico.

Dentre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua a separação dos analitos explorando as interações físico-químicas destes entre os solutos presentes em uma fase móvel e com os constituintes de uma fase estacionária <sup>[1]</sup>. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou mais recentemente designada como Cromatografia Líquida Moderna (CL),<sup>[2]</sup> é uma técnica analítica que permite a separação de compostos químicos antes da etapa de quantificação, evitando as interferências químicas e possibilitando a identificação e quantificação das espécies analisadas <sup>[1]</sup>.

No entanto, a identificação das substâncias separadas, muitas vezes, não ocorre de forma inequívoca, pois esta é feita corriqueiramente, através da comparação dos tempos de retenção dos componentes presentes nas amostras com os dos componentes presentes em soluções padrão. Quando se utiliza detectores espectrofotométricos na região do UV/Vis, o mais tradicional, a absorvância é o parâmetro de medida, no entanto, muitas substâncias orgânicas podem absorver radiação eletromagnética na região do UV/Vis, o que pode levar a erros na identificação de substâncias, principalmente devido a co-eluição de compostos.

Para resolver este problema, atualmente existe a tendência de se hifenar a cromatografia com outras técnicas, o que deu origem a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) ou com a ressonância magnética nuclear (CL-RMN) <sup>[1,3]</sup>.

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial de fornecer informações sobre a massa molar, bem como da estrutura dos analitos, além de possibilitar a análise de mistura em função dos fragmentos formados ( $m/z$ )<sup>[1,3]</sup>. O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas apresenta várias vantagens como alta seletividade, quantificação de picos sobrepostos, boa detectabilidade e a confirmação da identidade do analito mediante a informação da massa molar<sup>[1,3]</sup>.

A ressonância magnética nuclear (RMN), baseada na irradiação da amostra com radiação eletromagnética na região de radiofrequência, permite a identificação estrutural dos compostos com uma alta resolução<sup>[3]</sup>. O acoplamento CL-RMN permite a distinção das espécies químicas, principalmente nas análises de isômeros<sup>[4]</sup>.

No entanto, as duas técnicas hífenadas CL-EM e CL-RMN possuem como grande desvantagem o fato de ser uma técnica analítica de alto custo, o que dificulta a sua utilização em laboratórios de médio e pequeno porte.

Uma outra modalidade de análise que vem sendo desenvolvida são os métodos cromatográficos baseados na impressão digital (*fingerprint*) uma técnica que pode analisar diretamente os compostos químicos e fornecer sua possível identificação. A técnica utiliza-se da cromatografia líquida associada a detectores por arranjo de fotodiodo e os espectrometros de massas (CL-UV/Vis-EM) com base na comparação dos espectros na região do UV/Vis, com os espectros de massas permitindo de forma rápida a obtenção dos perfis dos sinais dos compostos através das impressões digitais<sup>[5]</sup>. Assim, os métodos cromatográficos baseados na impressão digital tem sido amplamente utilizada para análise de várias amostras.

Neste trabalho é proposta uma forma alternativa de se permitir a identificação de substâncias orgânicas sem a utilização de detectores EM e RMN, que consiste na utilização dos processos oxidativos avançados associado aos métodos cromatográficos como a cromatografia líquida acoplada a detectores espectrofotométricos, o que contribui para tornar a técnica analítica mais simples e menos onerosa.

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são processos que promovem a clivagem das ligações químicas através da formação do radical hidroxil, um reativo intermediário que possui um alto potencial de oxidação na ordem de 2.80V <sup>[6]</sup>. Geralmente os POA utilizam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, O<sub>2</sub> como substâncias oxidantes; UV, UV/Vis e ultra-som como formas de irradiação e íons de metal ou semicondutores como catalisadores <sup>[6,7]</sup>. Dependendo das condições experimentais, o radical hidroxil poderá reagir com o analito, levando a fragmentação parcial ou total destas espécies conduzindo, principalmente, a formação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O <sup>[8,9]</sup>. A taxa de degradação dos compostos depende do pH, da temperatura, das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de Ferro (II) e da estrutura química do analito <sup>[10]</sup>.

A não seletividade dos processos oxidativos avançados viabiliza a degradação de substratos de qualquer natureza química orgânica, <sup>[11]</sup> o que torna o processo viável na fragmentação dos compostos orgânicos de acordo com o princípio da espectrometria de massas.

A associação da cromatografia líquida com detectores espectrofotométricos com arranjo fotodiodo, utilizando as reações de Fenton para promover a clivagem dos analitos, pode possibilitar o desenvolvimento de uma modalidade cromatográfica que será baseada em uma primeira separação dos constituintes orgânicos de uma amostra por CL, seguida de nova separação após oxidação parcial dos componentes da amostra, o que deverá permitir obter picos distintos para os dois cromatogramas. No primeiro, os picos originais de cada analito da

amostra e no segundo, diversos picos para cada espécie analisada anteriormente que, devem refletir os produtos formados após o processo de oxidação parcial dos constituintes da amostra.

Espera-se que sob determinadas condições de oxidação, compostos orgânicos diferentes possam produzir produtos distintos após a oxidação, e que estes fornecerão a identidade digital oxidativa da espécie química que está sendo analisada. Ao final do processo cromatográfico, os cromatogramas fornecerão informações a respeito do tempo de retenção dos analitos, que pode ser relacionados com o tempo de retenção de substâncias presentes em soluções padrão; espectro na região UV/Vis dos compostos e sinais de 2 a 4 produtos do processo de oxidação para cada analito presente na amostra com seus respectivos espectros e relação entre as áreas dos picos de cada espécie formada, bem como o espectro UV/Vis destas, o que permitirá identificar com muito mais segurança a espécie que está sendo determinada sem recorrer a detectores de massas ou RMN.

Para a otimização dos parâmetros experimentais para desenvolver esta modalidade cromatográfica é essencial a automação dos experimentos de oxidação parcial para controle rigoroso do tempo e condições da reação, bem como permitir a re-introdução da amostra oxidada no cromatógrafo. Assim, foi utilizado sistemas de análises por injeção em fluxo que por definição são excelentes manipuladores de soluções para se efetuar estas operações.

Os sistemas de análise química por injeção em fluxo têm sido utilizados principalmente para a mecanização/automação de análises químicas. Empregando esses sistemas é possível à implementação de praticamente todas as etapas envolvidas no processo de análise química como amostragem, separações, diluições, pré-concentrações, adição de reagentes e entre outros processos <sup>[12]</sup>.

Uma das modalidades de sistemas de análises químicas em fluxo é a análise por injeção sequencial, denominado SIA (*Sequential Injection Analysis*), sendo caracterizada pela aspiração em uma sequência adequada de alíquotas de amostras e reagentes para uma bobina coletora, sendo a direção do fluxo invertida e a zona da amostra transportada, com auxílio do fluido transportador, em direção à bobina de reação, onde as soluções são homogeneizadas e processam-se boa parte das reações químicas, e posteriormente ao detector para medida do sinal analítico e após para o descarte<sup>[13,14]</sup>.

Considerando estes aspectos nesta tese é proposto o desenvolvimento de nova modalidade cromatográfica baseada nos processos oxidativos avançados para realizar a oxidação parcial de compostos orgânicos após a eluição do sistema cromatográfico e re-introdução da amostra oxidada no sistema cromatográfico para separação dos produtos da oxidação que darão a identidade digital oxidativa de cada composto da amostra, ajudando na identificação destes sem recorrer a técnicas como EM e RMN.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente tese de doutorado propõe o desenvolvimento de nova modalidade cromatográfica baseada em uma primeira etapa de separação dos analitos presentes na amostra utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, seguida de uma segunda separação, desta vez, após decomposição dos analitos orgânicos utilizando-se processos oxidativos avançados, gerando produtos da oxidação que fornecem a identidade digital oxidativa de cada molécula. O gerenciamento das soluções foi realizado por sistema de análises químicas por injeção sequencial (SIA) que auxilia nas etapas de clivagem dos compostos orgânicos, extração em fase sólida para isolamento dos produtos de degradação formados e eliminação de compostos indesejáveis como Fe(II), Fe(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainda, os produtos formados foram caracterizados utilizando, principalmente, a análise termogravimétrica.

Desta forma, esta revisão foi estruturada em tópicos como: os fundamentos da CL-UV/Vis, CL-EM, CL-RMN, CL-UV/Vis-EM, as características dos Processos Oxidativos Avançados, sistemas SIA; extração em fase sólida e análise termogravimétrica.

### 2.1. Cromatografia

Cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial, denominada de fase estacionária (FE) e outra um fluido que percola através da fase estacionária, denominada de fase móvel (FM),<sup>[2]</sup> separando-se assim, os constituintes de uma amostra.

A cromatografia é uma das técnicas analíticas mais poderosas e versáteis, pois em uma única análise pode-se separar uma mistura de substâncias em seus componentes individuais e simultaneamente, realizar a determinação quantitativa de cada espécie química presente na

amostra <sup>[15]</sup>. As amostras podem ser gasosas, líquidas ou sólidas e, dependendo de sua natureza, podem variar em complexidade de uma única substância até uma mistura de diversos compostos <sup>[15]</sup>.

Substâncias que apresentam alta afinidade pela FE apresentarão tempo de retenção mais elevado, enquanto que aquelas que apresentam baixa afinidade pela FE serão caracterizadas por um baixo tempo de retenção e serão eluídas rapidamente da coluna. Esta diferença de interação que permite que compostos químicos sejam separados utilizando a cromatografia <sup>[1]</sup>.

Os diferentes métodos cromatográficos podem ser classificados considerando-se diversos critérios como forma física, fase móvel, fase estacionária e modo de separação do sistema cromatográfico <sup>[1,2]</sup>.

### **2.1.1. Classificação pela forma física**

O sistema cromatográfico pode ser subdividido em cromatografia planar e cromatografia em coluna. Na cromatografia planar temos a cromatografia em papel (CP) e cromatografia em camada delgada (CCD), enquanto que a cromatografia em coluna é dividida em vários tipos de cromatografia, classificados através da fase móvel, fase estacionária e pelo modo de separação <sup>[1,2]</sup>.

### **2.1.2. Classificação pela fase móvel**

A cromatografia é dividida em três tipos: a cromatografia em fase gasosa (CG) que utiliza como fase móvel um gás inerte; a cromatografia supercrítica (CSC) que utiliza um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica e a cromatografia líquida (CL) que é subdividida em cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel (líquido) é

arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia líquida moderna (CL) que, normalmente, utiliza colunas metálicas empacotadas com partículas de diâmetro pequenos, sendo necessário à utilização de equipamentos sofisticados para propulsão dos fluidos <sup>[1,2]</sup>.

### 2.1.3. Classificação pela fase estacionária

Esta pode ser classificada diferenciando fases estacionárias em sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar suportado sobre um sólido ou imobilizado sobre este. A imobilização pode envolver ligações químicas entre o líquido e o suporte, ou somente entre as cadeias do próprio líquido. É comum considerar as fases estacionárias contendo líquido ativo na separação, como fases quimicamente ligadas, esta distinção justifica-se pelo fato de seu mecanismo de separação ser diferente <sup>[1,2]</sup>.

### 2.1.4. Classificação pelo modo de separação

As separações cromatográficas ocorrem devido às diferentes interações com as fases móvel e estacionária, tais como: processos de adsorção, partição, troca iônica, exclusão, bioafinidade ou misturas desses mecanismos:

Cromatografia por adsorção - utiliza uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida ou gasosa. O soluto é adsorvido na superfície da partícula sólida, sendo que o equilíbrio de distribuição do analito ao longo do tempo entre as duas fases promove a separação dos diferentes solutos <sup>[1,2]</sup>.

Cromatografia por partição - utiliza uma fase estacionária líquida que forma um filme fino na superfície de um suporte sólido, sendo que as espécies a serem separadas se distribuem

durante a passagem pela coluna entre a fase estacionária (líquido) e a fase móvel, promovendo a separação dos compostos pela diferença de solubilidade destes nas duas fases <sup>[1,2]</sup>.

Cromatografia por troca iônica - utilizam ânions ou cátions ligados covalentemente ao suporte sólido, geralmente uma resina. Os íons de carga oposta do soluto são atraídos para a fase estacionária por forças eletrostáticas <sup>[1,2]</sup>.

Cromatografia por exclusão molecular - esta técnica separa as moléculas pelo tamanho, com os solutos maiores passando por ela com maior velocidade enquanto os analitos de menor tamanho passam pelos poros da fase estacionária sendo retidos na coluna por maior intervalo de tempo. Ao contrário de outros tipos de cromatografia, não há interação atrativa entre o analito e a fase estacionária <sup>[1,2]</sup>.

Cromatografia por bioafinidade - esta se baseia no isolamento de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos <sup>[1,2]</sup>.

Somente a partir da década de 1970, com o desenvolvimento tecnológico para construir bombas de alta pressão e fases estacionárias de menor diâmetro, conseguiu-se um avanço considerável na cromatografia líquida que, até então, era subdesenvolvida e baseava-se nos experimentos da cromatografia em coluna clássica <sup>[1]</sup>.

## **2.2. Cromatografia Líquida**

Através do desenvolvimento de suportes para fase estacionária com partículas de diâmetros pequenos e com o consequente desenvolvimento de bombas de alta pressão para vencer a alta pressão hidrodinâmica gerada devido à baixa permeabilidade da fase móvel <sup>[16]</sup> é que se passou a fazer a distinção entre Cromatografia Líquida de Alta Eficácia, ou mais

recentemente designada, Cromatografia Líquida (CL), da então rudimentar Cromatografia Líquida Clássica (CLC) <sup>[2]</sup>.

A Cromatografia Líquida possui a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, com menor tempo de análise, com alta resolução cromatográfica, eficiência e detectabilidade <sup>[1,2]</sup>. Devido a sua versatilidade e confiabilidade, a CL tem sido amplamente utilizada como técnica de análise em várias áreas da ciência e em diferentes tipos de amostras <sup>[17,18]</sup>. As colunas analíticas mais utilizadas são de dois tipos: as de fase normal e as de fase reversa <sup>[1,2,19]</sup>.

As de fase normal são polares (sílica e outros materiais) e produzem separação em fases móveis de baixa polaridade, enquanto as de fase reversa são revestidas em grau variável (de 6,0 a 18,0%) com polímeros de baixa polaridade, como o octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18) e propiciam melhor resposta com fases móveis polares <sup>[1,2,19]</sup>. Nos últimos anos, as colunas utilizadas em CL têm sido aperfeiçoadas através da inserção de partículas esféricas e homogêneas <sup>[17,18,19]</sup>. A técnica mais frequentemente utilizada é a fase reversa, como o carbono (C) é ligado quimicamente à superfície das partículas com os grupos n-octadecil, estas superfícies proporcionam estabilidade e reprodutibilidade, assim como a seletividade nas análises <sup>[17]</sup>.

Uma das etapas mais importantes é a composição da fase móvel, que é o parâmetro mais utilizado para controlar a separação na CL <sup>[20]</sup>. Fatores como a compatibilidade com o detector, viscosidade e ponto de ebulição, miscibilidade dos componentes da fase móvel, dissolução da amostra sem decompor seus componentes, pureza do solvente e a toxicidade são fundamentais na escolha da fase móvel <sup>[19]</sup>.

A forma de eluição na CL pode ser tanto a eluição isocrática como por gradiente que desempenham um papel importante na separação cromatográfica <sup>[21]</sup>. Sendo que, na eluição isocrática, a composição da fase móvel se mantém constante durante o processo de separação. Já na eluição por gradiente a composição da fase móvel varia durante a separação, de modo que ocorrem variações nas proporções da fase móvel durante o processo da separação <sup>[1]</sup>.

A otimização do processo cromatográfico em uma separação significa obter a resolução necessária com o tempo mínimo de análise; sendo que na otimização das condições experimentais deve-se maximizar o rendimento e a taxa de produção e reduzir ao mínimo o consumo de solventes para obter o custo mínimo de separação <sup>[20]</sup>. Pode-se operar sob várias condições experimentais, a partir da eluição isocrática ou por gradiente, geralmente com a utilização de misturas binárias de solventes que fornecem a solução mais comum para o problema da otimização de separação. Nas separações de misturas complexas, muitas vezes, pode-se utilizar uma mistura ternária isocrática ou por gradiente nas separações cromatográficas <sup>[21]</sup>. Em fase reversa, normalmente, são utilizados modificadores orgânicos como o álcool metílico e a acetonitrila e em alguns casos, para se aumentar a seletividade, utiliza-se um outro solvente orgânico como modificador <sup>[21]</sup>.

Há um grande interesse em reduzir ou eliminar o uso de solventes orgânicos em modificadores de fase móvel, assim o desenvolvimento de métodos cromatográficos que utilizem fase móvel sem modificadores orgânicos tóxicos é uma importante área de pesquisa. Podendo a fase móvel, nestes casos, utilizar-se de uma solução aquosa com uma pequena quantidade de modificadores que sejam menos poluentes <sup>[22]</sup>. As razões para o desenvolvimento deste tipo de fase móvel se deve a uma pressão crescente para reduzir o desperdício de produtos químicos e devido à poluição resultante de procedimentos de análises químicas, bem como melhorar o desempenho na etapa de detecção e o potencial para

desenvolver uma técnica que possa ser mais facilmente adaptada e aplicada para a indústria química com menores riscos <sup>[22]</sup>.

### 2.2.1. Detectores

O detector mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química do analito presente na amostra ou na solução-padrão; envia um sinal para registro, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente na amostra, sendo que este sinal é gerado assim que o efluente sai da coluna cromatográfica e chega ao detector <sup>[1]</sup>.

### 2.2.2. Classificação dos detectores

Os detectores são classificados em várias categorias, dentre elas pode-se destacar: a seletividade e os tipos de análise <sup>[2]</sup>.

- **Seletividade**

Detectores universais: respondem a qualquer composto da amostra que não seja a fase móvel <sup>[2]</sup>.

Detectores seletivos: respondem a um grupo de componentes presentes no efluente da coluna <sup>[2]</sup>.

Detectores específicos: respondem a apenas um componente (ou um número muito reduzido de componentes) contendo características químicas similares <sup>[2]</sup>.

- **Tipo de Análise**

Detectores destrutivos: destrói a amostra que elui da coluna, não possibilita sua recuperação; como por exemplo, os espectrômetros de massas e os detectores eletroquímicos <sup>[1]</sup>.

Detectores não-destrutivos: não destrói a amostra que elui da coluna, possibilitando sua recuperação na mesma forma química que foi injetada, o que permite recolher a amostra para posterior caracterização, ou serem acoplados a outros detectores. Como exemplo, temos os detectores por absorvância no ultra-violeta e infravermelho, por fluorescência e por índice de refração <sup>[1]</sup>.

Atualmente, a maior parte dos detectores não é versátil ou universal, nem apresentam todas as opções desejadas. Contudo, existem detectores que oferecem uma ampla faixa de aplicações e se os componentes da amostra diferem bastante em suas propriedades físicas e físico-químicas pode ser necessária a utilização de dois ou mais detectores em série para assegurar que cada um dos componentes de interesse seja medido adequadamente <sup>[1]</sup>.

A classe de detectores mais usada na CL são os de absorvância (fotométrico de comprimento de onda fixo, espectrofotométrico de comprimento de onda variável, espectrofotométrico com arranjo de diodos), índice de refração, fluorescência e espalhamento de luz <sup>[1,2]</sup>.

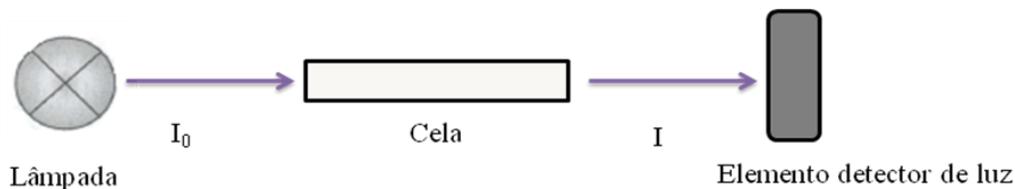
Outros tipos de detectores também utilizados são: espectrômetro de massas, os eletroquímicos e de condutividade elétrica <sup>[1]</sup>. Estes são mais específicos e menos utilizados, devido, muitas vezes, ao seu alto custo, como o espectrômetro de massas.

### **2.2.3. Detectores baseados na absorção de luz no UV/Vis.**

Ao incidir radiação eletromagnética em uma substância, esta pode sofrer diferentes interações com o analito, tais como: reflexão, refração, absorção, espalhamento, transmissão de parte da luz incidente, dentre outros. A radiação transmitida, ao passar pela substância pode ser detectada e servir de base para a construção de uma classe de detectores de grande uso na CL, denominados de detectores ultravioleta ou simplesmente UV. Em alguns casos, uma

região espectral maior de análise pode ser empregada como as regiões do ultravioleta e visível, denominado de UV/Vis <sup>[2]</sup>.

Estes detectores são baseados na relação existente entre a intensidade do feixe de luz que incide sobre a amostra e a intensidade do feixe que emerge dela.



**Figura 1. Princípio da detecção no UV/VIS.** ( $I_0$ ) Intensidade da luz incidente; ( $I$ ) intensidade da luz emergente <sup>[2]</sup>.

Esta relação é denominada de Transmitância ( $T$ ). Entretanto, de acordo com a lei de Lambert-Beer, o parâmetro proporcional à concentração das espécies absorventes é a Absorbância ( $Abs$ ), de acordo com Eq.1, onde  $A$ - absorbância medida,  $\epsilon$  - absortividade da espécie,  $b$ -caminho óptico do compartimento da amostra e  $c$  – concentração <sup>[2]</sup>.

$$A = \epsilon b c \quad \text{Eq. 1}$$

### 2.2.3.1. Detectores baseados na absorção da radiação na região do UV /Vis.

As três regiões mais importantes do espectro eletromagnético para uso na análise de compostos orgânicos são o infravermelho (IR), o ultravioleta (UV) e o visível (Vis). O uso do infravermelho para a detecção em CL é bastante limitado pelo fato da maioria dos solventes empregados como fase móvel apresentarem várias bandas de absorção nesta região, interferindo na análise. No entanto, a flexibilidade de escolha de solventes na região do UV/Vis é maior tornando esta região de grande interesse para as análises <sup>[2]</sup>.

Além do cuidado na escolha do solvente para que este não interfira na análise, é necessário que o composto analisado apresente absorção na região do espectro, o que dependerá dos grupos cromóforos presentes em sua estrutura química <sup>[2]</sup>. Um cromóforo é definido como um sistema que contém os elétrons responsáveis pela absorção da radiação, sendo que alguns destes grupos, apresentam absorção em comprimentos de onda muito baixos, menor que 200 nm, o que dificulta a escolha da fase móvel apropriada <sup>[2]</sup>.

#### **2.2.3.1.1. Detectores UV de comprimento de onda fixo**

O detector de comprimento de onda fixo é o mais simples e barato detector fotométrico usado em CL. A fonte de energia empregada geralmente é uma lâmpada de vapor de mercúrio a baixa pressão, sendo que a maior emissão ocorre próximo a 254 nm. Uma variação deste tipo de detector é o uso de um filtro recoberto com um agente fosforescente, o qual absorve a radiação e a reemite em 280 nm, permitindo a ampliação do uso deste detector. Com a troca do filtro, é possível trabalhar em outros comprimentos de onda, dependendo da necessidade de operação <sup>[2]</sup>.

Para possível confirmação da identidade de um composto, mede-se a relação entre a absorção em 254 nm e 280 nm para um padrão analítico e para o pico a ser identificado. Juntamente com os dados dos tempos de retenção, esta estratégia foi bastante utilizada no passado, como forma de identificação de picos cromatográficos. Apesar da simplicidade, boa sensibilidade e baixo custo deste detector, seu emprego tem diminuído após o aparecimento dos detectores de comprimento de onda variável <sup>[2]</sup>.

### 2.2.3.1.2. Detectores UV de comprimento de onda variável

Estes detectores apresentam como principal atrativo o fato de permitir a escolha de diferentes comprimentos de onda para o monitoramento, permitindo a análise de amostras complexas com compostos que absorvem em diferentes comprimentos de onda, bem como a possibilidade de se obter um espectro completo de uma substância eluído da coluna, por isso pode ser denominado de detector espectrofotométrico <sup>[2]</sup>.

Seu princípio de operação é igual a um espectrofotômetro UV/Vis, com uma cela em fluxo, uma vez que emprega um seletor de comprimentos de onda mais complexo do que um filtro, geralmente uma rede de difração. Este detector permite a escolha de diferentes comprimentos de onda durante a análise de maneira a otimizar a absorção para cada composto em uma análise <sup>[2]</sup>.

Neste tipo de detector é utilizada uma lâmpada de emissão contínua, usualmente de deutério, que emite a radiação que é focalizada em um monocromador, geralmente uma rede holográfica de difração, e a luz monocromática selecionada passa pela cela de medida e vai para uma fotomultiplicadora para registrar o sinal da radiação transmitida. Para a obtenção do espectro completo de um pico cromatográfico por este sistema, há a necessidade de parar o fluxo da fase móvel quando o composto de interesse encontra-se na cela de medida, o que torna este sistema de detecção não muito prático <sup>[1,2]</sup>.

Análises em diferentes comprimentos de onda também são possíveis com os detectores espectrofotométricos com arranjo de diodos, ou também conhecidos por fotodiodos (*photodiode array, PDA*) <sup>[1,2]</sup>. Neste tipo de detector a análise é realizada de forma contínua em fluxo e cada diodo monitora uma estreita faixa de comprimentos de onda; sendo que ao final da análise toda a região de interesse foi monitorada e os dados são acumulados no computador, permitindo a obtenção do espectro da substância analisada <sup>[2]</sup>.

Neste detector, o sistema óptico é invertido em relação ao convencional, enquanto que no detector com comprimento de onda variável a rede de difração é colocada antes da cela, no arranjo de diodos a cela é iluminada com luz branca e a luz emergente da cela chega à rede de difração e se dispersa até ao arranjo de diodos <sup>[2]</sup>.

#### **2.2.4. Detectores baseados em Espectrometria de Massas.**

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial em fornecer informações de massa molar, bem como sobre a estrutura do analito <sup>[1]</sup>. Este instrumento é constituído por uma fonte de ionização, o analisador de massas e detector de íons com aquisição/processamento de dados. Após a injeção da amostra no espectrômetro de massas (EM), ocorre a produção de íons pela fonte de ionização, onde apenas espécies carregadas são detectadas. Os íons formados são analisados pelo analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga. A detecção do íon é feita por meio do tubo multiplicador de elétrons que determina a intensidade do feixe de elétrons, gerando uma corrente elétrica que é analisada <sup>[1]</sup>.

Embora seja uma técnica excelente para a identificação de compostos puros, a sua utilidade para análise de misturas, com a exceção das mais simples, é limitada, devido ao imenso número de fragmentos de diferentes valores de  $m/z$  produzidos. A quantificação de amostras introduzidas diretamente no espectrômetro é com frequência difícil, porque se torna complicado introduzir quantidades conhecidas da substância na fonte de ionização e porque podem ocorrer variações na abundância dos íons produzidos por algumas fontes de íons <sup>[3]</sup>.

A grande vantagem da espectrometria de massas está na identificação de substâncias, por isso, frequentemente está associada à outra técnica como a cromatografia em fase gasosa ou a cromatografia líquida, assim possui a função de detector nos processos

cromatográficos <sup>[3,23]</sup>. O acoplamento destas técnicas abre a possibilidade de separar misturas complexas, identificar os componentes e quantificá-los em uma única operação <sup>[3]</sup>. Além disso, a utilização de métodos hifenados apresentam vantagens, como ser tanto universal como de alta seletividade, quando se opera no modo de monitoramento de íons selecionado, o qual permite a quantificação de picos sobrepostos; ter boa detectabilidade; avaliar a pureza do pico; confirmar a presença do analito mediante a informação de massa molar e estrutural, sendo esta a característica mais relevante <sup>[1]</sup>.

O interfaceamento da CL-EM passou por um longo estágio de desenvolvimento antes da atual aceitação, como técnica analítica robusta, versátil e com boa sensibilidade <sup>[2]</sup>. Uma das razões é o fato de que o acoplamento emprega uma técnica que opera em elevadas pressões (CL) e outra (EM) em pressões muito baixas, denominada de “vácuo”. Portanto, a transferência da amostra exigiu o desenvolvimento de interfaces para que possibilitasse compatibilizar as duas técnicas <sup>[1,2]</sup>.

Para que uma substância possa ser detectada em EM, ela necessita antes ser ionizada; uma das técnicas mais utilizadas é o impacto de elétrons de alta energia, no entanto, ao utilizar esta em CL-EM, ela não se mostrou adequada, pois a fase móvel também era ionizada, gerando muitas espécies e dificultando a interpretação dos espectros obtidos <sup>[2]</sup>. Desta forma, várias interfaces foram desenvolvidas sem muito sucesso. A maior parte das dificuldades só foi contornada com o desenvolvimento das interfaces que se ionizam à pressão atmosférica (IPA ou API, *atmospheric pressure ionization*). Dois tipos de interfaces operando à pressão atmosférica destacam-se para o acoplamento CL-EM são elas o *eletrospray* (ESI, *eletrospray interface*), na qual um spray é produzido com auxílio de uma corrente elétrica, e a *ionização química* (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) onde é produzida uma espécie química que irá ionizar a substância em análise. Estas duas formas de ionização são

complementares, sendo a ESI empregada para análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular, e a APCI utilizada para moléculas de menor polaridade e massa molecular <sup>[2]</sup>.

Após a passagem do efluente da CL pela fonte de ionização, onde ocorre o processo de produção de íons, estes são encaminhados para o analisador. No analisador, os íons são separados com auxílio de diferentes campos elétricos, magnéticos e combinação deles, de acordo com a relação entre a massa da espécie e sua carga elétrica (relação massa/carga ou  $m/z$ ) <sup>[2]</sup>.

O analisador de massas é considerado como a parte mais importante do sistema, uma vez que é nele que ocorre a separação dos íons que se formam na fonte de acordo com suas razões massa/carga <sup>[3]</sup>. Existem diferentes tipos de analisadores de massas, sendo os mais utilizados: o quadrupolo, o aprisionador de íons (*Ion Trap*) e os do tipo tempo de vôo (*time of flight*) <sup>[2]</sup>.

Os quadrupolos são empregados geralmente em análise quantitativa, entretanto possuem baixa resolução e menor utilidade em análise qualitativa. Por outro lado, os do tipo tempo de vôo apresentam limitações em análises quantitativas, porém por apresentar maior resolução do que o quadrupolo é mais adequado para análise qualitativa, porém seu custo é mais elevado <sup>[2]</sup>.

Os íons separados no analisador são encaminhados para um detector, geralmente uma multiplicadora de elétrons, gerando uma corrente elétrica que é analisada, no sistema de dados, por um software adequado, produzindo os espectros de massas <sup>[2]</sup>.

A utilização da EM como técnica analítica é parcialmente reduzida pela sua complexidade e principalmente pelo custo do equipamento <sup>[3]</sup>.

### 2.2.5. Detectores baseados na Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta muito utilizada para a identificação estrutural de vários tipos de compostos,<sup>[4]</sup> estando fundamentada na absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência entre 4 e 750 MHz<sup>[3]</sup>. Ao contrário da absorção no ultravioleta, visível e no infravermelho, neste tipo de espectroscopia os núcleos dos átomos, e não os elétrons estão envolvidos no processo de absorção de energia<sup>[3]</sup>. Para que os núcleos absorvam radiação, é necessário expor a amostra sob condições apropriadas a um campo magnético, o que leva os núcleos de interesse aos estados de energia necessários para que ocorra a absorção, em uma frequência regida pelas características estruturais das substâncias<sup>[24]</sup>.

A sensibilidade e a resolução de um espectrômetro de RMN dependem essencialmente da intensidade do campo magnético e da qualidade do ímã. Quanto maior for a intensidade do campo magnético do ímã, maior a sensibilidade e a resolução<sup>[3]</sup>. Os ímãs usados no espectrômetro de RMN são de três tipos: ímãs permanentes, eletroímãs e ímãs supercondutores. Os ímãs permanentes são muito sensíveis à temperatura e o campo que produzem é pouco intenso. Os eletroímãs são menos sensíveis à temperatura, mas exigem sistemas de resfriamento e fontes elétricas complexas, podem produzir campos mais altos, e neste campo as frequências de absorção de hidrogênio ocorrem em 100 MHz. Já os ímãs supercondutores são usados em instrumentos de alta resolução, que apresentam frequência de absorção de hidrogênio em 750 MHz<sup>[3]</sup>.

A concentração do analito na amostra deve ser suficiente para fornecer uma relação sinal/ruído adequada ao experimento. São comuns concentrações entre 1 e 10% (m/v) e volume de amostra da ordem de 0,5 mL. Para amostras de baixa concentração o tempo necessário para obter o espectro aumenta, o que faz com que sejam preferidas amostras com

uma maior concentração. Para a solubilização das amostras, os solventes utilizados em RMN não devem ter átomos de hidrogênio, logo solventes deuterados ou que não possuem hidrogênio como tetracloreto de carbono são geralmente utilizados nas análises <sup>[3]</sup>.

Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades, sendo que os núcleos observados com essa técnica são <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, mas também, <sup>15</sup>N, <sup>19</sup>F e <sup>31</sup>P podem ser monitorados <sup>[24]</sup>.

Métodos baseados em propriedades magnéticas como a análise por RMN, possibilita obter informações sobre a estrutura, distribuição, interação de moléculas pequenas e macromoléculas, bem como pode fornecer evidências para distinção entre isômeros <sup>[4,25]</sup>. Além disso, a RMN possui a vantagem de não requerer nenhum tipo de pré-tratamento da amostra quando comparada às outras técnicas de análise, e apenas com uma análise espectral detalhada de um único espectro de hidrogênio poderá fornecer informações sobre a estrutura e a composição química dos principais constituintes químicos majoritários presentes na amostra <sup>[26]</sup>.

No entanto, a análise direta de amostras por RMN é restrita a átomos magnéticos, ou seja, apenas os núcleos que possuem um momento nuclear magnético podem ser analisados. Felizmente, os elementos mais abundantes nos organismos vivos (carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, enxofre) possuem pelo menos um isótopo que é detectável por RMN <sup>[25]</sup>. A intensidade do sinal de uma análise por RMN reflete a abundância relativa do núcleo detectada em uma posição específica de um dado composto, ou seja, alterações na abundância relativa do núcleo altera o sinal intensidade <sup>[25]</sup>.

Quando as amostras analisadas são compostas por várias espécies, os espectros podem resultar em milhares de sinais. No entanto, os espectros de RMN podem ser simplificados com o acoplamento da CL com RMN. Se o composto a ser investigado é muito complexo, com o

acoplamento CL-RMN, os compostos podem ser separados e, em seguida, as suas estruturas podem ser elucidadas individualmente <sup>[4]</sup>.

O desenvolvimento de métodos baseados nas técnicas de separação e hifenados com RMN, ou seja, a CL-RMN possibilitam a identificação dos componentes de uma mistura sem a necessidade de isolamento e purificação, dos compostos individuais. Assim, em contraste com o métodos CL-MS, os quais são caracterizados por uma alta velocidade e sensibilidade de análise, mas limitada informação sobre a estrutura molecular; a CL-RMN permite identificação inequívoca para amostras com estruturas muito complexas, sendo um método não destrutivo de análise <sup>[27, 28]</sup>.

Uma extensão recente do métodos hifenados CL-RMN possibilitou a origem da Cromatografia Líquida (CL) associada a extração em fase sólida (EFS), com espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), designada como CL-EFS-RMN, onde os analitos são separados da fase móvel da CL por meio de extração em fase sólida com uma pós-coluna, e em seguida submetido, de forma automatizada, a análise por RMN em um solvente deuterado <sup>[27]</sup>. A possibilidade de acumulação por adsorção do analito em cartuchos EFS repetida vezes e com a subsequente eluição da substância a analisar com um solvente orgânico deuterado, aumenta a concentração da substância a ser analisada na célula de detecção, o que resulta em aumento adicional da sensibilidade da técnica de RMN quando hifenizada <sup>[29]</sup>. No entanto, a técnica de CL-EFS-RMN é inerentemente dependente da eficácia do processo de pós-coluna EFS. A técnica de CL-EFS-RMN está se tornando cada vez mais popular, especialmente em pesquisa de produtos naturais, na análise de alimentos e suplementos alimentares e análise farmacêutica <sup>[27]</sup>. No entanto, as técnicas que utilizam RMN como sistema de detecção possui a desvantagem de ser uma técnica analítica de alto custo.

### 2.3. Impressão Digital

A análise por impressão digital (*fingerprint*), é uma técnica que viabiliza a caracterização das substâncias de um complexo sistema com uma grande confiabilidade <sup>[30]</sup>. A técnica de impressão digital cromatográfica é um método útil na identificação de amostras, a técnica combina a cromatografia líquida com espectros UV/Vis e na sequência a obtenção dos espectros de massas (CL-UV/Vis-EM). Assim, compostos que foram separados podem ser obtidos simultaneamente, e comparando os espectros UV/Vis e os de massas com os dos compostos de referência, estes componentes podem ser identificados <sup>[5]</sup>.

Utilizando esta metodologia, uma amostra com substâncias complexas podem ser identificadas e ainda promover a distinção de outras espécies estreitamente relacionada. A técnica de impressão digital cromatográfica é considerada como uma das técnicas mais importantes, e tem sido amplamente empregada e tem atraído atenção cada vez maior devido a elevada eficiência de separação, detecção e uma alta sensibilidade da técnica <sup>[30]</sup>. As impressões digitais obtidas por instrumentos de cromatografia podem refletir a composição das substâncias analisados. Os resultados obtidos não podem ser utilizados apenas para a autenticação das amostras, mas também para o tratamento dos dados que permitam recuperar informações adicionais, como indicação de picos e a discriminação entre espécie analisadas <sup>[31]</sup>.

Uma desvantagem desta técnica é que os resultados de similaridade só podem ser calculado com base no valor relativo usando neste caso um composto como marcador, ou seja, um padrão de referência, nestes casos se houver pequenas diferenças nos cromatogramas as espécies não podem ser distinguíveis. Assim, o método que utiliza substância padrão, tais como multi-ingredientes na análise quantitativa devem ser obtidos em consideração para razoável definição dos componentes analisados <sup>[5]</sup>.

## 2.4. Processos Oxidativos Avançados

Nos últimos anos os chamados processos oxidativos avançados (POA) têm sido amplamente investigados para a degradação e mineralização de compostos [32,33,39,40]. O principal mecanismo dos POA é a geração de radicais hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ) um reativo intermediário que possui um alto potencial oxidativo, [6] conforme os valores de potencial da Tab. 1.

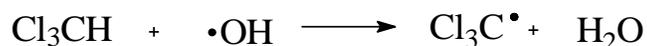
Estes radicais são espécies livres, altamente reativas e eficazes na destruição de produtos químicos orgânicos porque são eletrófilos. Os mesmos reagem de forma rápida e não seletiva com quase todos os compostos orgânicos [34].

**Tabela 1. Potenciais padrão de redução de alguns oxidantes em meio ácido** <sup>10</sup>.

Agente Oxidante	Potencial padrão de redução (V vs EPH)
Flúor	3,03
Radical Hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ )	2,80
Oxigênio Atômico, $\text{O} (^1\text{D})$	2,42
Ozônio ( $\text{O}_3$ )	2,07
Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	1,77
Íon Permanganato ( $\text{MnO}_4^-$ )	1,67
Cloro ( $\text{Cl}_2$ )	1,36
Oxigênio Molecular ( $\text{O}_2$ )	1,23

A oxidação dos compostos orgânicos pelo radical hidroxil ocorre segundo três mecanismos: abstração de prótons, transferência de elétrons e adição radicalar [9, 40].

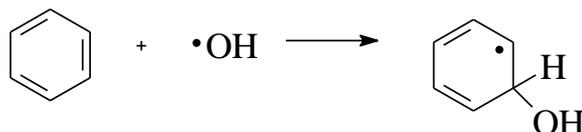
- Abstração de prótons



- Transferência de elétrons



- Adição radicalar



A predominância de uma ou outra reação dependerá de vários fatores, entre eles a presença e concentração do substrato orgânico, bem como sua recalcitrância <sup>[39]</sup>.

O tratamento por POA utiliza fortes agentes oxidantes primários ( $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e/ou catalisadores (Fe, Mn,  $\text{TiO}_2$ ), às vezes, auxiliados por radiação de alta energia, como por exemplo a luz ultravioleta (UV). Assim, os POA podem ser divididos em dois grupos: homogêneos, ocorrendo em apenas uma fase, e heterogêneos, onde há presença de catalisadores sólidos <sup>[35,38]</sup>. A Tab.2 exemplifica alguns POA com ou sem o emprego de radiação UV <sup>[36]</sup>.

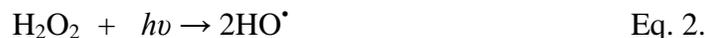
**Tabela 2. Tipos de Processos Oxidativos Avançados <sup>[36, 38]</sup>.**

Sistemas	Com Radiação	Sem Radiação
	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	
Homogêneos	$\text{O}_3/\text{UV}$	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$
	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	Fe(II)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton)
	Fe(II)/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ (foto-Fenton)	Fe(III)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton-like)
Heterogêneos	Catalisador/UV (fotocatálise)	Catalisador
	Catalisador/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	Catalisador/ $\text{H}_2\text{O}_2$

### 2.4.1. Processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV

O processo que combina peróxido de hidrogênio com radiação ultravioleta (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) é um dos POA mais antigos. A radiação ultravioleta (UV) pode atacar e decompor algumas moléculas orgânicas pela quebra de ligações, gerando radicais livres. Entretanto, esta decomposição ocorre a velocidades muito baixas <sup>[37]</sup>. A combinação da luz UV com um agente oxidante é sempre mais eficiente do que apenas a utilização da radiação UV ou do oxidante sozinho <sup>[37]</sup>.

O processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV pode levar à degradação completa de um composto orgânico, levando a conversão de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O; isto significa que ocorre a degradação dos intermediários orgânicos e também do próprio agente ativo <sup>[6]</sup>. O radical hidroxil é formado através da fotólise do peróxido de hidrogênio pela luz UV de comprimento de onda menor que 300 nm, segundo a Eq. 2 <sup>[38]</sup>.



A fotólise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é a principal reação deste processo, porém não é única. Os radicais gerados (Eq. 2) reagem com matéria orgânica, oxidando-a segundo a Eq. 3 <sup>[38]</sup>.



Outra reação importante nesse processo é o ataque do radical hidroxil sobre o próprio peróxido de hidrogênio formando o radical hidroperoxil (HO<sub>2</sub>•), conforme a Eq. 4 <sup>[38]</sup>.



O radical hidroperoxil com potencial de 1,42 V não possui um poder oxidante tão alto quanto o radical hidroxil com potencial de 2,80 V, reduzindo dessa forma a velocidade de degradação da matéria orgânica <sup>[39]</sup>.

Um parâmetro importante para o processo que utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV é o pH do meio reacional, pois este influencia na taxa de geração de radicais, assim valores adequados deste

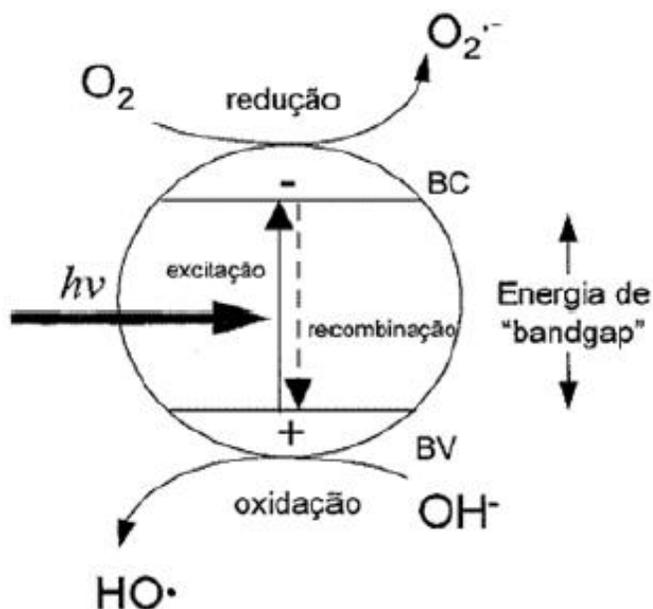
parâmetro devem se escolhidos <sup>[38]</sup>. Durante os processos de foto-oxidação, o pH do meio reacional diminui devido à formação de espécies ácidas, portanto é necessário ajustar o pH da solução de tal forma que permita a obtenção de maior eficiência no processo de degradação, sendo que para maior parte das reações o valor de pH ótimo varia entre pH 3,0 e 5,0. Em meio ácido, o peróxido de hidrogênio é um poderoso agente oxidante e uma potente fonte de geração de radicais livres, porém em soluções alcalinas se decompõe em água e oxigênio molecular, conforme a Eq.5 <sup>[38]</sup>.



A otimização do processo de oxidação de um dado composto deve levar em conta a fonte de radiação e sua potência, geometria do reator, saturação de oxigênio e adição de peróxido de hidrogênio, sendo este último muito importante nos casos em que há competição pela absorção de luz <sup>[38]</sup>.

#### 2.4.2. Processo Fotocatalítico

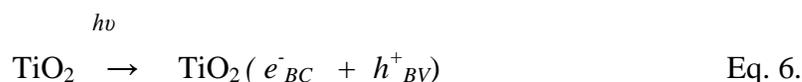
Os processos fotocatalíticos fazem uso de um semicondutor óxido de metal como catalisador e de oxigênio como agente oxidante <sup>[38]</sup>. Os semicondutores que atuam como fotocatalisadores possuem duas regiões energéticas, a banda de valência (Bv) de menor energia (onde os elétrons não possuem movimentos livres) e a banda de condução (Bc) de maior energia (onde os elétrons são livres para se moverem, produzindo condutividade elétrica) <sup>[40]</sup>. A região entre elas é chamada de “band-gap”. A absorção de fótons com energia superior à da “band-gap” é necessária para excitar o elétron e promovê-lo da banda de menor energia para a de maior, gerando assim, um par elétron/lacuna ( $e^-/h^+$ ) <sup>[40]</sup>. A Fig.2 representa o mecanismo simplificado da fotoativação de um semicondutor.



**Figura 2. Mecanismo simplificado da fotoativação de um semicondutor** <sup>[40]</sup>.

Os fotocatalisadores mais usados são: TiO<sub>2</sub>, ZnO, WO<sub>3</sub>, CdS, CdTe, ZnS, SnO<sub>3</sub>, SiTiO<sub>3</sub>, FeO<sub>3</sub>, sendo que TiO<sub>2</sub> é o mais frequentemente utilizado por ser muito eficiente na degradação de compostos orgânicos, pois apresenta uma elevada estabilidade, bom desempenho e baixo custo <sup>[38]</sup>. Além dessas qualidades, o TiO<sub>2</sub> é insolúvel em água, apresenta estabilidade química em ampla faixa de pH e pode ser imobilizado em sólidos <sup>[38]</sup>.

Quando um catalisador como TiO<sub>2</sub> é exposto a radiação UV, elétrons são promovidos da banda de valência para a banda de condução, produzindo ( $h^+$ ), conforme a Eq. 6 <sup>[40]</sup>.



Onde  $e^-_{BC}$  é o elétron na banda de condução e  $h^+_{BV}$  é a lacuna fotogerada na banda de valência. Ambas as espécies podem participar de reações redox com outras espécies radicalares de oxigênio ( $O_2^-$ ,  $HO_2^-$ ), pois trata-se de um processo de superfície <sup>[40]</sup> conforme as Eq. 7 a 10, gerando radicais hidroxil e hidroxiperoxil.



Existe uma correlação entre a quantidade de substrato adsorvida e a velocidade inicial de degradação, quanto maior for a adsorção, maior será a velocidade inicial de degradação, indicando claramente que a degradação é um fenômeno de superfície <sup>[41]</sup>. Outro fator importante é o pH da solução que, afeta significativamente a atividade do TiO<sub>2</sub>, incluindo a forma e o tamanho dos agregados e as posições das bandas de condução e valência <sup>[41]</sup>. Com o aumento do pH a velocidade inicial de degradação e adsorção diminui, o que indica que o pH é um fator importante que afeta significativamente a adsorção e a correspondente taxa de degradação inicial. Geralmente valores de pH na faixa ácida de 4,5 são mais utilizados nos processos de degradação <sup>[41]</sup>.

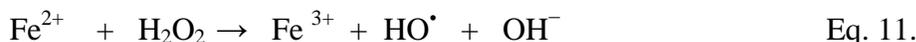
A taxa de degradação também aumenta com o aumento da intensidade da radiação UV; como a radiação afeta a superfície do catalisador, mais radicais hidroxil são produzidos, o que conduz a elevada taxa de degradação <sup>[41]</sup>.

Parâmetros como a intensidade da radiação UV, pH, concentração do composto a ser degradado, o uso oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a quantidade de catalisador devem ser otimizados para promover a taxa de degradação máxima <sup>[11,41]</sup>.

### 2.4.3. Processo Fenton

A reatividade do reagente de Fenton foi observada pela primeira vez em 1894 por seu inventor Fenton <sup>[10]</sup>, mas a sua aplicação como um processo oxidante de degradação de compostos orgânicos, principalmente os compostos tóxicos, não foi aplicada até 1960 <sup>[7]</sup>.

O termo “reagente de Fenton” se refere a misturas aquosas de Fe(II) e peróxido de hidrogênio, um poderoso oxidante que se usado em conjunto com agentes catalíticos como o Fe(II) podem gerar radicais hidroxil, [7,38] conforme a Eq. 11 chamada “reação de Fenton”, no qual o radical hidroxil é capaz de oxidar várias classes de compostos orgânicos em uma reação espontânea [39].



Na ausência de um substrato, o radical hidroxil formado pode oxidar outro íon Fe(II) como na Eq. 12 [39].



O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pode também atuar como sequestrador de radical hidroxil, como na equação Eq.13, formando o radical hidroperoxil ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) que apresenta um menor potencial de redução (1,42 V *versus* ENH) que o radical hidroxil, prejudicando o processo de degradação dos compostos [39].



Os íons férricos formados podem decompor o  $\text{H}_2\text{O}_2$  cataliticamente a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , cujos processos são dependentes do pH como mostrado nas Eq.14 a 16, formando íons ferrosos e radicais [39].



O estabelecimento de um valor adequado de pH (2,7-2,8), pode resultar na redução de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , processo conhecido como Fenton-like, conforme pode ser verificado nas Eq. 15 e 16 [38]. Assim, o pH é um parâmetro muito importante na reação de Fenton, pois controla a taxa de produção do radical hidroxil e a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  na solução [42]. Um

meio muito ácido ou um meio neutro a básico pode desacelerar o processo de degradação. A baixa atividade em pH alto pode ser explicado pela precipitação do  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , um processo que diminui a quantidade de ferro livre em solução e que impede o desenvolvimento das reações de Fenton <sup>[43]</sup>. Em pH muito baixo a velocidade de remoção é limitada devido aos efeitos sequestrantes do íon  $\text{H}^+$  conforme a Eq.17 <sup>[42]</sup>.



O  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresenta-se estável na faixa de pH 3,0 a 4,0, mas a velocidade de decomposição é rapidamente aumentada com o pH acima de 5,0 <sup>[44]</sup>. Geralmente as reações de Fenton apresentam melhores resultados na faixa de pH 2,9 a 3,5 <sup>[42]</sup>.

Outro parâmetro importante na reação de Fenton é a concentração inicial de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o aumento na taxa de degradação é devido ao aumento da concentração do radical hidroxil pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mas em doses elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , verifica-se diminuição da taxa de degradação devido ao efeito sequestrador do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o radical hidroxil conforme a Eq.11; ainda existe a possibilidade de recombinação dos radicais hidroperóxil e hidroxil, conforme as Eq.18 e 19 <sup>[42]</sup>.



Ainda, na presença de excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  no meio é baixa em relação à de  $\text{Fe}^{3+}$ , uma vez que a reação entre  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Eq. 14) com uma constante de velocidade (k) igual a 0,001-0,01  $\text{mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$  é muito mais lenta que a decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  (Eq. 11) <sup>[39]</sup> com uma constante de velocidade de 76  $\text{mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

O aumento na concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  promove uma maior produção dos radicais hidroxil, possibilitando uma reação de degradação mais rápida na fase inicial do que na fase posterior. A maior parte do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é consumida no início reação de Fenton, na primeira etapa

da reação o íon ferroso catalisa o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar radicais hidroxil rapidamente, possibilitando uma maior taxa de degradação na fase inicial da reação, conforme a Eq. 11. Quando a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  é baixa um tempo de tratamento mais longo é necessário para degradação <sup>[42]</sup>.

Pelo caráter coagulante dos íons ferro, o processo Fenton pode ter função dupla de oxidação e coagulação. Portanto, geralmente o processo de oxidação avançado conhecido como Fenton é composto de quatro etapas: ajuste de pH, reação de oxidação, neutralização e coagulação/precipitação. Sendo assim, compostos orgânicos são removidos em dois estágios: pela oxidação e coagulação. Esta etapa de coagulação/precipitação é uma das principais desvantagens do processo Fenton, uma vez que gera a necessidade de tratamento do lodo formado <sup>[44]</sup>.

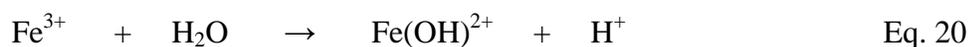
O processo Fenton é uma forma muito simples de produzir radicais  $\text{HO}^\bullet$ , não sendo necessário a utilização de reagentes e aparelhagem especiais <sup>[38]</sup>. Além disso, o reagente de Fenton acelera a taxa de oxidação de 5-9 vezes quando comparado ao processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  <sup>[45]</sup>. A eficiência do processo de Fenton pode ser melhorada por meio da interação da radiação (UV ou VIS) com o reagente de Fenton, processo conhecido como Foto-Fenton <sup>[10]</sup>.

#### 2.4.4. Processo Foto-Fenton

Entre os processos fotocatalíticos homogêneos, os processos de oxidação por Foto-Fenton têm se mostrado eficazes para a degradação de uma grande variedade de compostos orgânicos <sup>[46]</sup>. Os processos de Foto-Fenton são uma extensão do processo de Fenton que utiliza a irradiação de luz na região do UV/Vis <sup>[38]</sup>.

No processo de Fenton e Foto-Fenton, o íons férricos em solução existem como aquo-complexos, na forma  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  (representado muitas vezes por  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ ) em pH

extremamente ácido, quando na ausência de outros ligantes <sup>[39,47]</sup>. Com o aumento do pH, mas ainda na faixa ácida, ocorre hidrólise formando espécies hidroxiladas, cuja proporção depende do pH, onde o primeiro equilíbrio de hidrólise é representado na Eq. 20 <sup>[39]</sup>.



Nas reações de Foto-Fenton os aquo-complexos de Fe(III) são irradiados <sup>[39]</sup>, ocorrendo a fotólise dos complexos  $\text{Fe}^{3+}$ , o que permite a regeneração  $\text{Fe}^{2+}$ , conforme a Eq. 21 <sup>[38, 39]</sup>.



Com a presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no meio reacional e dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  gerados pela irradiação, estas duas espécies reagem dando sequência à reação de Fenton, conforme a Eq. 11. Neste contexto, a reação catalítica é estabelecida em um ciclo em que o  $\text{Fe}^{2+}$  é regenerado <sup>[39]</sup>. O efeito da irradiação provoca um aumento da velocidade de degradação de um composto orgânico, na reação de Foto-Fenton, pois promove aumento na geração de radicais hidroxil em relação à reação que ocorre na ausência de luz, como o caso do processo de Fenton. Além disto, a fotólise de complexos  $\text{Fe}^{3+}$ , conforme a Eq. 20 e 21, permite que a reação de Foto-Fenton necessite de dosagens menores de  $\text{Fe}^{2+}$  em comparação com o processo convencional de Fenton <sup>[37, 47]</sup>.

A eficiência da degradação de compostos orgânicos nas reações de Foto-Fenton sofre uma grande influência em valores pH entre 2,5 e 3,0. Esta faixa limitada de operação é em decorrência da precipitação de Fe(III) em valores de  $\text{pH} > 3,0$  diminuindo drasticamente sua interação com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, conseqüentemente, a produção do radical hidroxil <sup>[39,47]</sup>. Para valores de  $\text{pH} < 2,5$  a velocidade de degradação também diminui, pois altas concentrações de  $\text{H}^+$  podem seqüestrar radicais hidroxil, de acordo com a Eq.17 <sup>[39]</sup>. Além das espécies como  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  (pH 2,0 a 3,0) possuírem um maior coeficiente de absorção, o rendimento quântico

para a produção de radicais  $\text{OH}^\bullet$  é maior e ainda é possível a regeneração de  $\text{Fe(II)}$  na faixa de 280 a 370 nm<sup>[47]</sup>. Assim, na maioria dos processos de Foto-Fenton a irradiação utilizada pode ser uma fonte de luz artificial UV/Vis, em muitos casos, a utilização da irradiação solar tem se demonstrado eficiente devido às reações ocorrem em comprimento de onda de 300 nm, estendendo-se até aproximadamente 400 nm, na reação de Foto-Fenton<sup>[39,47]</sup>.

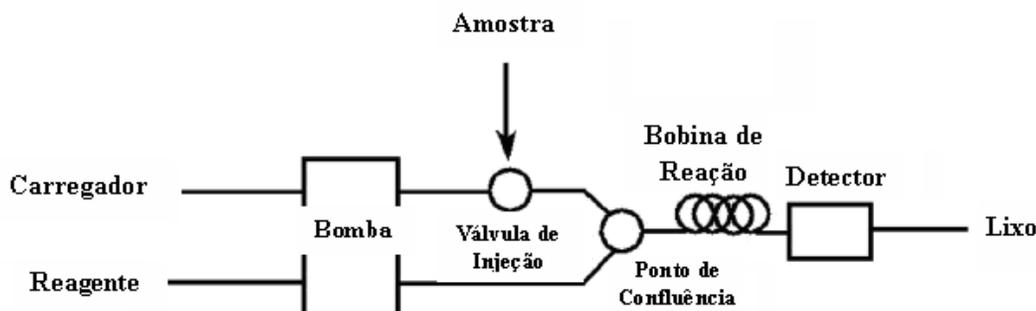
## 2.5. Sistemas de Análises Químicas em Fluxo

A busca por métodos analíticos com alta frequência de amostragem, baixo consumo de amostra e reagentes e mínima interferência humana teve seu primeiro passo somente na metade do século passado, com a introdução dos métodos em fluxo<sup>[48]</sup>. Com o desenvolvimento das metodologias de análise em fluxo, a análise química, normalmente, empregada por via úmida, poderia ser realizada em um fluxo contínuo de amostra e reagentes, ao invés de discretamente em batelada<sup>[48]</sup>. Descrito pela primeira vez por Skeggs em 1957, técnicas de análise em fluxo segmentado<sup>[49]</sup>. Independentemente, Ruzicka e Hansen bem como Stewart desenvolveram em 1975 a análise por injeção em fluxo, denominado de FIA (*Flow Injection Analysis*)<sup>[49]</sup>. Em 1990 os sistemas de análises químicas em fluxo recebeu um novo impulso com a proposta de Ruzicka e Marshall do sistema de análise por injeção sequencial, denominado de SIA (*Sequential Injection Analysis*), baseados em processo automatizado de análise<sup>[48,49,55]</sup>.

As técnicas analíticas baseadas em fluxo podem ser classificadas em uma das quatro categorias: segmentação por ar, fluxo contínuo não segmentado, análise por injeção em fluxo (FIA) e análise por injeção sequencial (SIA)<sup>[50]</sup>. Em sistemas com segmentação por ar, e em alguns sistemas de fluxo não segmentado, as amostras são aspiradas em um fluido carregador

líquido a uma vazão fixa, e por um intervalo de tempo específico. Uma característica operacional de um analisador segmentado relaciona-se com as bolhas de ar que são usadas para segmentar porções da amostra e da mistura reagente, facilitando a mescla e minimizando a dispersão <sup>[50]</sup>.

A análise por injeção em fluxo está baseada na injeção de um volume definido da amostra em um fluxo contínuo de um transportador não segmentado. Uma ou mais soluções contendo reagentes confluem continuamente com o transportador antes da etapa de detecção <sup>[50]</sup>. A zona de amostra injetada sofre dispersão, sendo misturada com as soluções transportadora e os reagentes. O produto resultante é transportado em direção a um detector, onde o sinal analítico é monitorado e então direcionado para o descarte, conforme a Fig.3 <sup>[50]</sup>.



**Figura 3. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) <sup>[14]</sup>.**

A dispersão ou a diluição da zona de amostra pode ser controlada ou adaptada às análises requeridas pela otimização de vários fatores, tais como o volume de amostra injetado, vazões do fluido transportador e dos reagentes, comprimento da bobina de reação e o diâmetro interno da tubulação <sup>[50]</sup>.

O advento do sistema FIA contribuiu para um aumento no desenvolvimento de novas abordagens analíticas e aplicações. Tendo como características: a injeção ou inserção de um volume discreto e bem definido da solução da amostra em um fluxo transportador (inerte) <sup>[51]</sup>;

tempo reprodutível e preciso da manipulação da amostra a partir do ponto de injeção até ao ponto de detecção; criação de um gradiente de concentração da amostra injetada, proporcionando uma análise reprodutível <sup>[51]</sup>.

O sistema FIA proporcionou uma redução no consumo de soluções de amostra e de reagente, estando de acordo com os princípios da Química limpa que viabiliza, prioriza reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente <sup>[52]</sup>. No entanto, a primeira geração do sistema de análise em fluxo, FIA, utiliza contínuo bombeamento de soluções do fluido transportador e do reagente. Em 1990 foi proposta a segunda geração dos sistemas de análises em fluxo, análise por injeção sequencial, SIA <sup>[51]</sup>, onde as soluções já não são bombeadas continuamente pelo sistema e sim, somente quando do processamento da amostra.

O emprego do termo “gerações” deve ser associado apenas com a cronologia na qual as variações para os sistemas de injeção surgiram. As duas técnicas são complementares e não excludentes entre si <sup>[48]</sup>. Um comparativo entre ambas está na Tabela 3.

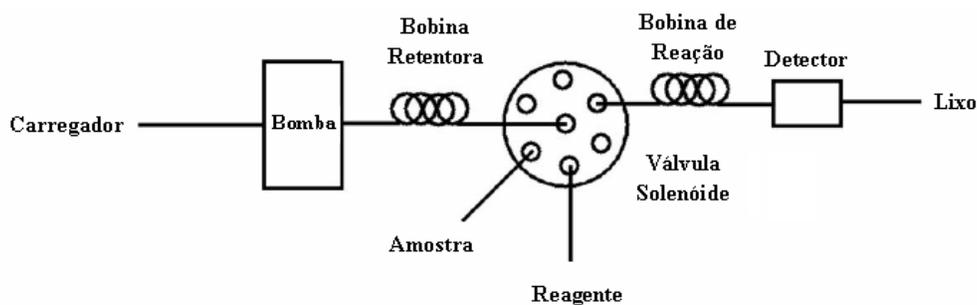
**Tabela 3. Comparativo entre características básicas de SIA e FIA <sup>[48]</sup>.**

<b>Característica</b>	<b>SIA</b>	<b>FIA</b>
Complexidade do sistema	Menor	Maior
Conhecimento mínimo em programação	Necessário	Opcional
Consumo de reagentes	Menor	Maior
Controle computadorizado	Necessário	Opcional
Custo de aquisição	Maior	Menor
Adição de reagente por confluência	Ausente	Presente
Flexibilidade para a escolha de volumes	Menor	Maior
Frequência de amostragem	< 60 análises h <sup>-1</sup>	> 100 análises h <sup>-1</sup>
Linha de transmissão (injeção → detecção)	Única	Variável
Possibilidade de automação	Alta	Alta
Tempo de operação sem necessidade de ajuste de parâmetros como vazão (“robustez”)	Maior	Menor

O sistema SIA foi proposto para simplificar mecanicamente o sistema FIA, pois permite a utilização de um mesmo módulo de análises para diferentes aplicações, facilita a implementação dos métodos em fluxo no monitoramento on-line de processos onde robustez, estabilidade por longos períodos, baixa necessidade de manutenção, calibração automática e automação são requisitos essenciais <sup>[13]</sup>.

Os sistemas SIA são versáteis e eficientes para automatizar os passos necessários para se executar a análise química <sup>[53]</sup>. Nestes sistemas, uma quantidade de zonas não-segmentadas, bem definidas, é congregada em uma bobina com o emprego de uma bomba ou outro propulsor de líquidos, utilizando um dispositivo de seleção <sup>[50]</sup>. Durante o transporte ao detector, estas zonas de amostras penetram umas nas outras, ocorrendo uma mistura de seus componentes, e dando origem a uma ou mais espécies detectáveis <sup>[50]</sup>.

Geralmente, são necessárias modificações para a implementação de vários procedimentos que exploram diferentes sistemas de fluxo, no entanto, no sistema SIA essas modificações são evitadas uma vez que o coração do sistema é uma válvula multi-porta controlada por computador capaz de ligar múltiplos componentes diferentes <sup>[53]</sup>. Em um sistema típico, a válvula seleciona a amostra e os volumes de reagente a ser sequencialmente aspiradas para uma bobina de retenção, onde ocorre a homogeneização, o fluxo é então invertido e a válvula é ligada novamente, a fim de dirigir a amostra processada para o detector <sup>[53]</sup>. Os componentes básicos do sistema são um direcionador líquido (sistema de bombeamento) com um único fluido carregador, uma válvula de seleção multi-porta e um detector conforme a Fig. 4.



**Figura 4. Sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA)** <sup>[14]</sup>.

Os princípios de operação do sistema SIA são semelhantes aos do sistema FIA, como a dispersão parcial controlada e a manipulação reprodutível de amostra <sup>[54]</sup>. No entanto, uma importante característica do sistema SIA é que a configuração do sistema é utilizada para diferentes aplicações <sup>[53]</sup>. Além da capacidade em realizar diferentes análises com a mesma configuração, como as soluções não são bombeadas continuamente, a geração de efluentes é menor quando comparado ao sistema FIA <sup>[54]</sup>.

Nos últimos anos, tornou-se conveniente a utilização do sistema SIA para executar atividades mais complexas, como a manipulação da amostra e processos de pré-tratamento <sup>[55]</sup>. Para tanto, algumas portas da válvula rotatória são acoplados a diferentes unidades como por exemplo, reservatórios, bombas, detectores, reatores, separadores, células especiais, coletores dentre outros <sup>[55]</sup>.

Um dos procedimentos mais amplamente utilizado de pré-tratamento em SIA é a extração em fase sólida (EFS) automatizado, que emprega um material sólido ou líquido de extração apropriado ligado a um suporte adequado <sup>[14,55]</sup>. O procedimento de extração tem como finalidade: a separação do analito a partir de espécies interferentes na amostra e pré-concentração do analito para aumentar a sensibilidade. A grande vantagem da EFS é que ambas as espécies orgânicas e inorgânicas podem ser extraídas, dependendo da natureza do

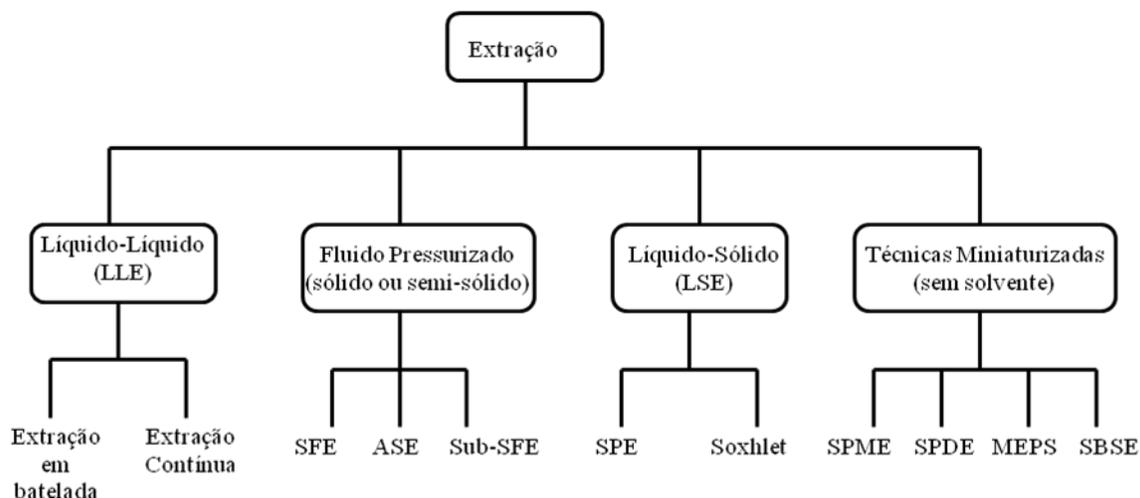
analito e do mecanismo de retenção desejada; materiais diferentes de extração podem ser utilizados (por exemplo, hidrofílicos e hidrofóbicos superfície modificada, resinas de troca iônica, polímeros molecularmente impressos (*MIPs* - *molecularly imprinted polymers*) e diferentes tipos de polímeros <sup>[14, 55]</sup>.

Na associação do SIA com EFS geralmente, o material utilizado na EFS é permanentemente inserido em uma coluna (cartucho). Usando o sistema SIA, a amostra aspirada é transferida para a coluna de acumulação/separação do analito e subsequentemente, o analito retido é eluído usando um solvente apropriado <sup>[14, 55]</sup>.

## 2.6. Extração em Fase Sólida

Em uma análise, geralmente, a amostra na forma sólida, líquido ou gasosa necessita de algum tipo de tratamento antes da injeção em algum equipamento analítico<sup>[2]</sup>. Os procedimentos de preparação da amostra são geralmente procedimentos com muitas etapas, e conseqüentemente a maior parte do tempo de análise é gasto na preparação de amostra isoladamente <sup>[56]</sup>. Desta forma, o número de técnicas de extração disponíveis para o preparo de amostras são variados, podendo ser classificado de acordo com as características do solvente empregado, conforme a Fig.5 .

A extração líquido-líquido (ELL ou *LLE*, *liquid-liquid extraction*) é considerada uma técnica clássica de extração, simples e convenientemente usada para separar compostos orgânicos a partir de soluções ou de suspensões aquosas nas quais estejam presentes. As substâncias contidas na solução se distribuirão entre dois solventes de acordo com a sua solubilidade relativa <sup>[2]</sup>.



**Figura 5. Classificação das técnicas de extração de acordo com a natureza do solvente utilizado** <sup>[2]</sup>.

A extração líquido-líquido apresenta como principal desvantagem o alto consumo de solventes, geralmente, tóxicos, além dos custos associados com a sua utilização e descarte <sup>[57]</sup>. Devido a essas desvantagens, métodos de extração ou de preparação de amostras que utilizam solventes orgânicos em menor quantidade tem sido desenvolvido para a minituarização dos ELL estão se tornando cada vez mais importante <sup>[58]</sup>. As análises em microescala são metodologias mais seguras e com custo mais baixos, e são utilizadas por exemplo nas técnicas que incluem a microextração em fase líquida (MFL ou *LPME liquid-phase microextraction*), a microextração em fluxo contínuo (MFC ou *CFME continuous flow microextraction*), a microextração dispersiva líquido-líquido (MELL ou *DLLME dispersive liquid-liquid microextraction*) e entre outras técnicas proporcionam alternativas aos métodos convencionais ELL <sup>[56, 58]</sup>. Sendo, estes métodos geralmente mais simples, rápidos, sensíveis e com custo mais baixo, minimizam a utilização de solventes orgânicos, e possuem potencial para automação <sup>[58]</sup>.

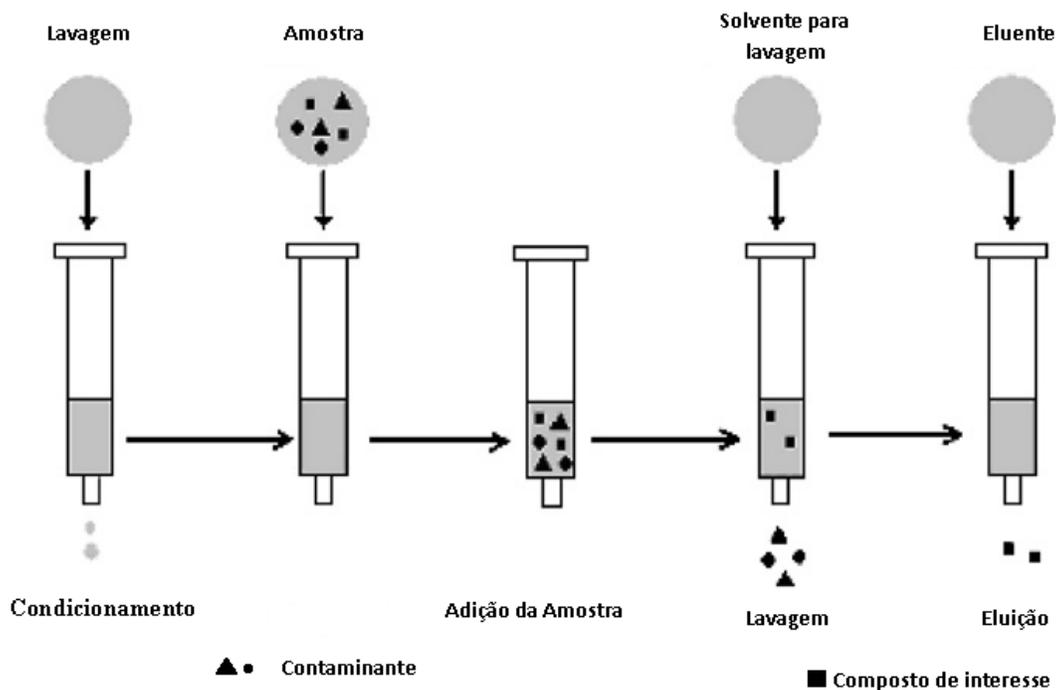
As técnicas que empregam fluidos pressurizados, como a extração por fluido supercrítico (ES ou *SFE supercritical fluid extraction*), a extração acelerada por solvente (EAS ou ASE, *accelerated solvent extraction*) ou extração com fluido subcrítico (sub-EFS, ou sub-*SFE subcritical fluid extraction*), em geral, evitam o uso de solventes orgânicos (em EFS usualmente emprega-se CO<sub>2</sub> e em sub-EFS usualmente, H<sub>2</sub>O) ou tem o uso de solventes minimizado, como a EAS que utiliza um solvente orgânico pressurizado em pressões suficientemente elevadas para assegurar que estará no estado líquido durante a extração [2].

A extração líquido-sólido surgiu visando a miniaturização do processo utilizada na cromatografia líquida de baixa pressão, conhecida também como cromatografia líquida clássica, utilizada no preparo de amostras, permitindo o desenvolvimento da extração em fase sólida (EFS ou *SPE, solid phase extraction*) que surgiu em meados da década de 1970 [2].

A EFS é geralmente realizada passando-se as amostras aquosas através de um adsorvente sólido em uma pequena coluna aberta, usualmente denominado de cartucho de extração. Um aspecto muito importante na EFS é a seleção do adsorvente que, geralmente, contém sílica ligada a grupamentos como octadecilsilano(C18) e o estireno/divinilbenzeno copolímeros [59].

Na extração em fase sólida, a primeira etapa é o condicionamento do cartucho, esta etapa serve para ativar o adsorvente/ fase estacionária (FE) o solvente a ser utilizado dependerá da FE que será ativada. Após, a solução contendo o analito de interesse é colocada no topo superior do cartucho (com auxílio de uma micropipeta ou seringa) de forma a permitir resultados reprodutíveis, a amostra é aspirada com um pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa ou gás, de forma a penetrar no adsorvente [2]. Depois de toda a fase líquida ser drenada, é realizada a etapa de remoção dos interferentes, também conhecida como lavagem com solvente; esta etapa visa eliminar os interferentes utilizando um solvente

que não possui força suficiente para eluir o analito de interesse da FE. Finalmente, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente de forma a coletá-lo em uma concentração já apropriada para a análise, conforme demonstrado na Fig.6 <sup>[2, 60]</sup>.



**Figura 6. Principais etapas empregadas em EFS visando o isolamento de um composto ou classe de compostos <sup>[60]</sup>.**

Dentre as finalidades da EFS destacam-se a pré-concentração, cujo o principal objetivo é concentrar os analitos presentes em um grande volume de amostra aprisionando-os na fase sólida e descartando os interferentes. Em etapa seguinte, elui-se o analito de interesse com pequena quantidade de solvente (50 a 500 microlitros), de forma que o analito coletado estará mais concentrado do que na amostra original <sup>[2]</sup>. Desta forma, a pré-concentração permite a redução da manipulação de amostra, o tamanho da amostra e o consumo de solventes orgânicos, bem como uma maior facilidade de automação e, conseqüentemente, a uma redução significativa no tempo de análise <sup>[61]</sup>.

A amostra original pode ser concentrada o suficiente para a análise, mas caso parte dos interferentes fiquem retida na fase sólida é necessário isolar o analito na FE através de um processo de limpeza da amostra; geralmente utiliza-se H<sub>2</sub>O ou solvente no qual o analito possui uma pequena afinidade. Já no isolamento da matriz, o objetivo é reter os interferentes da matriz na FE em vez do analito de interesse que elui diretamente com o solvente da amostra, assim o analito é coletado em um frasco para a análise e os interferentes são retidos na FE do cartucho que é então descartado [2].

A EFS permite a injeção direta da amostra no sistema de análise, podendo resolver os problemas do extenso manuseamento das amostras que pode levar à contaminação e perda de amostra, diminuir os longos tempos de preparo das amostras e permitem a simultânea remoção de componentes da matriz e a pré-concentração dos analitos [61].

O aprimoramento da EFS levou ao desenvolvimento de técnicas miniaturizadas como a microextração em fase sólida (MEFS ou SPME *solid phase micro extraction*), a extração sortiva em barras de agitação (ESBA ou SBSE *stir-bar sorptive extraction*) e a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS ou MSPD *matrix solid-phase dispersion*); estas duas últimas são técnicas que não utilizam solvente para a extração, mas não são ainda tão difundidas como a EFS; mas mostra algumas vantagens quando comparada aos métodos clássicos, principalmente na economia de tempo e de solvente [2, 59].

## 2.7. Análise Térmica

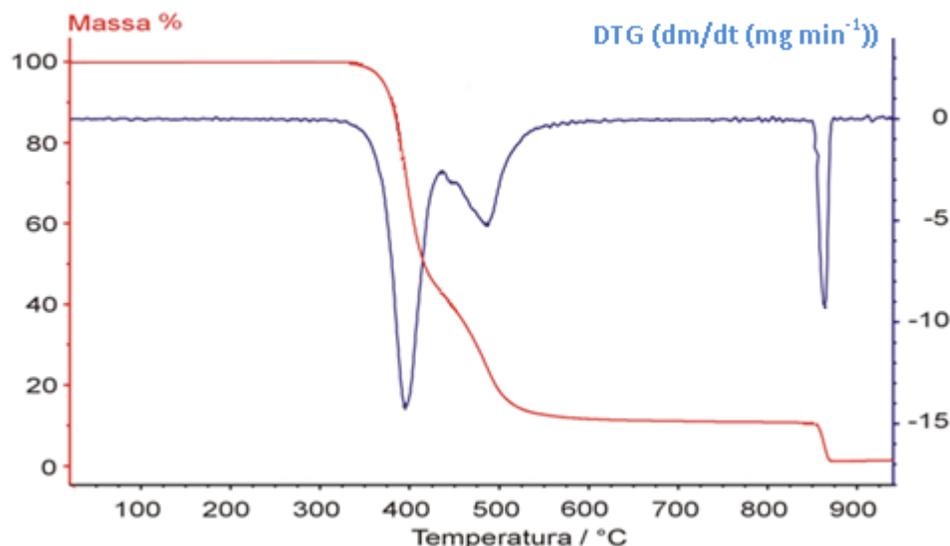
Análise térmica é o termo utilizado para definir um grupo de técnicas em que as variações de propriedades físicas ou químicas e/ou de seus produtos de reação de uma substância são medidas em função da temperatura e sob uma atmosfera específica [3,62].

Análise térmica é utilizada na análise de minerais, de substâncias orgânicas e inorgânicos, metais, cerâmica, materiais eletrônicos, polímeros, produtos farmacêuticos, produtos alimentícios e materiais biológicos <sup>[63]</sup> e também para o desenvolvimento de uma enorme variabilidade de estudos <sup>[62]</sup>. Dentre as técnicas termoanalíticas temos a Análise Termogravimétrica (TG ou também designada com TGA), Análise Termogravimétrica Derivativa (DTG - *Derivative Thermogravimetry*), a Análise Térmica Diferencial (DTA-*Differential Thermal Analysis*) e a Calorimetria de varredura diferencial (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*) <sup>[3]</sup>.

As análises Termogravimétricas (TG ou TGA) fornecem informações quantitativas com relação às variações de massa da amostra (perda ou ganho) em função do tempo e/ou temperatura, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob determinadas condições da atmosfera <sup>[62]</sup>. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante, a temperatura em que começam a se decompor, além de acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição <sup>[62]</sup>. Os experimentos são executados por meio de uma balança de precisão e um forno programado para que a temperatura aumente linearmente com o tempo, em uma atmosfera específica,<sup>[3]</sup> as análises podem ser feitas seguindo uma variação preestabelecida de temperatura, ou sob uma temperatura constante (isotérmicas) de interesse <sup>[64]</sup>.

O caráter específico de uma sequência de reações físico-químicas que ocorrem em certas condições de temperatura, e em dada velocidade, são características de um determinado composto ou sistema, dando assim origem a termogramas particulares <sup>[64]</sup>.

Os resultados são apresentados na forma de uma curva termogravimétrica, em que se registra a variação de massa em função da temperatura ou do tempo, ou na forma da curva termogravimétrica derivativa (DTG), em que se registra a primeira derivada da TG contra a variação da temperatura ou do tempo, conforme a Fig.7 <sup>[3]</sup>.



**Figura 7. Curva termogravimétrica(TG) em vermelho e Curva termogravimétrica derivativa (DTG) em azul .(Figura adaptada da Fonte <sup>[62]</sup>).**

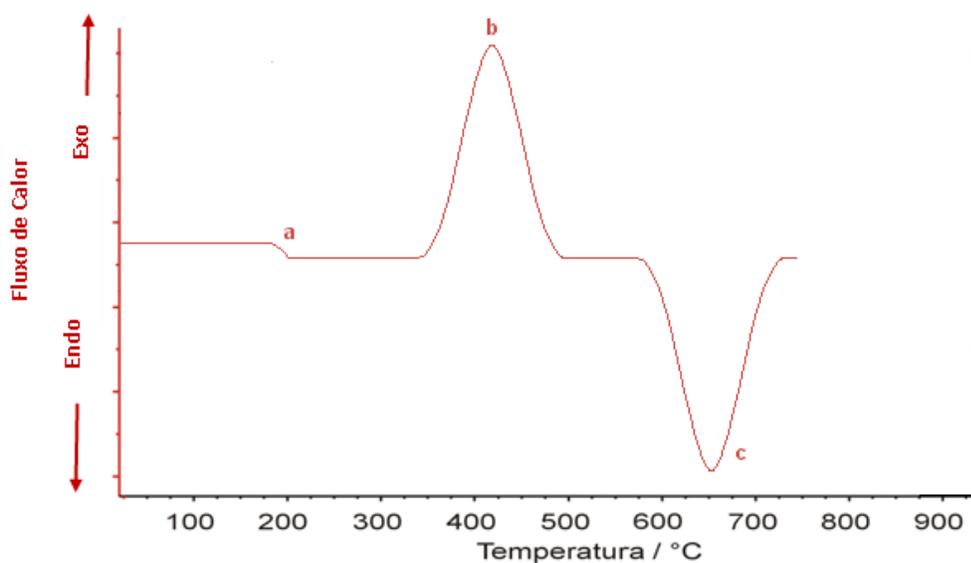
Na análise da curva termogravimétrica, nas regiões horizontais (patamares) não ocorrem perdas de massa, já nas regiões curvas isto acontece <sup>[3]</sup>. As variações de massa podem ser devido à ruptura ou formação de ligações, liberação ou absorção de produtos voláteis, ou pirólise. A termogravimetria derivativa (DTG) pode ser utilizada para verificar as diferenças entre termogramas <sup>[65]</sup>. Por este motivo, as curvas termogravimétricas podem fornecer dados valiosos para o estudo da termodinâmica e da cinética de transformações <sup>[65]</sup>. Além de informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado <sup>[66]</sup>.

A curva DTG é um artifício matemático que torna mais perceptíveis as mudanças de massa ao longo de uma análise termogravimétrica. A curva resultante corresponde a derivada primeira da curva relacionando a massa em função do tempo ( $dm/dt$ ) para cada temperatura em curso durante a análise<sup>[62]</sup>. É habitual que sejam apresentados em um mesmo diagrama cartesiano as curvas TG e DTG, de forma a facilitar as comparações e as determinações dos pontos de interesse.

As curvas TG e DTG são extremamente influenciadas por fatores instrumentais como a razão de aquecimento, atmosfera ( $N_2$ , ar ou outros), vazão de gás, composição do cadinho, geometria do compartimento de amostra, tamanho e forma do forno, bem como por fatores relacionados às características da amostra (quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido) que podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados<sup>[66]</sup>.

A Análise Térmica Diferencial (DTA) é a técnica pela qual a substância a ser analisada e o material de referência (termicamente estável) são submetidos a uma programação controlada de temperatura (aquecimento ou resfriamento)<sup>[3,62]</sup>. As transformações sofridas pela amostra podem ocorrer com liberação ou consumo de calor, enquanto que a referência permanece inalterada. Em consequência, a temperatura da amostra em relação à referência pode apresentar-se maior ou menor, o que caracteriza respectivamente, um fenômeno endotérmico ou exotérmico, e que gera picos DTA das respectivas transformações<sup>[66]</sup>.

As curvas DTA representam os registros de  $\Delta T$  em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos<sup>[66]</sup>. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes endotérmicos, conforme a Fig.8.



**Figura 8. Curva típica de uma análise térmica diferencial.** a-)Variação da capacidade calorífica, b) Reação exotérmica, c) Reação endotérmica. (Figura adaptada da Fonte<sup>[62]</sup>).

A forma e a área dos picos fornecem informações sobre a natureza da amostra em análise, picos endotérmicos agudos correspondem a mudanças de cristalinidade ou a processos de fusão e picos endotérmicos largos a reações de desidratação. Mudanças físicas fornecem normalmente curvas endotérmicas, e reações químicas, particularmente as de natureza oxidativa, predominam curvas exotérmicas<sup>[3]</sup>.

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) é a técnica derivada da análise térmica diferencial (DTA),<sup>[62]</sup> na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura<sup>[66]</sup>.

Os picos obtidos por DTA e DSC são influenciados pelos mesmos fatores que afetam as curvas termogravimétricas. Assim, velocidade de aquecimento, atmosferas diferentes e a

geometria do compartimento de porta amostra podem alterar a posição dos picos de DTA e DSC [3].

A associação de dados provenientes dos ensaios de TG/DTG e DSC é uma excelente estratégia para uma melhor caracterização de materiais, visto que a TG/DTG indicam eventos térmicos relacionados a variações de massa, enquanto a DSC detecta eventos associados a variações de temperatura, entalpia e/ou calor específico [62]. Por exemplo, eventos térmicos de origem física, como mudança de estado físico (fusão), podem ser inequivocamente atribuídos a partir da curva DSC, desde que na mesma faixa de temperatura não forem observados nas curvas TG/DTG eventos de perda de massa. Para melhor interpretação dos resultados e evitar possíveis equívocos é imprescindível à comparação das curvas TG/DTG e DSC obtidas nas mesmas condições experimentais [66].

De forma geral a análise térmica pode ser empregada para diferentes aplicações, como: identificação e análise da pureza de materiais; determinação de temperaturas e entalpias características de mudanças de estados físicos (fusão e vaporização); transformações de fases e reações e avaliação da cinética de decomposição térmica [66]. A análise térmica não é apenas um método qualitativo, pois proporciona resultados quantitativos termodinâmicos e cinéticos quanto às propriedades dos materiais, podendo inclusive ser empregada para caracterizar material de síntese, com a vantagem do menor tempo de ensaio e a utilização de pequenas quantidades de amostras [66]. Ainda, fornece detalhes dos processos de decomposição térmica, que por sua vez, facilitam a estimativa da estrutura da amostra e sua composição [65].

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver uma nova modalidade cromatográfica para análise de compostos orgânicos, utilizando cromatografia líquida (CL) associada aos processos oxidativos avançados, possibilitando a identificação dos analitos através da obtenção de sua impressão digital oxidativa.

#### 3.2. Objetivos específicos

- a-) Desenvolvimento de procedimentos para determinação de compostos orgânicos por CL convencional.
- b-) Estudo da oxidação parcial de compostos orgânicos para utilização no processo de identificação, baseada na impressão digital oxidativa.
- c-) Utilizar sistema SIA juntamente com a CL para a otimização das reações utilizando os processos oxidativos avançados e a extração em fase sólida .
- d-) Identificação das estruturas dos prováveis intermediários formados durante a etapa de oxidação parcial envolvendo os processos oxidativos avançados, via análise térmica.
- e-) Evitar a utilização de solventes orgânicos tóxicos nos procedimentos para que os métodos analíticos possam ser classificados como limpos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico (grau cromatográfico e espectroscópico) e no preparo de soluções aquosas foi utilizada água ultra-pura.

#### Reagentes

Riboflavina ( $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ) e Cianocobalamina ( $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ ) (Sigma), sulfato ferroso hidratado ( $Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), dióxido de titânio ( $TiO_2$ ), acetato de amônio ( $C_2H_5ONH_4$ ), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) .

#### Solventes

Álcool metílico ( $CH_3OH$ ), álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) e clorofórmio ( $CHCl_3$ ) grau cromatográfico e espectroscópico.

Para a análise de RMN foi utilizado água deuterada ( $D_2O$ ) e dimetil sulfóxido deuterado (DMSO).

### 4.2. Equipamentos e Acessórios

#### 4.2.1. Espectrofotômetro

Para a obtenção de espectros de UV/Vis das diferentes espécies químicas e verificação da possibilidade de degradação dos compostos submetidos à reação de fenton, foi utilizado um espectrofotômetro de varredura marca Varian modelo Cary -50, com cubeta de quartzo.

#### 4.2.2. Potenciômetro

Para as medidas de pH foi utilizado um potenciômetro (Qualxtron) modelo 8010 com eletrodo combinado de vidro e de referência Ag/AgCl.

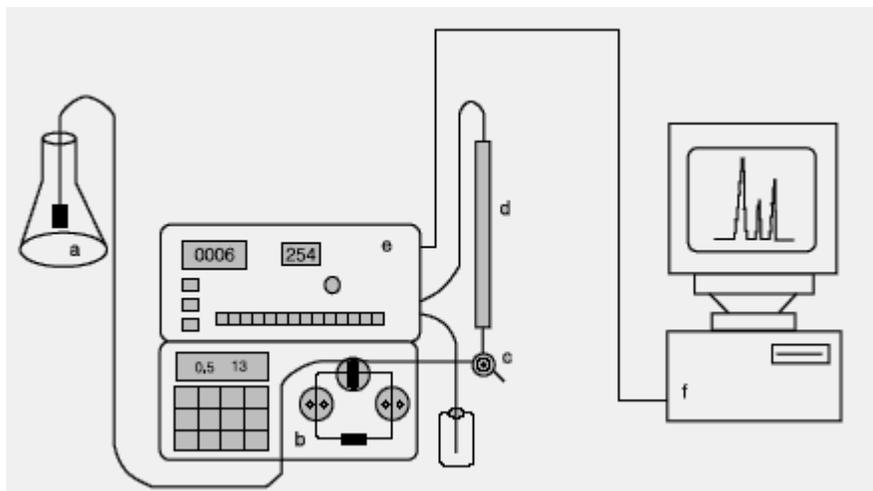
#### 4.2.3. Extração em Fase Sólida

Para a extração em fase sólida foi utilizada uma micro-coluna com 50 mg de fase estacionária do tipo octil (C8) e octadecilsilano (C18) da marca Thermo Scientific, sendo as partículas de C8 e C18 não encapada.

#### 4.2.4. Cromatógrafo Líquido

Para a obtenção dos cromatogramas foi utilizada uma Estação de Trabalho Cromatográfica da marca Termo (Fig.9) com programa de gerenciamento *Chromquest* contendo:

- bomba de pistão recíprocante com quatro vias;
- injetor manual Termo com alça de amostragem de 20 µL e 50 µL;
- coluna cromatográfica C18 (microsorb 250 x 4,6 mm com partículas de 5 µm);
- detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos, com cela de 5 cm de caminho óptico.



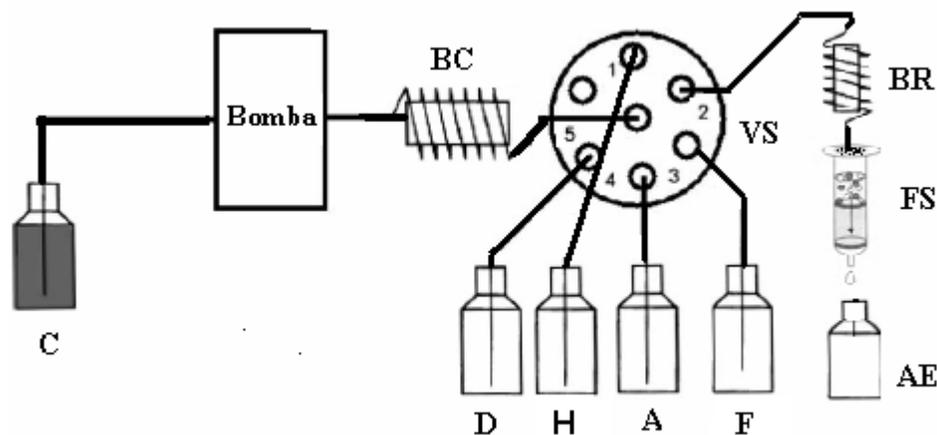
**Figura 9. Cromatógrafo Líquido.** (a) reservatório da fase móvel, (b) bomba de alta pressão, (c) válvula de injeção, (d) coluna separação e pré-coluna, (e) detector e (f) registrador <sup>[16]</sup>.

#### 4.2.5. Fonte de Luz Ultravioleta

Para a irradiação das amostras foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio de 80 W de potência sem bulbo protetor, a qual foi inserida dentro de uma caixa com espelhos e sem ventiladores, a cada reação a lâmpada era ligada por apenas 3,0 min para sua estabilização e após a ocorrência do tempo da reação determinada está era desligada.

#### 4.2.6. Sistema de Análise por Injeção Sequencial

Foi utilizado um sistema de análises químicas por injeção sequencial desenvolvido no laboratório que utiliza bomba de infusão Nutrimat B. Braun, modelo 2003011/3 (Rio de Janeiro, RJ) e como válvula seletora foi utilizado sistema com válvula solenóide de 6 portas da Cole Parmer Instrumentos Company, modelo EW-01367-83 (Vermon Hills, Estados Unidos) interfaceada com um micro-computador conforme a Fig. 10.



**Figura 10. Representação esquemática da montagem do sistema injeção sequencial (SIA) para a otimização das reações de clivagem dos compostos.** C – carregador (água destilada); Bomba - Peristáltica; BC – bobina coletora (2 m de comprimento, 0,8 mm de diâmetro interno e volume de 1000  $\mu\text{L}$ ), VS – válvula solenóide com 6 portas, válvula no qual é acionado posições do sistema de “aspirar” e “injetar” os componentes selecionados da reação; D – descarte; H – peróxido de hidrogênio; A – amostra(analito); F – solução de Fe(II); BR – bobina de reação (com 50 e 120 cm comprimento, 0,8 mm de diâmetro interno e volumes de 250 e 600  $\mu\text{L}$ ); FS – fase sólida utilizada na micro-extração (C18 e C8 – Thermo Scientific (50mg/1mL)), AE- analito extraído. Conexões: entre fluido transportador e a bomba foi utilizado tubo tipo Tygon (violeta/branco, 2,79 mm diâmetro interno); BC, VS e BR são tubos de polietileno.

#### 4.2.7. Liofilizador

Para a liofilização das amostras foi utilizado Liofilizador (freeze-dreyer) de bancada modelo Alpha-1-2-LD plus, Marca Christ de origem Alemã, operando nas condições de temperatura de  $-52^{\circ}\text{C}$  e pressão de 0,021 mbar.

#### 4.2.8. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Varian Mercury Plus 300 (MHz) usando uma sonda de líquido de 5 mm.

#### 4.2.9. Espectrômetro de massas

Para a análise das amostras foi utilizado um espectrômetro de massas DSQ II (“Thermo Electron”), com programa de gerenciamento “Xcalibur” (“Thermo Electron”) contendo:

- detector com fonte de ionização por impacto de elétrons (EI-70 e<sup>-</sup>V);
- analisador de massas do tipo quadrupolo;
- gás de arraste Hélio 5.0 (pureza 99,999%);

#### 4.2.10. Análise Térmica

Para a obtenção das curvas termogravimétricas (TG e DTG) foi utilizado o equipamento TGA-Q50 da TA-Instruments com porta amostras de platina.

Para obtenção das curvas por calorimetria de varredura diferencial (DSC) foi utilizado o equipamento DSC-Q20 da TA-Instruments com porta amostra de alumínio standard (ou seja, não hermética, somente fechada).

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Preparação das soluções

Foram preparadas em água destilada soluções das seguintes substâncias:

- Riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>): 100,0 mg L<sup>-1</sup> (2,6 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>); 80,0 mg L<sup>-1</sup> (2,1 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>); 60,0 mg L<sup>-1</sup> (1,6 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>), 50,0 mg L<sup>-1</sup> (1,3 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>) e 30,0 mg L<sup>-1</sup> (0,8 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>);
- Cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>): 100,0 mg L<sup>-1</sup> (7,4 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>); 60,0 mg L<sup>-1</sup> (4,4 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>);

- Solução de Fe (II): 1500,0 mg L<sup>-1</sup>; 1200,0 mg L<sup>-1</sup>; 1000,0 mg L<sup>-1</sup>; 900,0 mg L<sup>-1</sup>; 500,0 mg L<sup>-1</sup>; 400,0 mg L<sup>-1</sup>; 300,0 mg L<sup>-1</sup>; 200,0 mg L<sup>-1</sup> e 100,0 mg L<sup>-1</sup>;
- Peróxido de hidrogênio: 2,0 mol L<sup>-1</sup>; 1,0 mol L<sup>-1</sup>; 0,5 mol L<sup>-1</sup>; 0,2 mol L<sup>-1</sup>; 0,1 mol L<sup>-1</sup>; 0,05 mol L<sup>-1</sup>; 0,01 mol L<sup>-1</sup>, 0,005 mol L<sup>-1</sup> e 0,001 mol L<sup>-1</sup>.

Todas as soluções e os padrões preparados foram mantidos sob refrigeração e as soluções de ferro (II) e a de peróxido de hidrogênio foram preparadas diariamente.

#### 4.3.2. Estudo de degradação dos compostos

Primeiramente, obteve-se o espectro de absorção molecular dos compostos submetidos à análise, riboflavina e a cianocobalamina na região do UV/Vis.

Após, foi realizado um estudo da reação de degradação de cada composto sob a reação de fenton, conforme as condições especificadas na Tabela 4.

**Tabela 4. Condições para a reação degradação da riboflavina e cianocobalamina com o reagente de Fenton.**

Analito	Analito (mg L <sup>-1</sup> )	Solução de Fe(II) (mg L <sup>-1</sup> )	Solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	Tempo Reação (min)
Riboflavina	22,0	100	0,002	360
Cianocobalamina	36,0	100	0,002	360

Para o perfil da reação degradação foi realizada a leitura dos espectros conforme as condições especificadas na Tab.5.

**Tabela 5. Condições do estudo da reação de degradação com o reagente de Fenton.**

<b>Período (min)</b>	<b>Tempo de obtenção de cada espectro (min)</b>
0,5 a 60,0	0,5
61,0 a 120,0	1,0
121,0 a 180,0	2,0
181,0 a 360,0	5,0

#### **4.3.3. Análise das Amostras**

Amostras foram analisadas primeiramente por Cromatografia líquida, após por Espectrometria de Massas, por Ressonância Magnética Nuclear e Análise Termogravimétrica.

Nas etapas iniciais, foram realizados ensaios de degradação dos compostos utilizando-se processos oxidativos avançados, reação de Fenton, sendo os produtos obtidos analisados por Cromatografia Líquida. Após a otimização da melhor condição para oxidação parcial dos analitos foram realizadas as coletas das frações, num total de 5 frações para a riboflavina (foram injetadas aproximadamente 30 amostras, sendo cada uma das frações coletadas separadamente) e 4 frações para a cianocobalamina (foram injetadas aproximadamente 15 amostras, sendo cada uma das frações coletadas separadamente). Como o volume obtido das frações coletadas era grande, pois estavam misturadas à FM utilizada na separação cromatográfica, às frações foram congeladas e liofilizadas.

As frações que foram submetidas à liofilização da riboflavina e de cianocobalamina foram submetidas à análise por espectrometria de massas e RMN.

Para as análises termogravimétricas foram analisadas os padrões da riboflavina e cianocobalamina.

#### 4.3.4. Condições das análises

##### 4.3.4.1. Análise por Cromatografia Líquida

###### Análise da Riboflavina

A região monitorada pelo detector com arranjo de fotodiodo foi de 200 a 650 nm; como fase estacionária foi utilizada uma coluna de separação C18 (octadecilsilano) e uma pré-coluna com mesma fase estacionária. Como fase móvel foi utilizada duas fases: Fase A composta por 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 1% álcool etílico e Fase B composta 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 17% álcool etílico, com ajuste de pH 7,00 para ambas as soluções, sendo o modo de eluição por gradiente, conforme as condições da Tab. 6.

**Tabela 6. Método de eluição utilizado no sistema cromatográfico CL para a análise da riboflavina.**

Tempo (min)	Fase A	Fase B
0,0 a 2,5	98,0%	2,0%
2,5 a 15,0	0,0%	100,0%
15,0 a 40,0	0,0%	100,0%

###### Análise da Cianocobalamina

A região monitorada pelo detector com arranjo de fotodiodo foi de 200 a 650 nm, como fase estacionária foi utilizada uma coluna de separação C18 (octadecilsilano) e uma pré-coluna com mesma fase estacionária. Como fase móvel foi utilizada duas fases sendo: Fase A

composta por 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 1% álcool etílico e Fase C composta 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 30% álcool etílico, com ajuste de pH 7,00 para ambas as soluções, sendo o modo de eluição por gradiente conforme as condições da Tab.7.

**Tabela 7. Método de eluição utilizado no sistema cromatográfico CL para a análise da cianocobalamina.**

Tempo (min)	Fase A	Fase C
0,0 a 2,5	75,0%	25,0%
2,5 a 10,0	50,0%	50,0%
10,0 a 15,0	25,0%	75,0%
15,0 a 20,0	10,0%	90,0%
20,0 a 22,0	0,0%	100,0%
22,0 a 25,0	0,0%	100,0%

#### 4.3.4.2. Análise por Ressonância Magnética Nuclear

Foram obtidos espectros de RMN da riboflavina em água deuterada e também em DMSO deuterado para verificar a melhor condição de solubilidade.

As frações de 1 a 5 da riboflavina mediante a separação cromatográfica e as amostras submetidas à reação de fenton (em um total de 15 amostras), sem separação cromatográfica, foram submetidas à análise por RMN, utilizando 0,7 mL de DMSO deuterado.

Para a obtenção do espectro de RMN da cianocobalamina foi utilizado água deuterada, as frações obtidas mediante a separação cromatográfica da cianocobalamina não foram analisadas por RMN, devido aos resultados obtidos com as frações da riboflavina que não foram conclusivas para a elucidação da estrutura molecular mediante a pequena quantidade de amostra

não se tornando possível a obtenção da estrutura dos produtos de oxidação formados com esta técnica de análise.

#### **4.3.4.3. Espectrometria de Massas**

A inserção direta da amostra no espectrômetro de massas foi realizada através da dissolução da amostra em álcool metílico, sendo aplicado um pequeno volume da solução em um cadinho de vidro, deixando-se o solvente evaporar e inserindo a amostra no espectrômetro de massas a 50° C a uma taxa de 60° C min<sup>-1</sup> até temperatura de 450° C.

#### **4.3.4.4. Análise Termogravimétrica.**

Para as análises de TG foi utilizado o gás N<sub>2</sub> com uma vazão de 100 mL min<sup>-1</sup>, com uma taxa de aquecimento 1° C min<sup>-1</sup> até a temperatura de 1000° C para a riboflavina e para a cianocobalamina, com o tempo total de análise para cada analito de 17 horas.

Para as análises por DSC foi utilizado o gás N<sub>2</sub> com uma vazão de 50 mL min<sup>-1</sup>, com uma taxa de aquecimento 10° C min<sup>-1</sup> até a temperatura de 350° C para a riboflavina e para a cianocobalamina, com o tempo total de análise para cada analito de 1 hora.

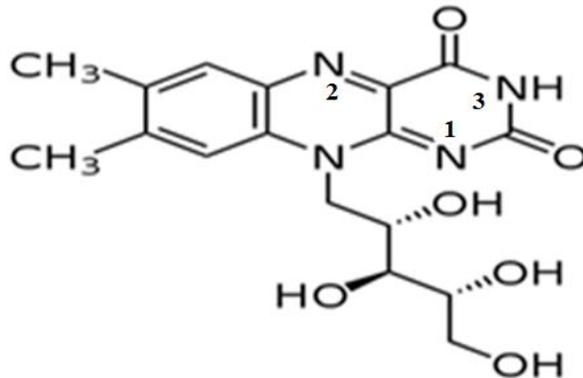
#### **4.3.5. Ensaios com Riboflavina e a Cianocobalamina.**

Todos os ensaios foram realizados utilizando o sistema SIA, juntamente com as reações de Fenton e a análise por Cromatografia Líquida para a obtenção da identidade digital oxidativa dos compostos analisados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

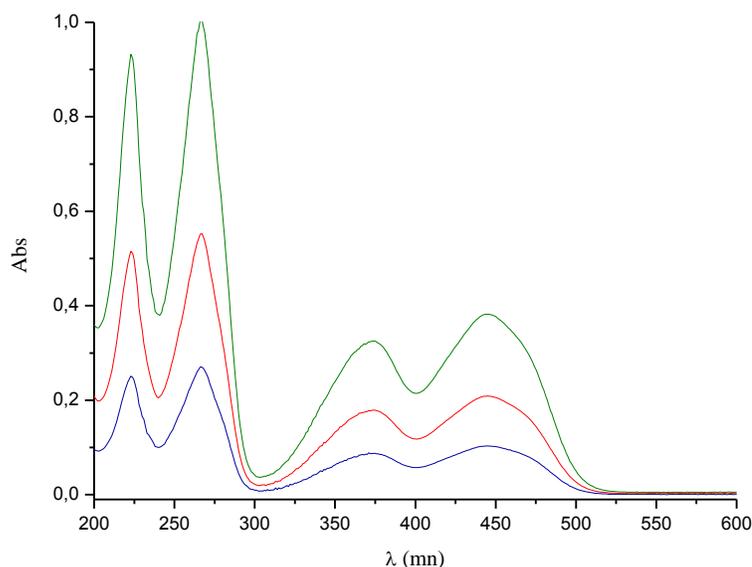
### 5.1. Ensaio com Riboflavina

A riboflavina, conhecida como vitamina B2 (Fig. 11), é composta por um anel de isoaloxazina com cadeia lateral de ribitol. A riboflavina e suas coenzimas são sensíveis a meios ácidos e básicos, particularmente na presença da luz UV <sup>[67]</sup>. Em solução, as formas da riboflavina de pKas 6,20 (N-1); 8,40 (N-2) e 10,20 (N-3) (Fig. 11) são destruídas pela ação da radiação ultravioleta e visível, tendo sua instabilidade aumentada com o aumento da temperatura e do pH. Se protegida da luz, soluções aquosas com pH entre 2,0 a 5,0 desta vitamina permanecem estáveis até 120° C; no entanto, acima de pH 7,0 o anel de isoaloxazina é rapidamente destruído em elevadas temperaturas. A riboflavina é estável a ação do calor, oxigênio e de muitos agentes oxidantes na ausência de luz <sup>[67]</sup>.



**Figura 11. Estrutura da Riboflavina** <sup>[67]</sup>.

Para a caracterização da riboflavina foi realizado espectros de absorção da radiação eletromagnética na região do ultravioleta e visível (Fig.12) nas concentrações de 4,0; 8,0 e 16,0 mg L<sup>-1</sup>, sendo verificado a presença de 4 máximos de absorção nos comprimentos de onda 220, 270, 370 e 445 nm.

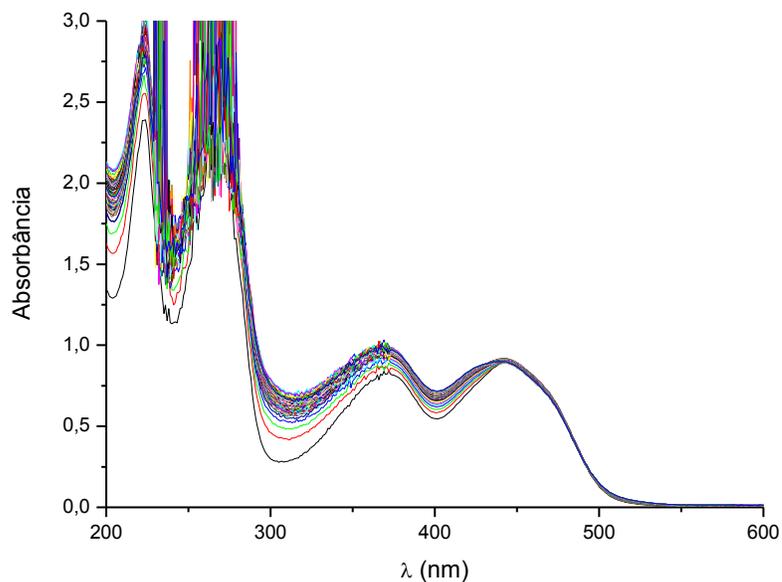


**Figura 12.** Espectro eletrônico da riboflavina em solução aquosa. Condições concentrações de 4,0 (—), 8,0 (—) e 16,0 mg L<sup>-1</sup> (—).

Para a realização do estudo de degradação da riboflavina na presença do reagente de fenton, foram utilizadas soluções nas concentrações de 36,0 mg L<sup>-1</sup> da riboflavina, 500,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) e 0,01 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sob um tempo de reação de 360 min. Para concentrações menores de 36,0 mg L<sup>-1</sup> da riboflavina o espectro de absorção apresentava menor absorbância, fato que era ampliado devido à presença do reagente de Fenton, que além de provocar a degradação do composto também provocava espalhamento de luz na região de 200 a 280 nm (Fig.13), dificultando a obtenção dos sinais do perfil de degradação.

Quando a concentração da riboflavina era menor que 36,0 mg L<sup>-1</sup> e do reagente de Fenton alta, a reação de degradação ocorria rapidamente, não possibilitando a obtenção dos dados para se estudar a reação de degradação. Quando a concentração da riboflavina era maior que 36,0 mg L<sup>-1</sup> e do reagente de fenton baixa, o processo de degradação era muito lento, o

que inviabiliza o estudo. Assim, uma concentração intermediária tanto da vitamina quanto dos reagentes foram mais viáveis no processo de degradação, conforme apresentado na Fig. 13.



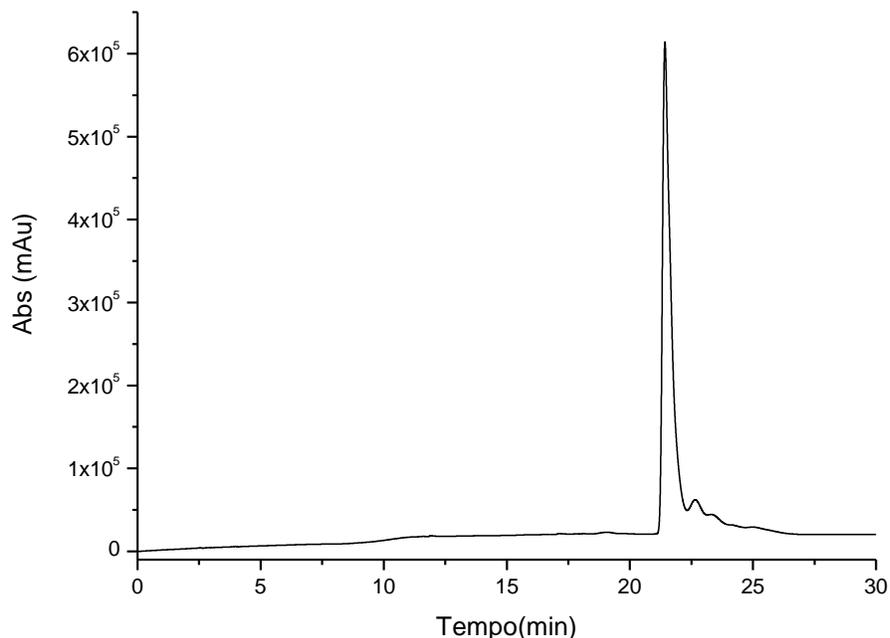
**Figura 13. Espectro eletrônico da reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton.** Condições: Riboflavina  $36,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $500,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  durante os 360 min de reação, as medidas ocorreram 0,5 min – 60 min; 1,0min - 61 a 120 min; 2,0 min – 121 a 180 min e 5,0 min até 360 min.

Analisando a Fig.13 pode se verificar que o reagente de fenton provocou a diminuição da intensidade dos máximos de absorção da riboflavina, demonstrando que o composto pode ser degradado utilizando as reações de Fenton.

Para se verificar o comportamento da riboflavina no meio reacional foi realizado ensaio cromatográfico (Fig. 14) nas condições especificadas no *Capítulo 4 - Materiais e Métodos* (pg. 57).

Com a análise cromatográfica (Fig.14) pode-se verificar que o tempo de retenção ( $t_r$ ) da riboflavina é de 21,5 min, pois o espectro do pico corresponde ao obtido para a solução padrão da riboflavina. Ainda, foi observado um pequeno pico com  $t_r$  de 22,7 min que foi atribuído a

um possível dímero da riboflavina, pois apresenta o mesmo espectro de absorção que o composto anterior.

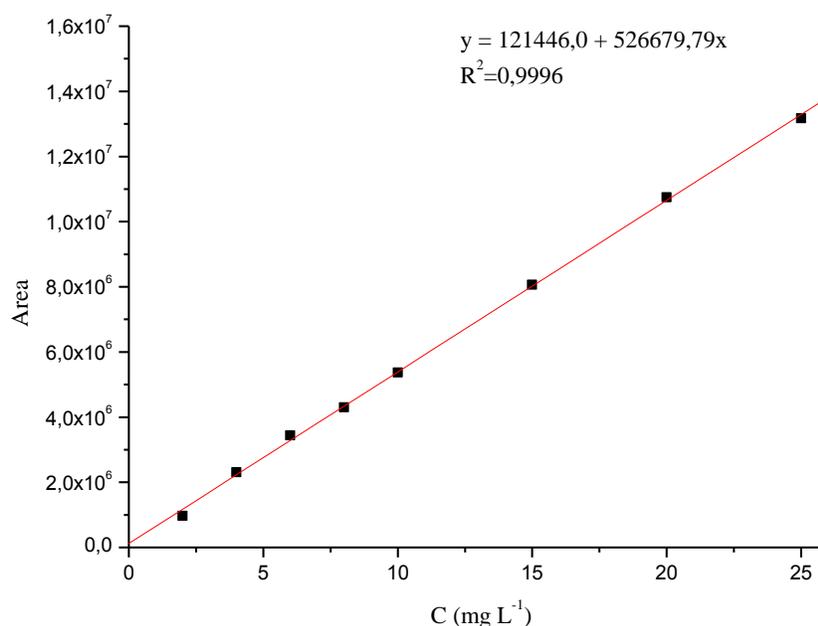


**Figura 14. Cromatograma da solução padrão da Riboflavina 20,0 mg L<sup>-1</sup>.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 20 µL de amostra, 270 nm.

Pode-se verificar também um alargamento de banda que pode ser devido à formação do dímero, pois o solvente utilizado como fase móvel (H<sub>2</sub>O e álcool etílico) é diferente do solvente (H<sub>2</sub>O) da amostra injetada. Ainda, pôde-se verificar (Fig. 12) um máximo de absorção na região de 270 nm; sendo que para fins cromatográficos também pode-se utilizar para a detecção deste composto os comprimentos de onda de 230 e 295 nm.

Foi construída curva analítica para a riboflavina (Fig. 15) utilizando as soluções padrão nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg L<sup>-1</sup> com volume de injeção

de amostra de 20  $\mu\text{L}$  objetivando-se a obtenção de dados que permitissem que a riboflavina pudesse ser quantificada após os processos de oxidação parcial.

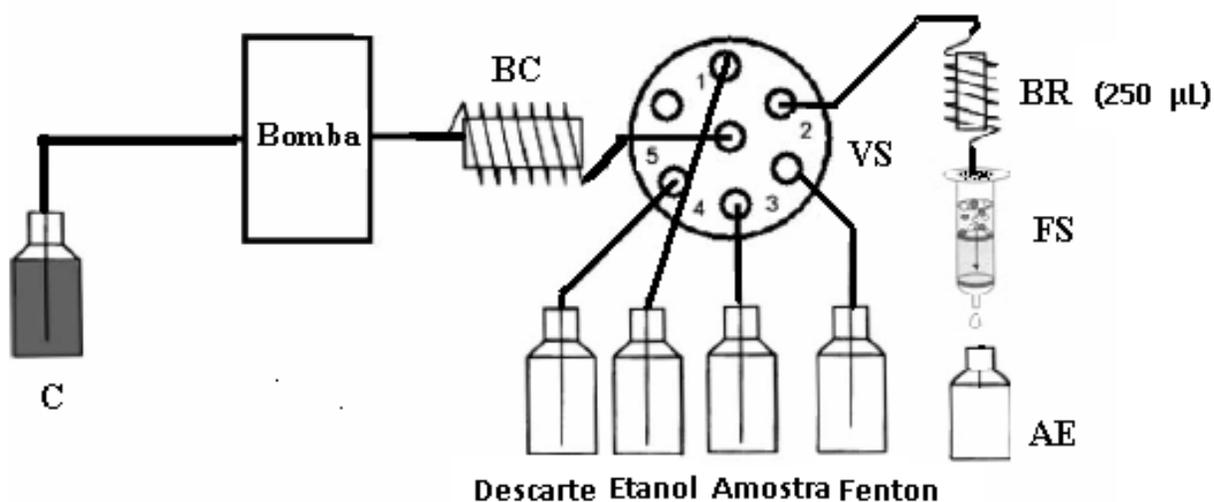


**Figura 15. Curva de calibração da Riboflavina nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0; 20 e 25  $\text{mg L}^{-1}$ .** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min; vazão 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , injeção de 20  $\mu\text{L}$  de amostra, 270 nm.

Após, estudos preliminares realizados em teste de bancada (batelada) sem um controle efetivo do tempo da reação, pode-se verificar que não havia uma repetitividade dos resultados aplicando a mesma condição da reação de degradação. Uma das formas de se melhorar o controle dos parâmetros da reação é através da utilização de sistemas por análise injeção seqüencial. Assim, foi desenvolvido no laboratório um sistema SIA convencional e as análises para a obtenção da identidade digital oxidativa foram realizadas com este sistema e com as reações de fenton. Desta forma, foram iniciados os testes com o sistema SIA utilizando soluções nas seguintes concentrações: Riboflavina 100,0; 60,0 e 50,0  $\text{mg L}^{-1}$ , solução de Fe(II) 1500,0;

1200,0; 1000,0; 900,0; 500,0; 400,0; 300,0; 200,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> e solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005 e 0,001 mol L<sup>-1</sup>.

O sistema SIA (Fig. 16) desenvolvido contém 5 vias, cada uma delas designada para as seguintes operações: via 1- álcool etílico(etanol); via 2 – bobina de reação e cartucho de extração; via 3 – reagente de fenton, via 4- riboflavina e via 5- descarte. A bomba peristáltica utilizada permite uma vazão de 0,5 a 6,0 mL min<sup>-1</sup>, nos estudos iniciais a vazão foi fixada em 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Para o processo de limpeza e pré-concentração da amostra, o cartucho de extração utilizado foi com uma capacidade de 50 mg de fase estacionária C18 não encapada.



**Figura 16. Representação esquemática do sistema SIA utilizado nas reações de Fenton.**

(Conforme as condições descritas no *Capítulo 4 – Materiais e Métodos*, pg. 53 ).

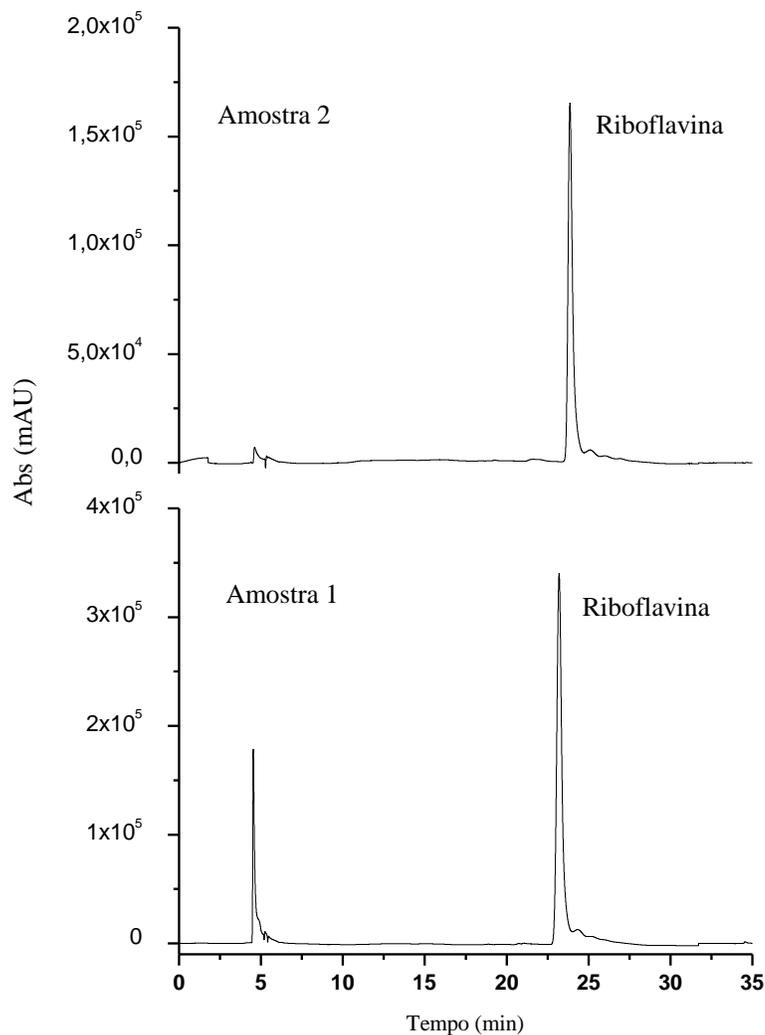
Os testes iniciais utilizando o sistema SIA foram realizados com a mistura da solução estoque de Fe(II) 1000,0 mg L<sup>-1</sup> e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mol L<sup>-1</sup> e preparando-se o reagente de fenton nas condições de concentração descritas na Tab. 8, antes de iniciar a reação com a o analito.

A sequência das etapas iniciais utilizadas para a reação de degradação da riboflavina com o reagente de fenton no sistema SIA estão descritas na Tabela 8.

**Tabela 8. Sequência de passos para reação de degradação da riboflavina com o reagente de fenton pelo sistema SIA testes iniciais (Amostras 1 e 2).**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (μL)
1	Lavagem (H <sub>2</sub> O – etanol- H <sub>2</sub> O)	1	16	1,5	Aspirar	400 - H <sub>2</sub> O 400- Etanol
2	Lavagem (H <sub>2</sub> O – etanol- H <sub>2</sub> O)	2	60	1,5	Injetar	1500- H <sub>2</sub> O 400- Etanol
3	Lavagem (H <sub>2</sub> O – etanol- H <sub>2</sub> O)	3	16	1,5	Aspirar	400 - H <sub>2</sub> O 400- Etanol
4	Lavagem (H <sub>2</sub> O – etanol- H <sub>2</sub> O)	4	16	1,5	Aspirar	400 - H <sub>2</sub> O 400 - Etanol
5	Descarte (Após cada etapa de lavagem, o solvente era descartado, via 5)	5	40	1,5	Injetar	1000 H <sub>2</sub> O
6	<b>Fenton</b> - (Fe (II) - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) Solução 1 (50,0 mg L <sup>-1</sup> - 0,50 mol L <sup>-1</sup> ) Solução 2 (100,0 mg L <sup>-1</sup> – 1,0 mol L <sup>-1</sup> )	3	16	1,5	Aspirar	400
7	Descarte	5	40	1,5	Injetar	1000
8	Amostra	4	16	1,5	Aspirar	400
9	Descarte	5	40	1,5	Injetar	1000
10	Fenton	3	6	1,5	Aspirar	150
11	Solução 1 (rib – 50,0 mg L <sup>-1</sup> ) Solução 2 (rib – 50,0 mg L <sup>-1</sup> )	5	4	1,5	Aspirar	100
12	BR(bobina de reação) e FS (fase sólida)	2	40	1,5	Injetar	1000
13	álcool etílico	1	32	1,5	Aspirar	800
14	álcool etílico (coleta da amostra)	1	20	1,5	Injetar	500
15	Lavagem	2	80	1,5	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

Os resultados obtidos, utilizando-se as condições da Tab. 8, nesta primeira sequência de experimentos não foram efetivos para promover a clivagem da riboflavina e obter os produtos de oxidação que dariam a identidade digital oxidativa do composto, conforme verificado na Fig.17.

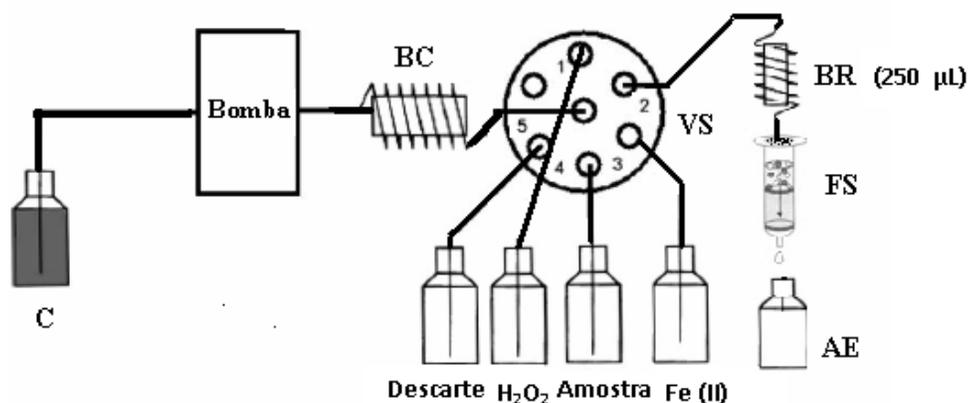


**Figura 17. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 8 para solução 1 e 2. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min. vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $20 \mu\text{L}$  de amostra, 270 nm.**

Um dos prováveis fatores que não possibilitou a reação de degradação e a formação dos produtos da oxidação foi a utilização da mistura do  $\text{Fe(II)}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  para produzir o reagente de Fenton, o que provavelmente diluiu os reagentes e provocou decréscimo na taxa de produção do

radical  $\text{HO}^\bullet$ , prejudicando a reação de clivagem da molécula, como pode ser verificado na Fig.17. Diante destes resultados, verificou-se a impossibilidade de utilizar o reagente de Fenton preparado antes do início da reação com o analito. Assim, a melhor alternativa seria utilizar a solução de  $\text{Fe(II)}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em vias separada. Desta forma, apenas quando a amostra e os reagentes de fenton fossem aspirados e enviados para a bobina de reação é que a reação de fenton seria iniciada.

Outra variável que prejudicava o processo de extração e que não permitia uma reprodução dos resultados era a utilização do eluente, álcool etílico, no próprio sistema SIA como descrito na Fig.16. O sistema desenvolvido não permitia distinguir quando o álcool etílico iniciava e terminava a sua passagem pela fase sólida do cartucho de extração, pois estes se misturavam com o fluido transportador, água destilada, não apresentando qualquer mudança visível que pudesse ser detectada. Assim, o eluente foi retirado do sistema SIA, e utilizado de forma manual nas análises; Desta forma, nos estudos posteriores foi utilizado o sistema SIA conforme as especificações da Fig. 18.



**Figura 18. Representação esquemática do sistema SIA utilizado nas reações de Fenton sem a utilização do eluente no sistema.** (Conforme as condições descritas no *Capítulo 4 – Materiais e Métodos*, pg. 53).

Com as adaptações no sistema SIA, passou a realizar a passagem do eluente de forma manual nas análises medindo-se o volume determinado para a eluição da amostra com uma micro-pipeta. Para que a passagem do eluente pela fase sólida fosse mais rápida, foi utilizado tubo de polipropileno (seringa sem agulha) preenchida com ar para facilitar a passagem do eluente sobre a FE do cartucho de extração, retirando-se assim o analito para posterior análise cromatográfica.

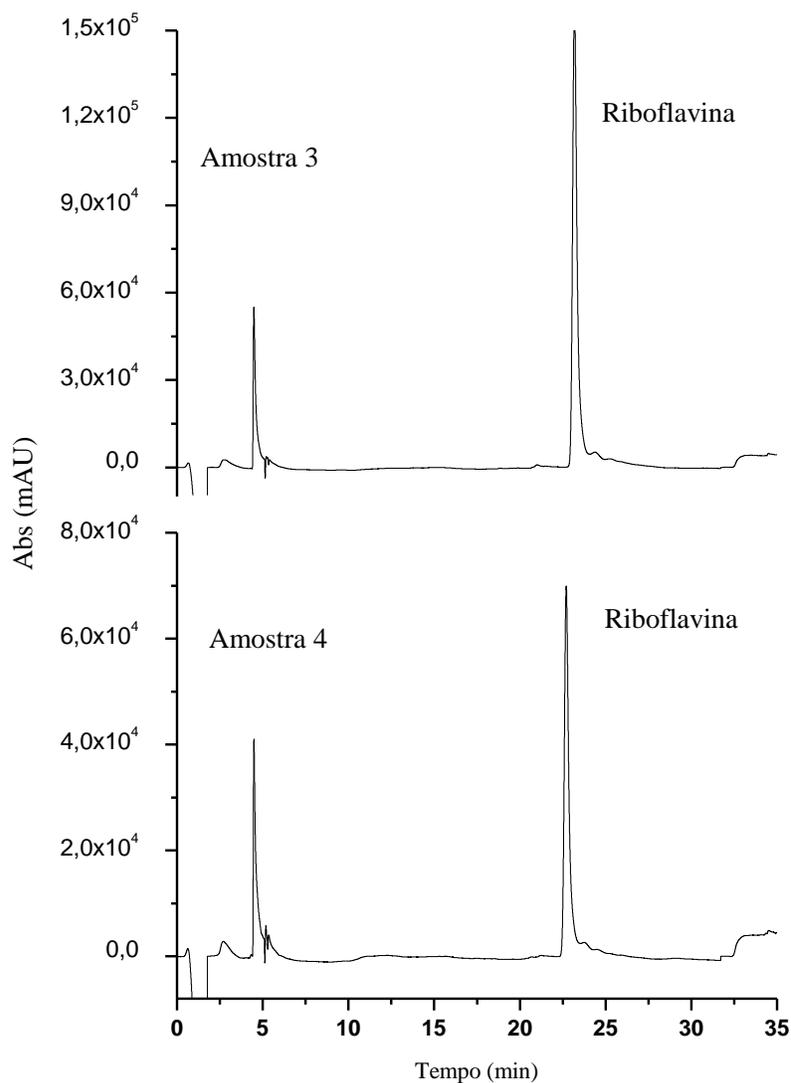
As reações de degradação da riboflavina ocorreram conforme as condições especificadas na Tabela 9, mantendo-se a sequência de passos de lavagem descrita na Tab. 8. Para simplificação, a partir da Tab. 9 estas etapas de lavagem foram omitidas.

**Tabela 9. Sequência de passos para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA para as Amostras 3 e 4.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	Solução Fe (II) 200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	16	1,5	Aspirar	400
7	Descarte	5	32	1,5	Injetar	800
8	Solução H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0 mol L <sup>-1</sup>	1	16	1,5	Aspirar	400
9	Descarte	5	32	1,5	Injetar	800
10	Amostra – Rib 50,0 mgL <sup>-1</sup>	4	16	1,5	Aspirar	400
11	Descarte	5	36	1,5	Injetar	800
12	Amostra 3 -Solução Fe (II) 200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	2	1,5	Aspirar	50
	Amostra 4 -Solução Fe (II) 200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	4	1,5	Aspirar	100
13	Amostra 3- Solução H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0 mol L <sup>-1</sup>	1	2	1,5	Aspirar	50
	Amostra 4- Solução H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0 mol L <sup>-1</sup>	1	4	1,5	Aspirar	100
14	Amostra 3 - Rib 50 mg L <sup>-1</sup>	4	2	1,5	Aspirar	50
	Amostra 4 - Rib 50 mg L <sup>-1</sup>	4	2	1,5	Aspirar	50
15	Bobina de reação (BR)	2	10	1,5	Injetar	250
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	40	1,5	Injetar	1000
18	álcool etílico (manual)	--	--	-----	-----	500
19	Lavagem	2	80	1,5	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.

Os resultados obtidos quando da utilização das condições especificadas na Tab. 9 demonstraram que o reagente de Fenton promoveu a degradação da riboflavina nas condições utilizadas para as Amostras 3 e 4, conforme a Fig. 19.



**Figura 19.** Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 9 para Amostras 3 e 4. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min. vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $20 \mu\text{L}$  de amostra,  $270 \text{ nm}$ .

Com estes resultados pode-se verificar que para a Amostra 4, a intensidade do sinal analítico para a riboflavina foi menor devido ao maior volume de reagente de fenton utilizado quando comparado ao volume do analito (Tab. 9). Assim, a taxa de degradação foi maior, mas para as duas amostras não foi possível à obtenção dos produtos de oxidação, provavelmente devido à utilização de concentração elevada de peróxido de hidrogênio, que promoveu a degradação dos produtos formados.

Desta forma, a sequência de experimentos realizados nesta etapa consistiu na avaliação da taxa de degradação da riboflavina, sendo investigadas as concentrações da solução de  $H_2O_2$  de 1,0; 0,1; 0,01; 0,005 e 0,001 mol  $L^{-1}$ . Para esta investigação foi utilizado o sistema SIA e as condições especificadas na Tab.10.

**Tabela 10. Sequência de passos para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA, modificação da concentração solução de  $H_2O_2$ .**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento ( $mL\ min^{-1}$ )	Direção da Vazão	Volume ( $\mu L$ )
6	Solução Fe (II) 200,0 $mg\ L^{-1}$	3	16	1,5	Aspirar	400
7	Descarte	5	30	1,5	Injetar	800
8	Solução $H_2O_2$ ( [ ] testadas)	1	16	1,5	Aspirar	400
9	Descarte	5	30	1,5	Injetar	800
10	Amostra – Rib 50,0 $mg\ L^{-1}$	4	16	1,5	Aspirar	400
11	Descarte	5	30	1,5	Injetar	800
12	Solução Fe (II) 200,0 $mg\ L^{-1}$	3	3	1,5	Aspirar	80
13	Solução $H_2O_2$ ( [ ] testadas)	1	3	1,5	Aspirar	80
14	Amostra– Rib 50,0 $mg\ L^{-1}$	4	3	1,5	Aspirar	80
15	Bobina de reação (BR)	2	10	1,5	Injetar	250
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	40	1,5	Injetar	1000
18	álcool etílico (manual)	--	--	-----	-----	300
19	Lavagem	2	80	1,5	Injetar	2000 – $H_2O$

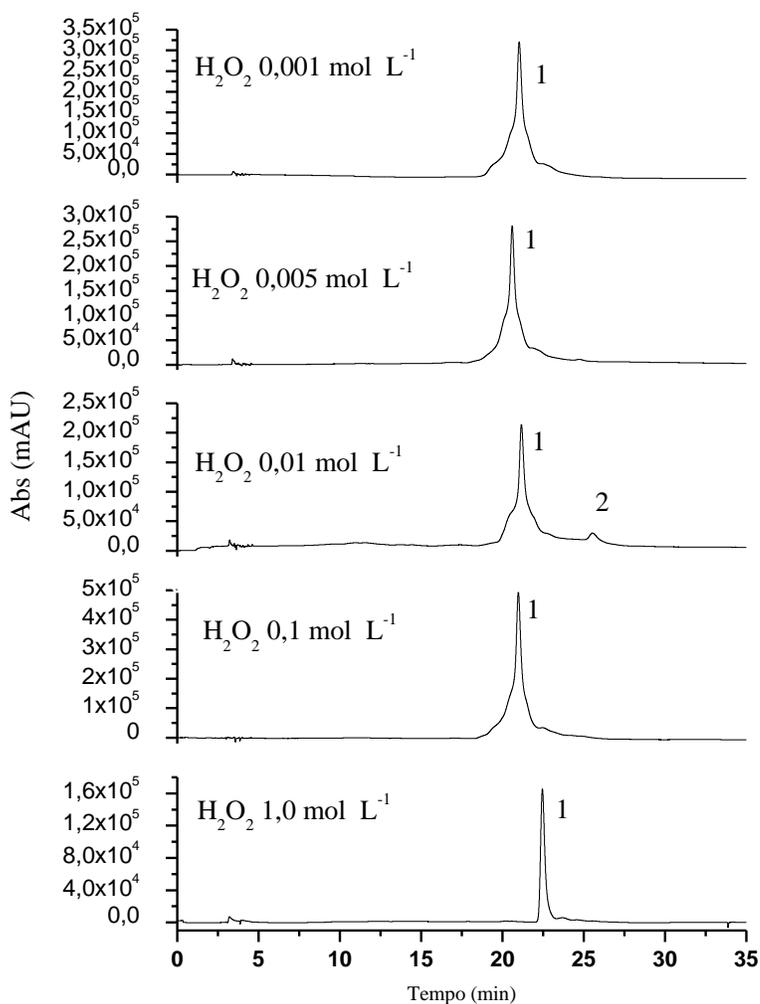
Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.

Seguindo a sequência de passos da Tab. 10, no qual para cada amostra foram modificadas: a concentração da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; a sequência de aspirações da amostra e reagente de fenton, sendo em uma primeira etapa aspiradas as soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o analito (riboflavina) e solução de  $\text{Fe(II)}$ . Para estes experimentos o volume de álcool etílico foi modificado de 500  $\mu\text{L}$  para 300  $\mu\text{L}$  na tentativa de aumentar os sinais analíticos dos produtos formados devido a menor diluição. Outro parâmetro que sofreu modificação foi o volume da alça de amostragem passando de 20 para 50  $\mu\text{L}$ , na análise cromatográfica objetivando também melhorar a intensidade dos sinais analíticos dos produtos formados pela reação de Fenton.

Diante destas modificações pôde-se verificar que soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração de 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  provocou a taxa de degradação mais efetiva da riboflavina, com a formação de produtos de degradação. Para a solução mais concentrada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,0  $\text{mol L}^{-1}$ ) ocorreu uma maior taxa de degradação, mas os subprodutos formados não apresentaram sinais no cromatograma, possivelmente porque também foram oxidados (Fig.20). Para a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$  a taxa de degradação observada para a riboflavina foi a menos efetiva, possivelmente porque a relação de  $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$  não era adequada para promover a clivagem da riboflavina nas condições.

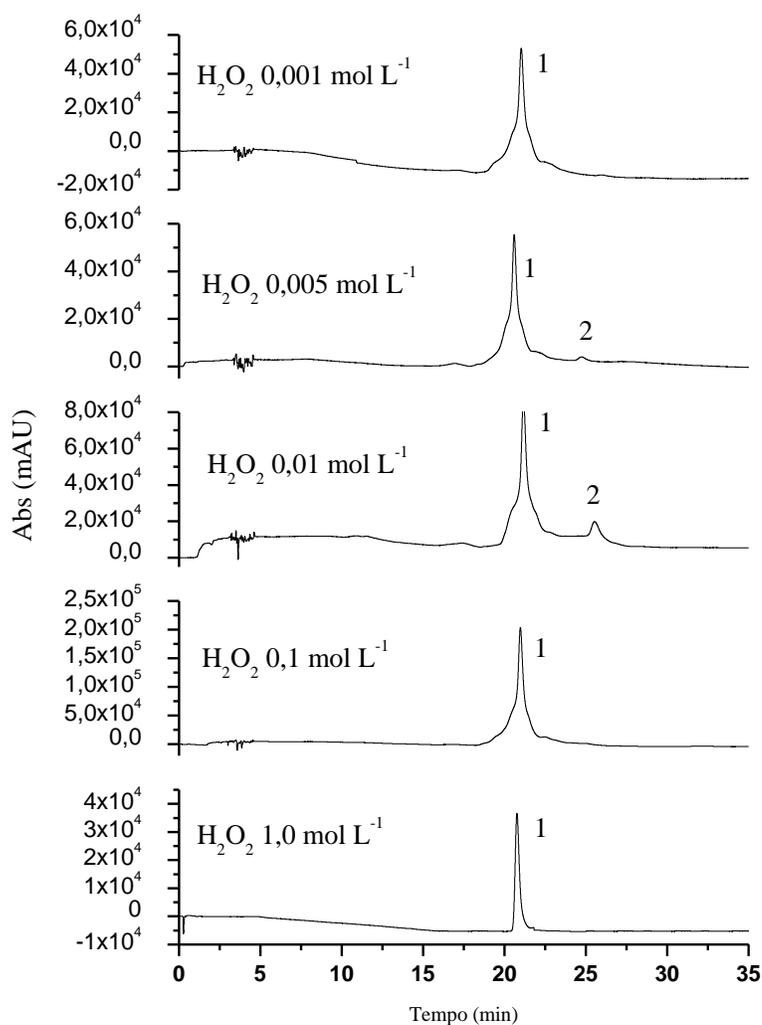
Para concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,005 e 0,001  $\text{mol L}^{-1}$  as taxas de degradação da riboflavina foram próximas àquelas apresentadas quando da utilização da concentração de 0,01  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; sendo observado a presença dos produtos da degradação. Contudo, os sinais analíticos foram de baixa intensidade, possivelmente a relação de  $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$  não foi adequada para a formação mais efetiva dos produtos de oxidação; ainda, o comprimento de onda utilizado para monitoramento não era o mais adequado para a medida dos produtos de

oxidação formados, pois em 270 nm estes produtos não são detectáveis para a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,005 e 0,001 mol  $\text{L}^{-1}$  conforme verificada na Fig. 20.



**Figura 20.** Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 10 investigação da concentração da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0; 0,1; 0,01; 0,005 e 0,001 mol  $\text{L}^{-1}$  com monitoramento em 270 nm, sendo 1 riboflavina e 2 produto de oxidação. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min. vazão 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , injeção de 50  $\mu\text{L}$  de amostra.

Quando realizou-se o monitoramento do sinais analíticos em 295 nm (Fig.21) pôde-se ter uma melhor visualização de sinais dos possíveis produtos de degradação.

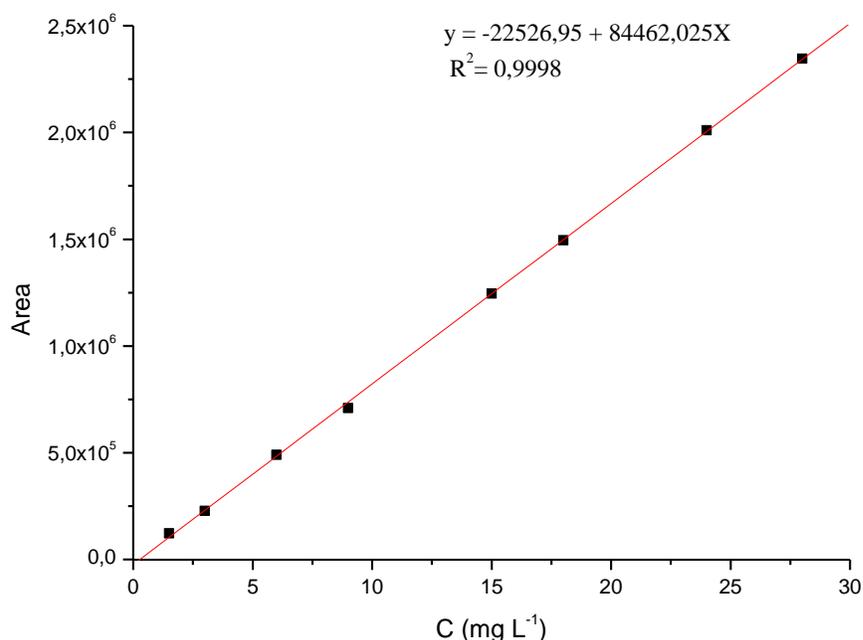


**Figura 21. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 10 investigação da concentração da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0; 0,1; 0,01; 0,005 e 0,001 mol L<sup>-1</sup> com monitoramento em 295 nm, sendo 1 riboflavina e 2 produto de oxidação.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min. vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 μL de amostra.

Diante desses resultados, a concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizada na otimização da reação de Fenton para promover a degradação da riboflavina e o comprimento de onda de monitoramento na etapa da separação cromatográfica foi modificado de 270 nm

para 295 nm, pois apesar da riboflavina possuir máximo de absorção molar em 270 nm, muitas vezes, os produtos da oxidação absorvem pouco nesta região. Assim, as separações cromatográficas passaram a ser monitoradas em 295 nm o que provocou a diminuição da intensidade do sinal analítico da riboflavina e deixou mais perceptível o sinal dos produtos da oxidação (Fig.21).

Com a diminuição do volume do eluente (álcool etílico) para 300  $\mu\text{L}$  e a utilização de uma alça de amostragem no sistema cromatográfico de 50  $\mu\text{L}$  houve a intensificação dos sinais dos produtos formados; no entanto foi necessário construir nova curva analítica sob estas novas condições experimentais (Fig. 22).



**Figura 22.** Curva de calibração da riboflavina nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; 15,0; 18,0; 24,0 e 28,0  $\text{mg L}^{-1}$  com injeção de 50  $\mu\text{L}$  de amostra e monitoramento em 295 nm. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min; vazão 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ .

Com as modificações efetuadas houve a necessidade de substituir a bobina de reação do sistema SIA de 50 cm (250  $\mu\text{L}$ ) para uma bobina de 120 cm (600  $\mu\text{L}$ ) para se utilizar maiores volumes dos reagentes. Com a mudança da bobina de reação, a vazão foi aumentada para 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  objetivando diminuir o tempo da reação. A concentração da solução de riboflavina foi de 60,0  $\text{mg L}^{-1}$  e novos testes foram realizados com e sem parada da amostra na bobina de reação (BR) por 30 s utilizando as condições especificadas na Tab. 11.

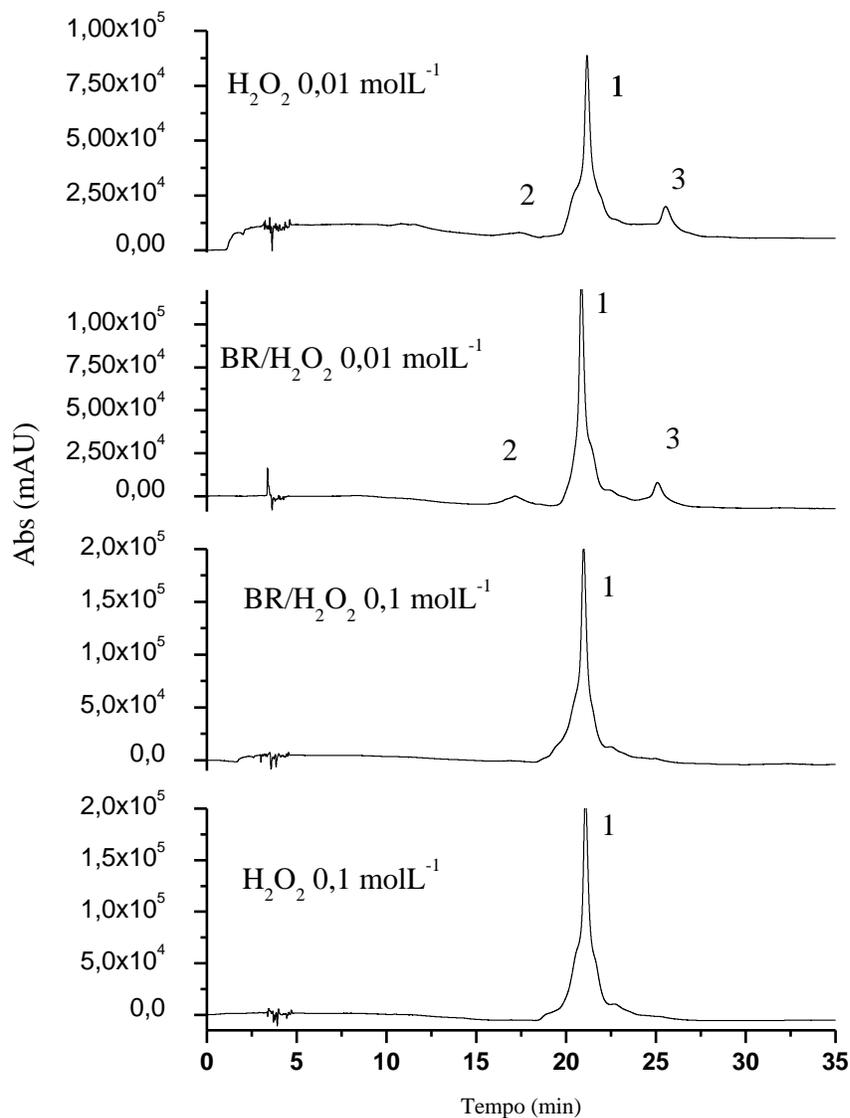
**Tabela 11. Sequência de passos para a reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA com a modificação do tamanho da bobina de reação e com/sem parada da amostra na bobina de reação.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Direção da Vazão	Volume ( $\mu\text{L}$ )
6	Solução Fe (II) 200,0 $\text{mg L}^{-1}$	3	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	Solução $\text{H}_2\text{O}_2$ ( 0,1 e 0,01 $\text{mol L}^{-1}$ )	1	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Amostra – Rib 60,0 $\text{mgL}^{-1}$	4	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	Solução Fe (II) 200,0 $\text{mg L}^{-1}$	3	3	2,0	Aspirar	100
13	Solução $\text{H}_2\text{O}_2$ 0,01 $\text{mol L}^{-1}$	1	3	2,0	Aspirar	100
	Solução $\text{H}_2\text{O}_2$ 0,1 $\text{mol L}^{-1}$	1	3	2,0	Aspirar	100
14	Amostra– Rib 60,0 $\text{mgL}^{-1}$	4	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	23	2,0	Injetar	3000
18	álcool etílico (manual)	--	--	-----	-----	300
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – $\text{H}_2\text{O}$

Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.

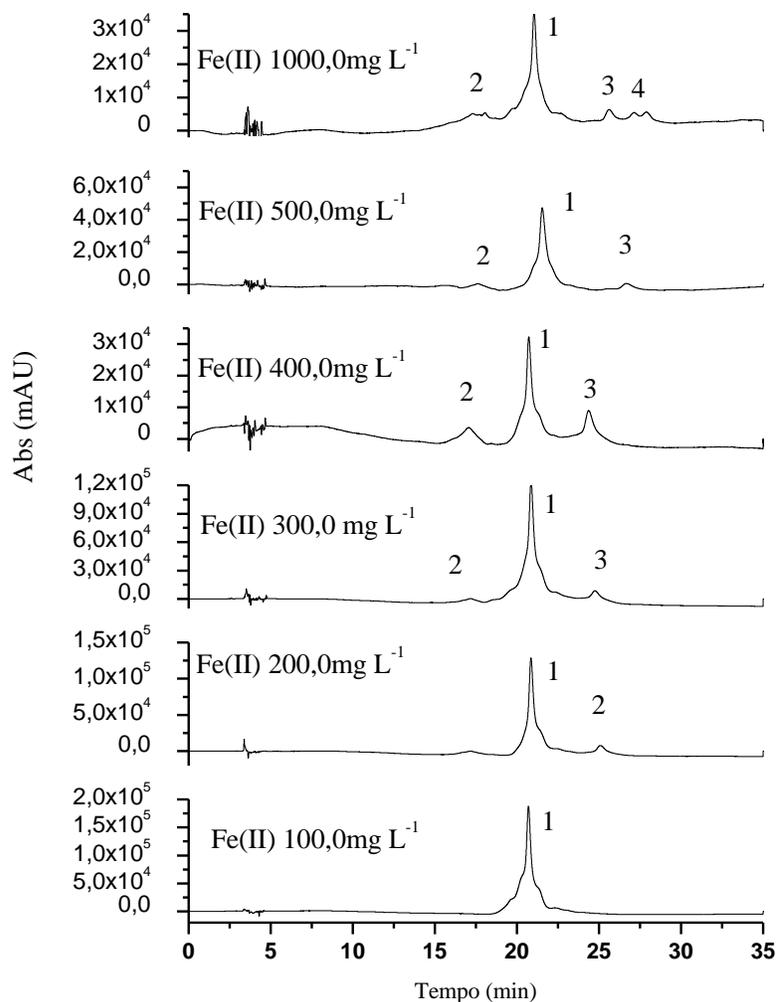
O emprego de uma bobina de reação maior permitiu uma melhor dispersão da amostra com o reagente de Fenton, bem como a parada da amostra na bobina de reação melhorou a intensidade dos sinais analíticos e aumentou o número de produtos formados durante a reação

de oxidação da riboflavina, pois anteriormente, havia apenas um e nesta condição foram detectadas duas espécies, conforme pode ser verificada na Fig. 23.



**Figura 23. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 11 modificação do tamanho da bobina de reação e com/sem parada da amostra na bobina de reação, sendo 1 riboflavina e 2, 3 produtos de oxidação.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min; vazão 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , injeção de 50  $\mu\text{L}$  de amostra, 295 nm.

Em uma nova etapa de investigação foi mantida a concentração da riboflavina  $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , eluente  $300 \mu\text{L}$  e variada a concentração da solução de Fe(II) para  $100,0$ ;  $200,0$ ;  $300,0$ ;  $400,0$ ;  $500,0$  e  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ , utilizando as mesma sequência de eventos para o sistema SIA especificada na Tab. 11, obtendo-se os resultados apresentados na Fig. 24.



**Figura 24. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 11 investigação da concentração de Fe(II)  $100,0$ ;  $200,0$ ;  $300,0$ ;  $400,0$ ;  $500,0$  e  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo 1 riboflavina e 2, 3 e 4 produtos de oxidação.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição  $0,0$  a  $2,5 \text{ min}$  – Fase A/Fase B  $(98/2)\%$ ;  $2,5$  a  $15,0 \text{ min}$  – Fase A/Fase B  $(0/100)\%$ , mantendo constante até  $30,0 \text{ min}$ ; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50 \mu\text{L}$  de amostra,  $295 \text{ nm}$ .

Pôde-se verificar que a concentração de Fe(II) influencia muito no processo de degradação do analito e na obtenção dos produtos de oxidação, pois conforme os resultados apresentados na Fig. 24 com 100,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) a taxa de degradação da riboflavina foi bastante baixa ao ponto de não se observar produtos da degradação. Para as condições de 200,0 e 300,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) houve uma aumento na taxa de degradação, possibilitando a formação de produtos de oxidação; no entanto, os sinais apresentados são de baixa intensidade. Quando se aumentou a concentração de Fe(II) para 400,0 mg L<sup>-1</sup> houve uma intensificação dos sinais de dois produtos de oxidação, sinais que só foram superados quando se utilizou 1000,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) não pela intensidade, mas pelos 3 produtos de oxidação formados.

Neste sentido, para se aumentar a intensidade dos sinais analíticos obtidos o volume do eluente (álcool etílico) foi reduzido, sendo realizados os testes apenas para a riboflavina sem a utilização do reagente de fenton conforme condições da Tab.12.

Para este estudo, nas etapas que eram aspiradas e injetadas as soluções de Fe(II) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as soluções foram substituídas por água ultra-pura, objetivando verificar apenas o perfil apresentado pela riboflavina sob as condições do sistema SIA e a diminuição do volume do eluente.

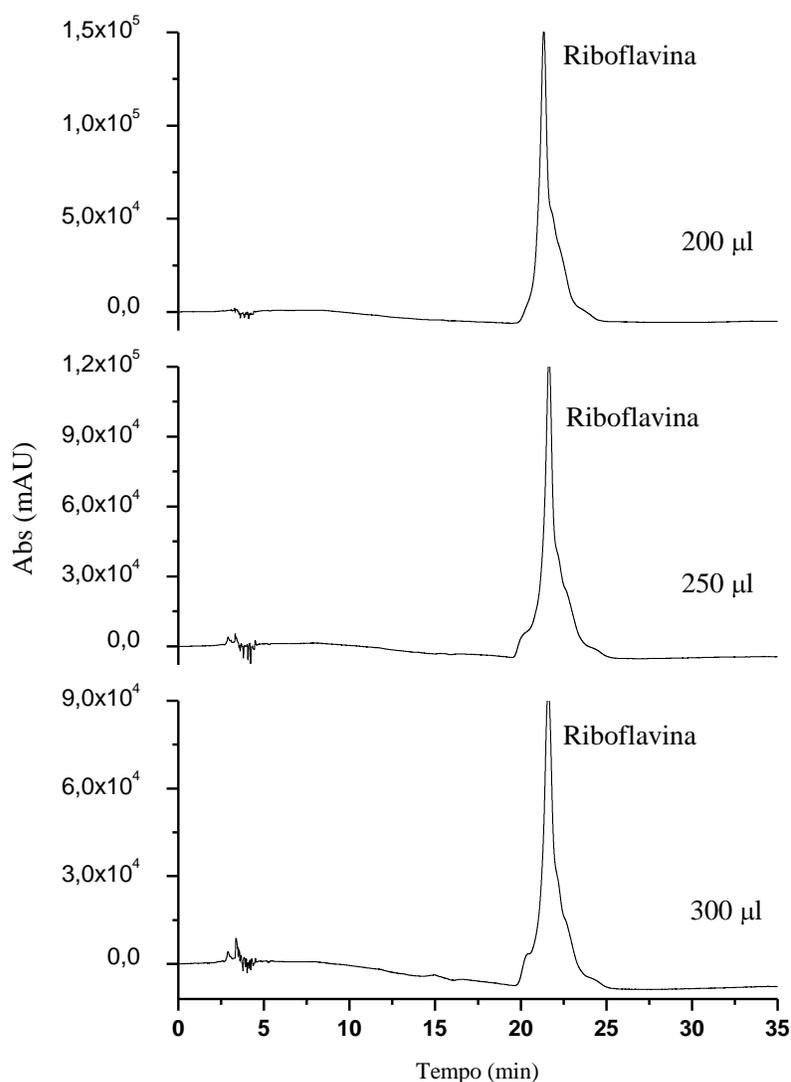
**Tabela 12. Sequência de passos para realizar a degradação da riboflavina pelo sistema SIA, modificação do volume de eluente 300, 250 e 200 µL.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	H <sub>2</sub> O	3	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	H <sub>2</sub> O	1	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Amostra – Rib 60,0mg L <sup>-1</sup>	4	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	H <sub>2</sub> O	3	3	2,0	Aspirar	100
13	H <sub>2</sub> O	1	3	2,0	Aspirar	100
14	Amostra– Rib 60,0mg L <sup>-1</sup>	4	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	álcool etílico (manual)	(1)	----	-----	-----	300
		(2)	----	-----	-----	250
		(3)	----	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

**Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.**

Com a diminuição do volume do eluente pôde-se verificar um pequeno aumento na intensidade do sinal analítico da riboflavina (Fig. 25).

A utilização do volume de 200 µL do eluente poderia melhorar a intensidade do sinal dos produtos de oxidação formados na etapa de degradação. Volumes abaixo de 200 µL foram testados, mas não foram suficientes para retirar o a riboflavina da FE do cartucho de extração, diminuindo a intensidade do pico cromatográfico, pois grande parte da amostra permanecia retida na fase estacionário do cartucho de extração. Assim, para os próximos testes foi fixado o volume do eluente em 200 µL.



**Figura 25. Cromatograma da riboflavina utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 12 com a investigação do volume do eluente (álcool etílico) 300, 250 e 200 µL.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra, 295 nm.

Outra variável investigada foi à utilização de luz UV na reação de degradação, processo conhecido como Foto-Fenton, as condições utilizadas seguiram a sequência de etapas listadas na Tab. 13 e com a inserção da luz no sistema SIA. Assim, foram realizados

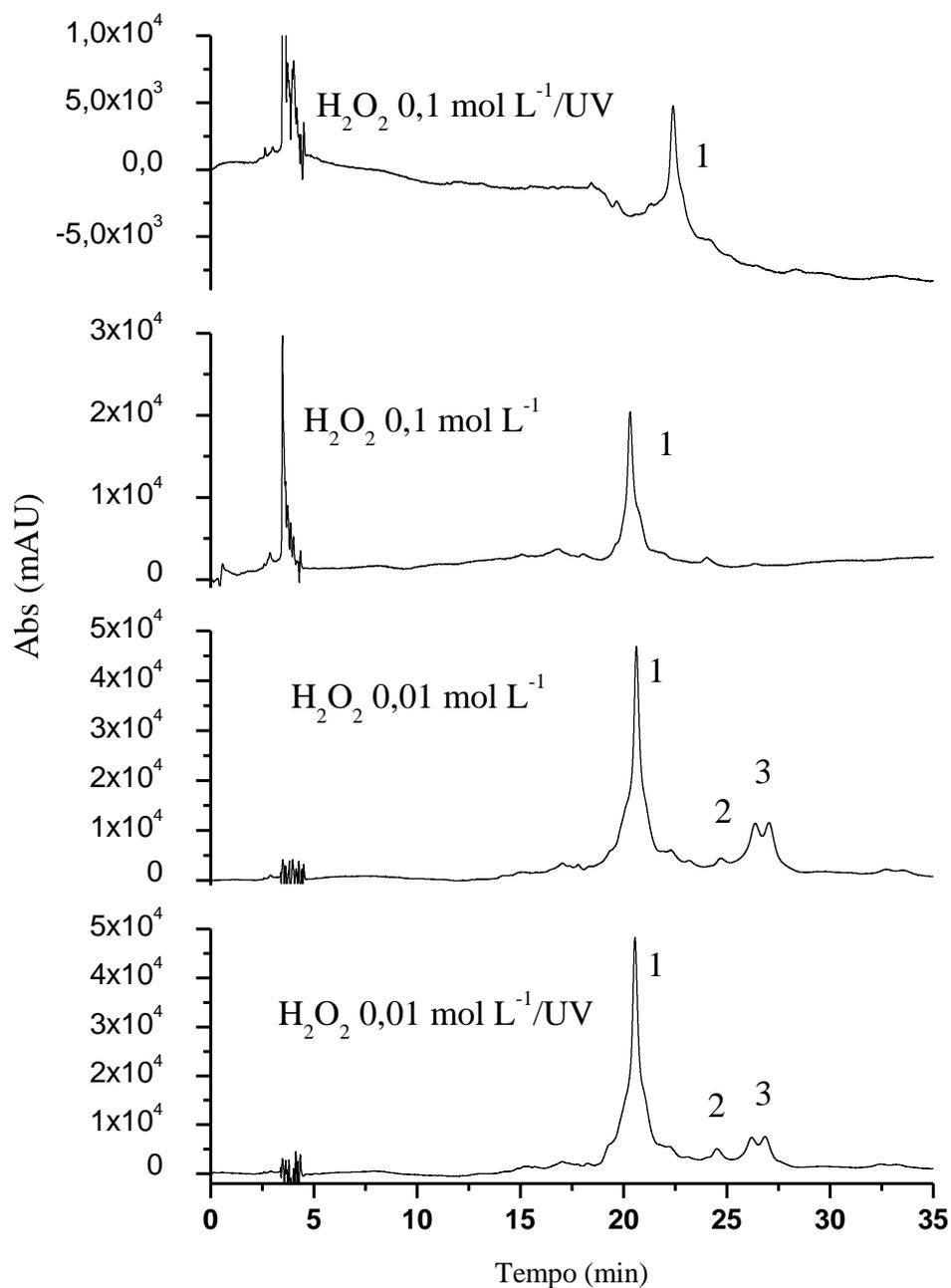
estudos para degradação da riboflavina na concentração de  $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{Fe(II)} 1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2 0,1$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{L}$  de álcool etílico e a utilização da luz UV no processo reacional.

**Tabela 13. Sequência de passos para a reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA com a inserção de luz (UV) na bobina de reação.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Direção da Vazão	Volume ( $\mu\text{L}$ )
6	$\text{H}_2\text{O}_2 0,1$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	1	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	Riboflavina $60,0 \text{ mg L}^{-1}$	4	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	$\text{Fe(II)} 1000,0 \text{ mg L}^{-1}$	3	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	$\text{H}_2\text{O}_2 0,1$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	1	3	2,0	Aspirar	100
13	Riboflavina $60,0 \text{ mg L}^{-1}$	4	3	2,0	Aspirar	100
14	$\text{Fe(II)} 1000,0 \text{ mg L}^{-1}$	3	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	álcool etílico (manual)	----	----	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – $\text{H}_2\text{O}$

Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.

A fonte de luz utilizada foi uma lâmpada de vapor de mercúrio de 80 W de potência sem bulbo protetor, a qual foi inserida dentro de uma caixa sem ventiladores. Dentro desta caixa foi inserida a bobina de reação em uma posição muito próxima a fonte de luz, sendo que a lâmpada foi ligada antes da reação iniciar para a estabilização da intensidade da energia emitida. Nesta condição foram obtidos os resultados apresentados na Fig. 26.

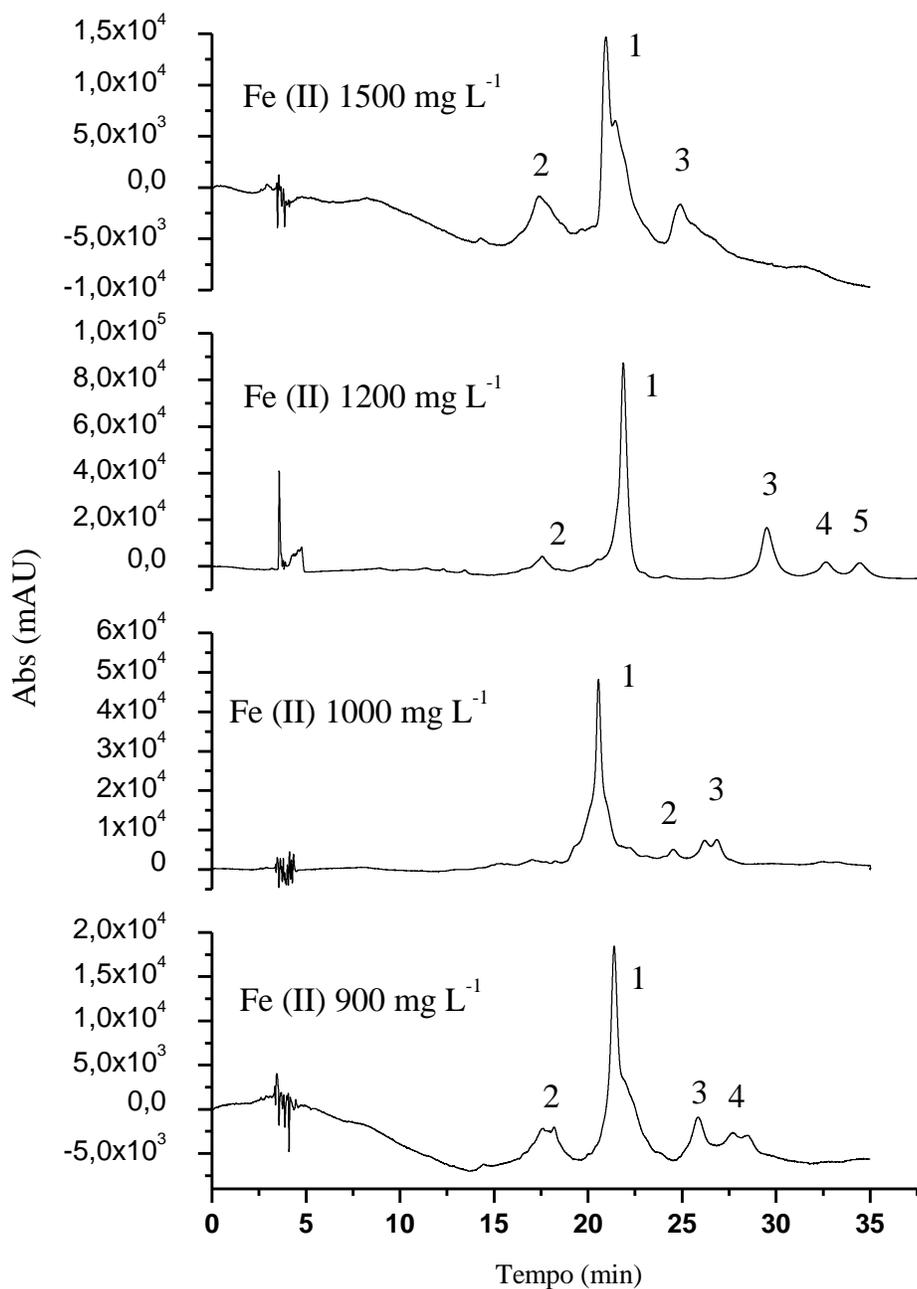


**Figura 26. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 13 investigação da utilização de luz UV. sendo 1 riboflavina e 2, 3 produtos de oxidação** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50  $\mu\text{L}$  de amostra, 295 nm.

Com esta investigação (Fig. 26), pôde-se verificar que a taxa de degradação aumenta com a incidência de luz UV na amostra, sendo o efeito mais pronunciado quando da utilização da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  associado à luz UV. A utilização desses dois parâmetros acelera a taxa de clivagem da riboflavina e dos produtos da oxidação formados.

Para os ensaios que utilizaram a solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  associado ou não a luz UV o perfil cromatográfico foi muito semelhante. A intensidade do sinal analítico da riboflavina foi praticamente da mesma intensidade e pôde-se observar sinais dos produtos da oxidação, porém no processo que se utilizou luz foi mais eficiente, mas com a desvantagem de se utilizar mais um artefato no sistema SIA, o que diminui a reprodutibilidade.

Diante dos resultados obtidos e na tentativa de melhorar a intensidade dos sinais analíticos e o número de produtos da oxidação formados, verificou-se a possibilidade de uma nova variação da concentração de Fe (II). Assim, novos estudos utilizando-se solução de riboflavina  $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{L}$  de eluente e solução de Fe(II) nas concentrações de  $900,0$ ;  $1000,0$ ;  $1200,0$  e  $1500,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram realizados. A sequência das etapas utilizadas no sistema SIA é a mesma apresentada na Tab.13, com a mudança apenas na concentração da solução de Fe(II), sendo que os resultados obtidos para estas condições estão apresentados na Fig. 27.



**Figura 27.** Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 13 otimização da concentração da solução de Fe(II) 900,0 1000,0 1200,0 e 1500,0 mg L<sup>-1</sup>, sendo 1 riboflavina e 2, 3, 4 e 5 produtos de oxidação. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra, 295 nm.

Com as modificações na concentração da solução de Fe(II) pôde-se verificar que para a concentração de 900,0 mg L<sup>-1</sup> houve a formação de 3 possíveis produtos de oxidação, no entanto, os sinais analíticos obtidos não foram tão bem definidos e nem apresentaram separação cromatográfica adequada.

Para a concentração de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> da solução Fe(II) o perfil do cromatográfico dos produtos da degradação da vitamina foi muito parecido com a condição que utilizou 900,0 mg L<sup>-1</sup> Fe(II), com a diferença de ter uma taxa de clivagem menor, o que levou a diminuição da intensidade dos sinais analíticos dos produtos formados.

Quando se utilizou 1200,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) obteve-se a condição mais satisfatória para promover a clivagem da riboflavina e a formação dos produtos de oxidação. Nesta situação, houve pelo menos a formação de 4 produtos de oxidação detectáveis e com um perfil de separação cromatográfica adequado. Para a concentração de 1500,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) a taxa de degradação foi mais intensa, o que prejudicou o sinal de 2 produtos de oxidação.

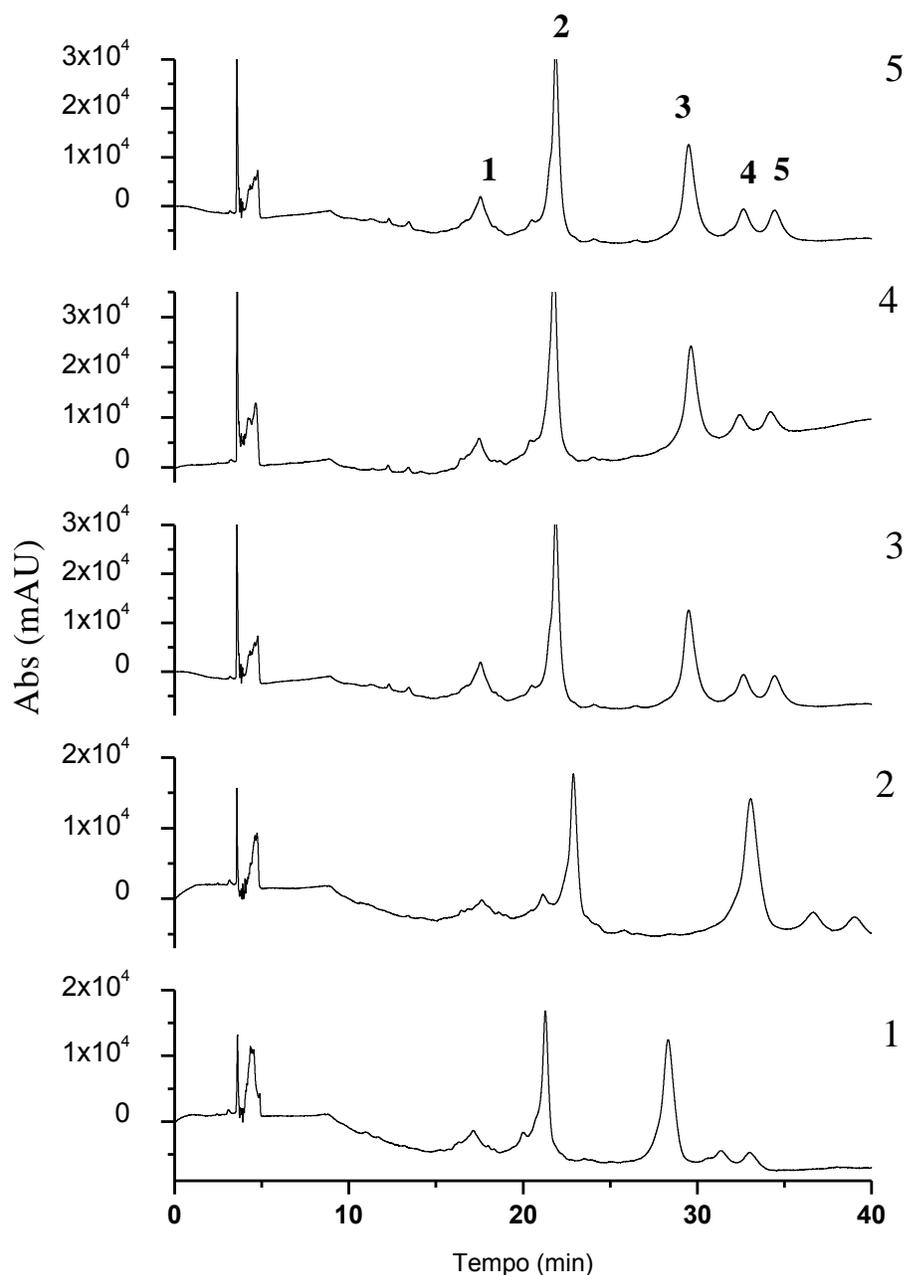
Diante destes resultados, pôde-se verificar que o reagente de fenton apresenta-se de forma muito efetiva nas reações de degradação e dependendo da concentração dos reagentes utilizada pode ocorrer a oxidação total do analito ou degradá-lo de forma parcial. A condição que possibilitou a formação de produtos de oxidação foi obtida com a sequência de passos utilizadas pelo sistema SIA com as condições especificadas na Tab.14 e utilizando as soluções nas concentrações de 60,0 mg L<sup>-1</sup> da Riboflavina, Fe(II) 1200,0 mg L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>, 200 µL do eluente (álcool etílico) e sem a utilização da irradiação UV.

**Tabela 14. Sequência de passos otimizados para reação de degradação da riboflavina com o reagente de Fenton pelo sistema SIA.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	Riboflavina 60,0 mgL <sup>-1</sup>	4	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Fe(II) 1200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	3	2,0	Aspirar	100
13	Riboflavina 60,0 mgL <sup>-1</sup>	4	3	2,0	Aspirar	100
14	Fe(II) 1200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	álcool etílico (manual)	----	----	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.

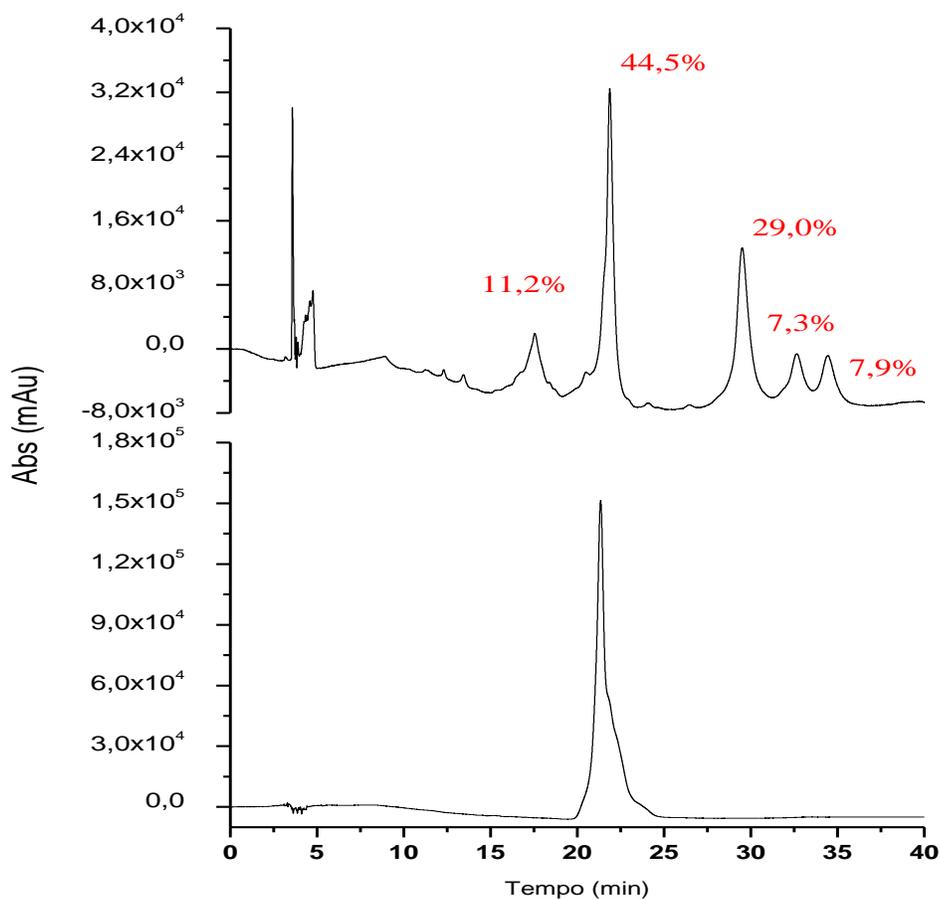
Sob estas condições, verificou-se a reprodutibilidade dos resultados com a injeção de 3 amostras nas condições especificadas como ótimas e utilizando a FE do sistema de extração C18 (octadecilsilano). Na Etapa 1 da reação de Fenton, sem a utilização do sistema SIA foi investigado a melhor FE para ser utilizada no processo de extração, sendo que a C18 demonstrou ser a mais adequada. No entanto, após a otimização de todos os parâmetros para reação de fenton verificou-se que resultados semelhantes poderiam ser obtidos utilizando FE C8 (octil). Analisando a Fig. 28 pode-se constatar que a utilização da FE C8 (teste 1 e 2) apresentou resultados muito similares aos da FE C18 (teste 3, 4 e 5 ).



**Figura 28. Cromatograma da riboflavina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 14 verificação da reprodutibilidade dos resultados e possibilidade de utilização da FE C18 e C8. Sendo 1,2 FE C8 e 3,4 e 5 FE C18. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50 \mu\text{L}$  de amostra, 295 nm.**

Diante desses resultados, foi verificado que o processo de oxidação deve ser brando para possibilitar a formação dos compostos que darão a identidade digital oxidativa da riboflavina, pois quando foram utilizadas condições mais severas de oxidação, aumentando-se a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , verificou-se uma maior taxa de degradação do analito inicial, bem como dos produtos formados, não sendo possível a obtenção de um segundo cromatograma com a identidade digital oxidativa da riboflavina, pois boa parte dos compostos sofreu oxidação total, tendo como produtos finais  $\text{CO}_2$  (gás carbônico) e  $\text{H}_2\text{O}$  (água) que, não podem ser monitorados pela técnica analítica empregada.

Com a otimização da reação de degradação da riboflavina e com a curva de calibração da Fig. 22 pôde-se verificar que a concentração inicial da riboflavina, sem ser submetida à reação de Fenton, utilizando o sistema SIA era de  $28,4 \text{ mg L}^{-1}$ . Após a riboflavina ser submetida à reação de fenton a concentração foi de  $13,3 \text{ mg L}^{-1}$  conforme os dados apresentados na Fig. 29 na qual relaciona-se a porcentagem da riboflavina e dos produtos de oxidação após a reação de Fenton.



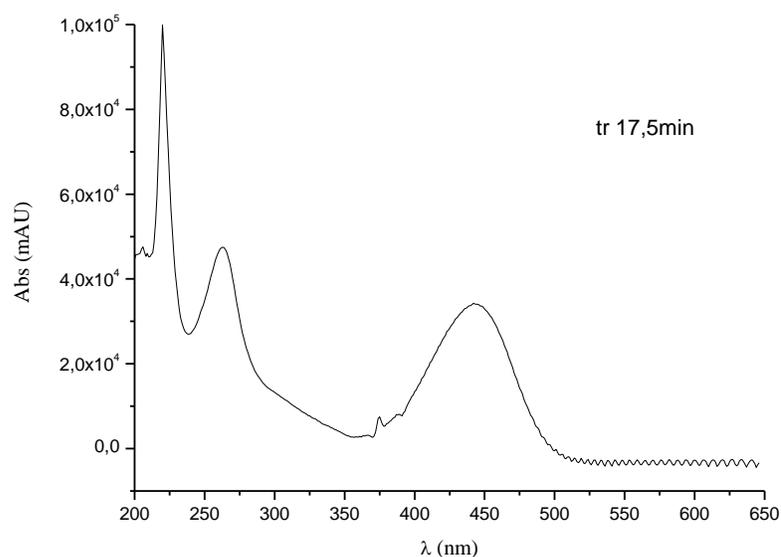
**Figura 29. Cromatograma da riboflavina e identidade digital oxidativa da riboflavina obtida após oxidação parcial utilizando-se da reação de Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) em sistema SIA com as porcentagens de cada produto de oxidação.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50 \mu\text{L}$  de amostra, 295 nm.

Desta forma, pode se verificar que nas condições otimizadas para a reação de Fenton, o processo é eficiente e provoca a clivagem da riboflavina com a formação dos produtos de oxidação que dão a identidade oxidativa da riboflavina.

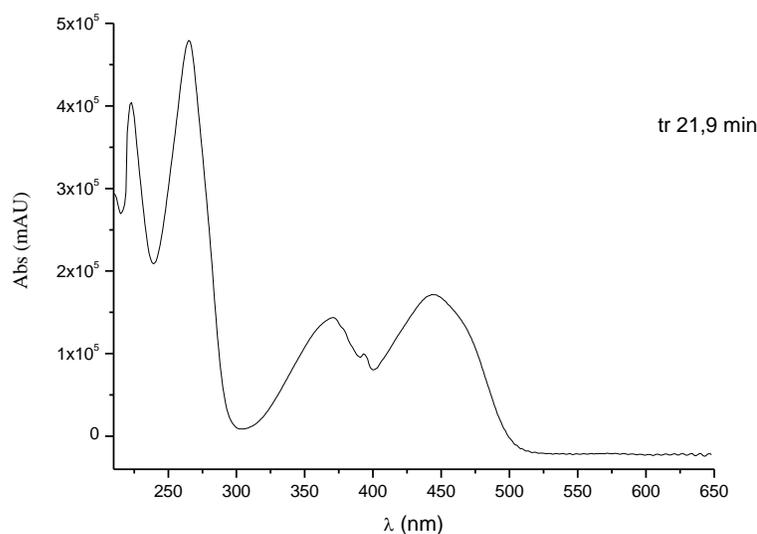
Com a obtenção dos produtos da oxidação realizou-se investigação para caracterização dos mesmos. A primeira etapa foi analisar os espectros de cada um dos picos cromatográficos obtidos (Fig. 28, cromatograma 5).

O primeiro pico (Fig. 28) com tempo de retenção de 3,8 min trata-se, provavelmente, do álcool etílico utilizado como eluente no processo de extração em fase sólida, pois a FM utilizada na separação da riboflavina é composta inicialmente por uma Fase A que contém apenas 1% de álcool etílico em fase aquosa.

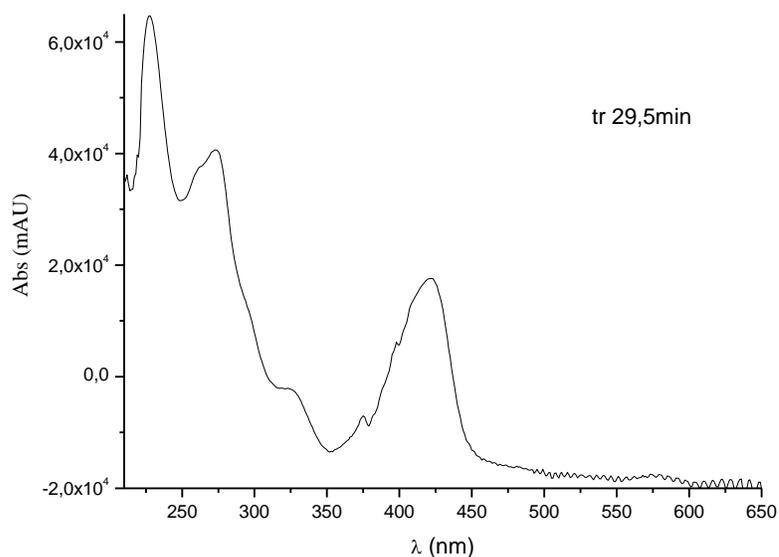
Os picos 1, 3, 4 e 5 (Fig. 28) correspondem aos produtos da oxidação da riboflavina formados no processo de degradação utilizando a reação de fenton. O pico 2 refere-se a riboflavina que restou no meio reacional, pois a reação foi conduzida de forma a provocar a oxidação parcial da riboflavina e para se ter após a reação de oxidação, parte do analito e produtos da oxidação da riboflavina que possuíssem grupos cromóforos, de maneira que pudéssemos obter um cromatograma e dar a impressão digital oxidativa do composto inicial, deste modo ajudando na identificação do analito. Os espectros obtidos UV-Vis para cada um dos produtos de oxidação obtidos são apresentados nas Fig. 30 a 34.



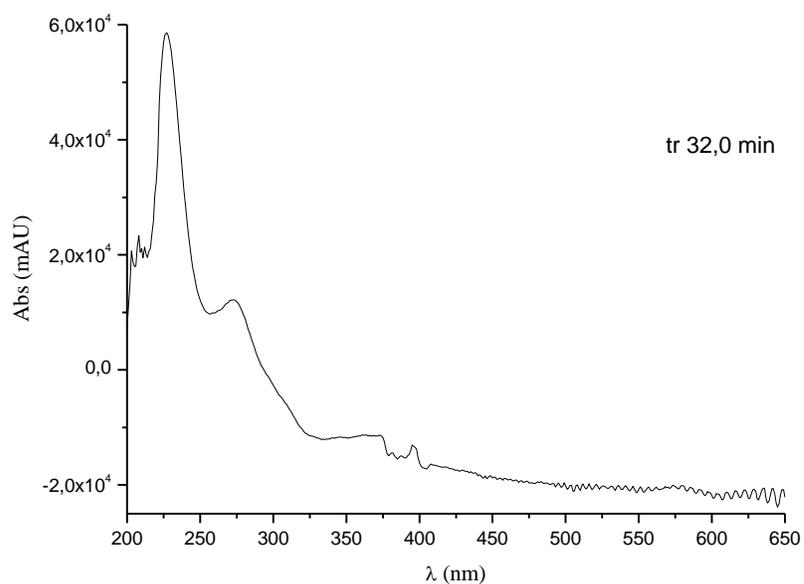
**Figura 30. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 1 da riboflavina com tempo de retenção de 17,5 min.** Condições da reação de Fenton: riboflavina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ ,  $\text{Fe(II)}$  ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 14 (pg. 87).



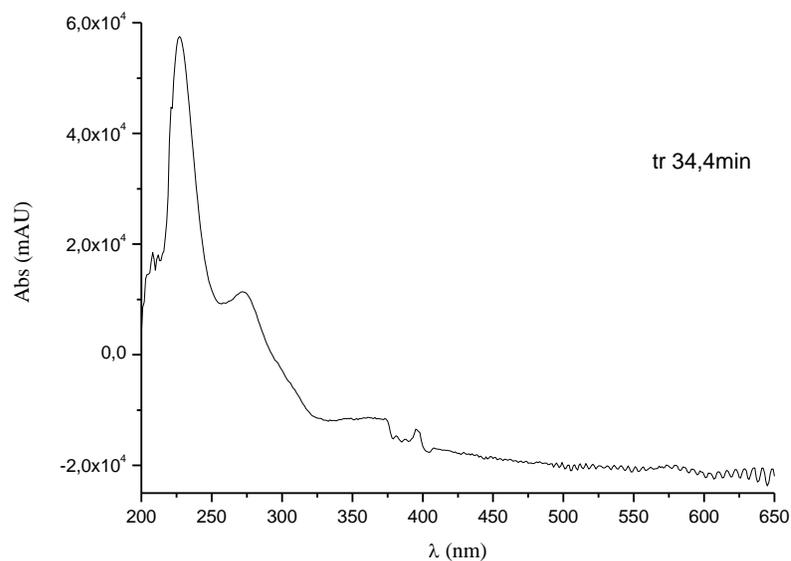
**Figura 31. Espectro UV/Vis do pico 2 (parcela da riboflavina que não sofreu oxidação) com tempo de retenção de 21,9 min.** Condições da reação de Fenton: riboflavina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ , Fe(II) ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 14 (pg. 87).



**Figura 32. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 3 da riboflavina com tempo de retenção de 29,5 min.** Condições da reação de Fenton: riboflavina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ , Fe(II) ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 14 (pg. 87).



**Figura 33. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 4 da riboflavina com tempo de retenção de 32,0 min.** Condições da reação de Fenton: riboflavina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \text{ }\mu\text{L}$ , Fe(II) ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \text{ }\mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \text{ }\mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 14 (pg. 87).



**Figura 34. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 5 da riboflavina com tempo de retenção de 34,4 min.** Condições da reação de Fenton: riboflavina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \text{ }\mu\text{L}$ , Fe(II) ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \text{ }\mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \text{ }\mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 14 (pg. 87).

Analisando os espectros obtidos para cada um dos picos verificou-se que todos apresentaram sinais característicos na região de 200 a 300 nm, sendo que os espectros dos produtos formados estão fortemente relacionados com o espectro da riboflavina. Estes sinais obtidos para esta região do espectro pode ser devido ao anel da isoaloxazina que foi mantido para cada um dos produtos após a oxidação da riboflavina. Os produtos 1 e 3 apresentaram espectros bem diferentes, enquanto que os produtos 4 e 5 apresentaram espectros praticamente iguais, indicando que estes compostos possuem estruturas muito similares, mas ainda com diferença na estrutura molecular suficiente para permitir que eles fossem separados cromatograficamente.

A utilização do detector espectrofotométrico com arranjo por foto-diodo permitiu a obtenção do espectro para cada composto formado, no entanto, este tipo de detector não permite obter informação conclusiva sobre a possível estrutura do produto da oxidação. Desta forma, a investigação da provável estrutura dos produtos formados foi realizada primeiramente através de análise por espectrometria de massas, por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e pela ressonância magnética nuclear. Para a realização dessas análises, a amostra da riboflavina sob a condição ótima de degradação, foi submetida à separação cromatográfica por CL, sendo que cada um dos produtos separados foram coletado (frações 1 a 5) e liofilizadas para eliminar a fase móvel.

No processo da liofilização ocorre a remoção da água de uma amostra congelada, pela aplicação de vácuo. Como a água foi removida em temperaturas baixas, considera-se que os compostos presentes na amostra não sofreram alterações durante o processo de liofilização, sendo que ao final da liofilização foram obtidos pós secos bastante estáveis, que puderam ser armazenados para análises posteriores. Após o processo de liofilização das amostras estas foram

armazenadas em dessecador e antes de serem submetidas à análise foram dissolvidas com solvente adequado.

Para a análise por EM as amostras foram dissolvidas em álcool metílico, sendo que cerca de 10 frações de cada um dos compostos foram juntadas para a análise. As análises por não permitiram a elucidação das estruturas dos produtos formados. Na análise direta por EM não ocorre à separação dos compostos que poderiam estar presentes nas amostras, os picos obtidos nas análises eram largos, além do que a alta taxa de aquecimento não permitiu obter informações sobre a provável estrutura do composto formado em cada etapa. Além disso, como a riboflavina não apresenta estabilidade térmica os resultados obtidos não foram conclusivos utilizando esta técnica de análise.

Após, o solvente das frações foram evaporados (álcool metílico) e as frações foram redissolvidas em DMSO deuterado para a realização das análises por RMN. Primeiramente foi obtido o espectro de RMN para a riboflavina e depois para cada um dos produtos formados como pode ser verificado nas Fig. 35 e 36. O espectro de RMN da riboflavina possibilitou a confirmação dos grupos pertencentes à estrutura do analito. No entanto, para todos os produtos formados os espectros de RMN se apresentaram todos com o mesmo perfil (Fig.35). Provavelmente, isto ocorreu devido à pequena quantidade de massa presente em cada amostra, o que impossibilitou a elucidação das prováveis estruturas dos produtos de oxidação formados.

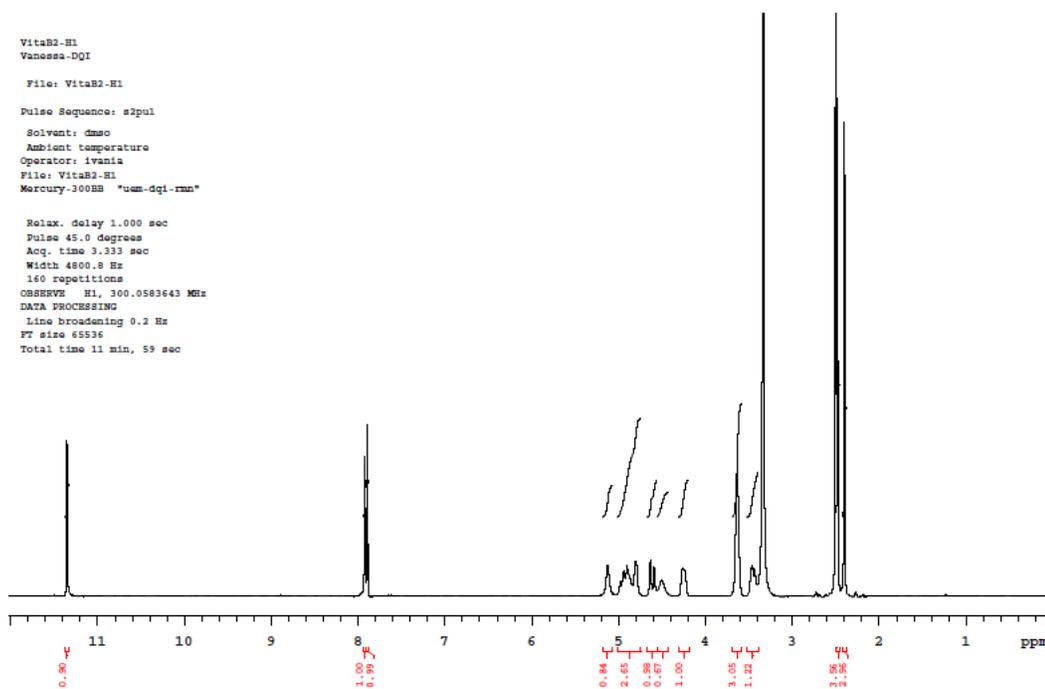


Figura 35. Espectro de RMN de H1 para a riboflavina em DMSO.

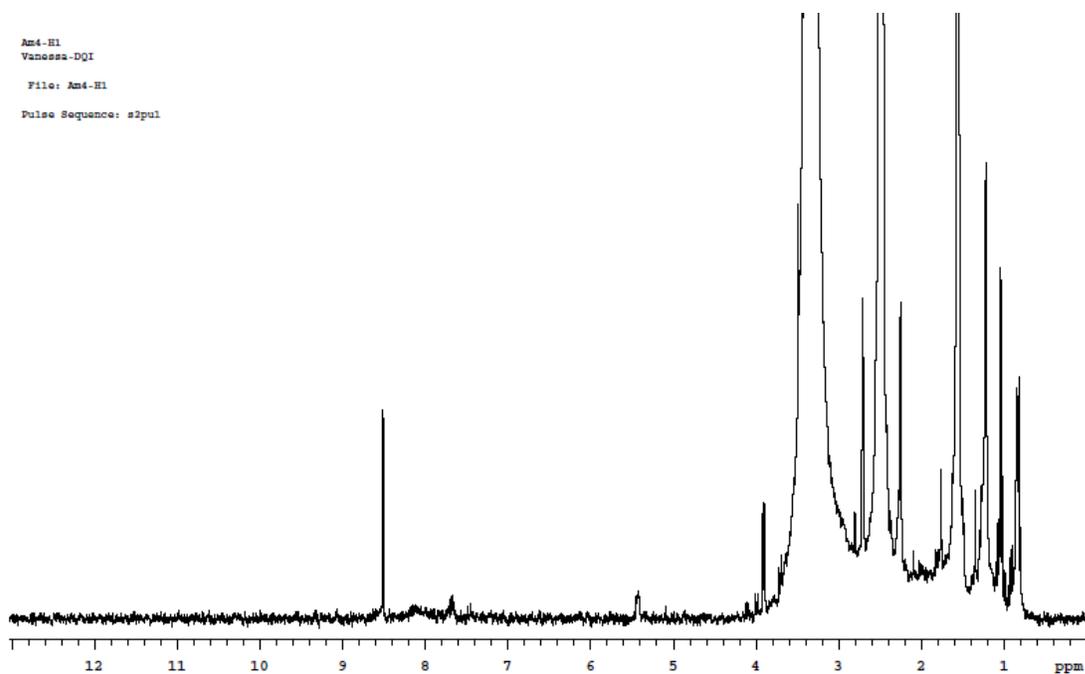
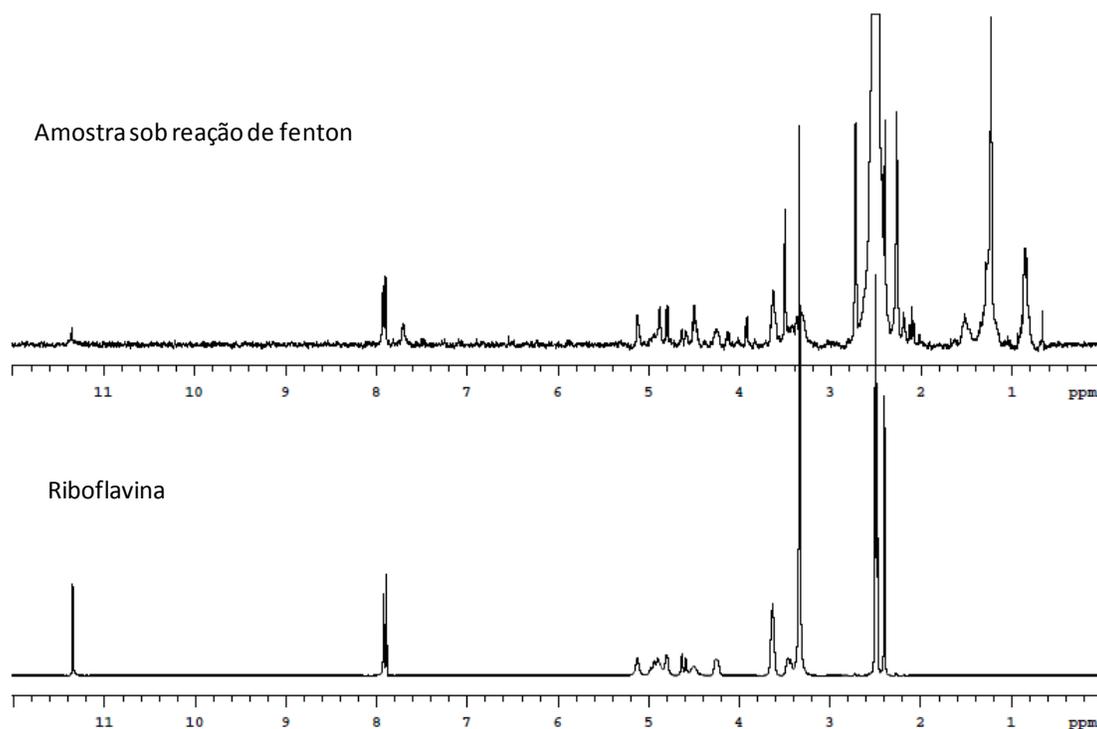


Figura 36. Espectro de RMN de H1 para o intermediário 4 em DMSO.

O espectro de RMN da riboflavina possibilitou a confirmação dos grupos pertencentes à estrutura do analito. No entanto, para todos os produtos formados os espectros de RMN se apresentaram todos com o mesmo perfil (Fig.35). Provavelmente, isto ocorreu devido à pequena quantidade de massa presente em cada amostra, o que impossibilitou a elucidação das prováveis estruturas dos produtos de oxidação formados.

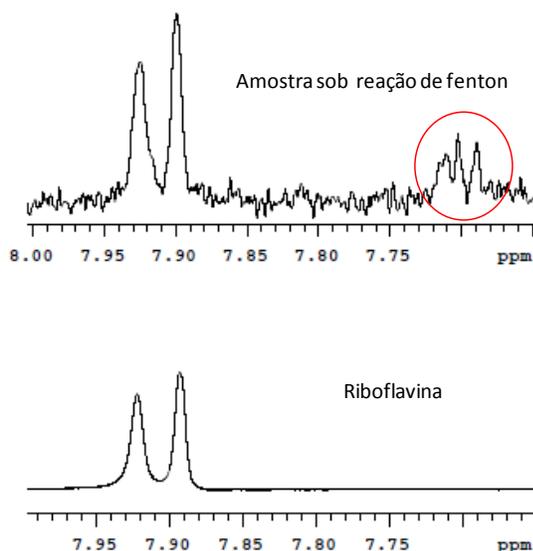
Na tentativa de se verificar os grupamentos presentes nas estruturas dos produtos da oxidação foram preparadas cerca de 20 amostras utilizando a condição otimizada para a reação de degradação da riboflavina sem a separação cromatográfica, sendo o eluente evaporado e a amostra redissolvida em DMSO deuterado para a análise por RMN.

Analisando o espectro de RMN obtido para a riboflavina e amostra submetida à reação de Fenton (Fig. 37).



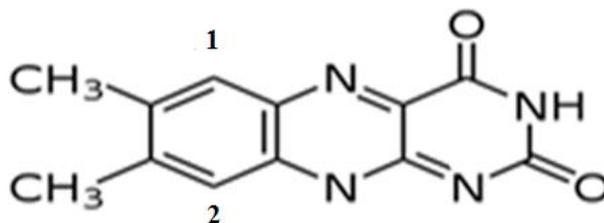
**Figura 37. Espectro de RMN de H<sup>1</sup> para a riboflavina e a amostra degradada em DMSO.**

Analisando a Figura 37 verifica-se uma menor intensidade dos sinais, mas observa-se um sinal a mais no deslocamento químico na região de 8 ppm o que pode ser melhor verificado na Fig. 38.



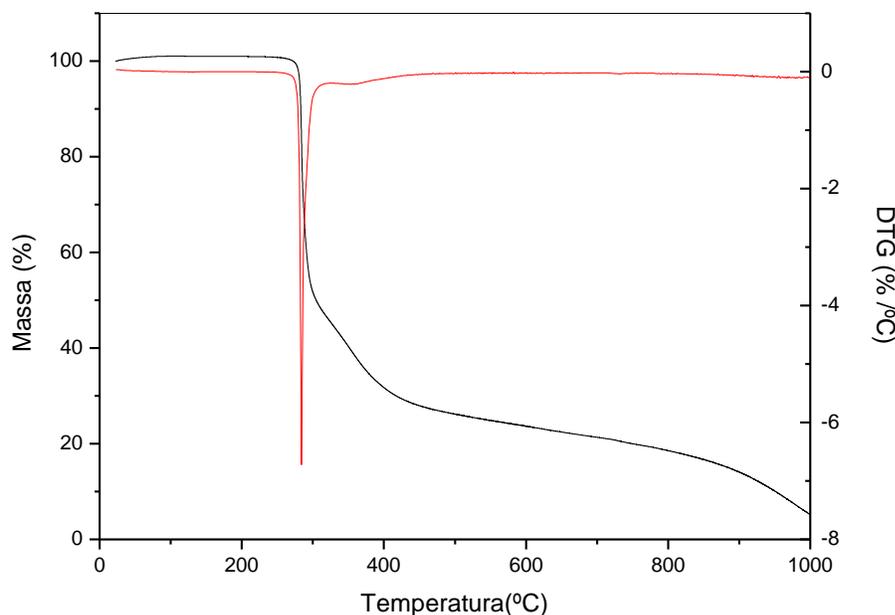
**Figura 38.** Ampliação do Espectro de RMN de  $H^1$  para a riboflavina e amostra sob a reação de fenton em DMSO na região de deslocamento químico de 8 ppm.

Este sinal apresentado no RMN (Fig. 38) é indicativo de possuir 2 produtos de degradação, referentes aos H(1,2), com manutenção do anel da isoaloxazina (Fig. 39).



**Figura 39.** Estrutura da Isoaloxazina.

Devido a estas dificuldades para elucidação dos produtos de oxidação optou-se por utilizar análise termogravimétrica para ajudar a caracterizar os compostos formados. Com a obtenção da curva termogravimétrica (Fig. 40) nas condições especificadas no *Capítulo 4 – Materiais e Métodos* (pg.59).

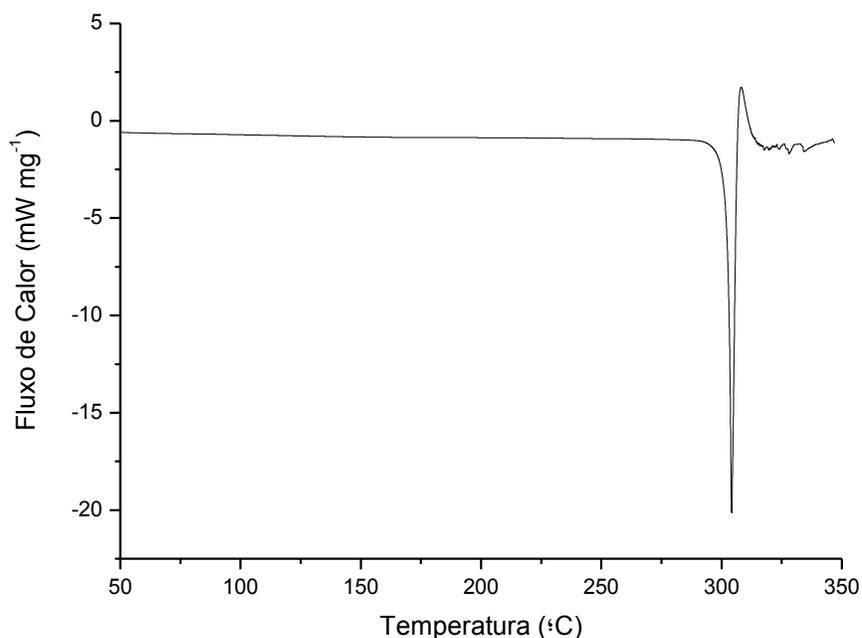


**Figura 40. Curva termogravimétrica (TG e DTG) para a riboflavina.** Condições: taxa de aquecimento  $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até a temperatura de  $1000^{\circ}\text{C}$  com uma vazão de  $100\text{ mL min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ .

Pôde-se verificar que a riboflavina se mantém praticamente estável até a temperatura de  $270^{\circ}\text{C}$  sem apresentar perda de massa. Após, ocorre degradação da sua estrutura de forma bastante intensa até a temperatura de  $400^{\circ}\text{C}$ , o que também pode ser verificado pela derivada DTG (em vermelho) que apresenta um pico bastante intenso nesta região, demonstrando que nesta faixa de temperatura a riboflavina sofre uma taxa de degradação bastante efetiva.

Pela análise por DSC (Fig. 41), pôde-se confirmar que a amostra de riboflavina não apresentava a presença de umidade na sua estrutura, pois na região de  $100^{\circ}\text{C}$ , onde normalmente ocorre à presença de picos devido à perda de umidade, se manteve bastante

estável apresentado apenas o primeiro evento endotérmico entre 280 e 310° C e um pequeno evento exotérmico em 325° C, demonstrando uma grande taxa de decomposição nesta faixa de temperatura que está de acordo com as análises de TG e DTG.

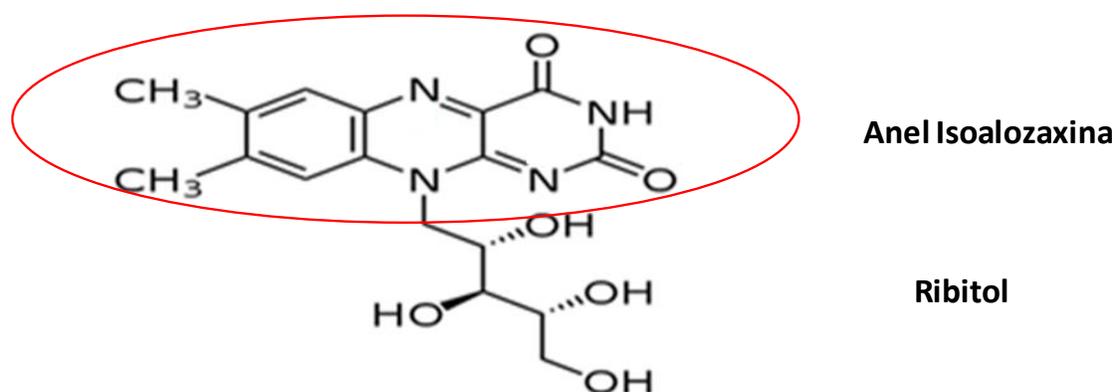


**Figura 41. Curva termogravimétrica (TG e DTG) para a riboflavina.** Condições: taxa de aquecimento  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até a temperatura de  $350^{\circ}\text{C}$  com uma vazão de  $50\text{ mL min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ .

Diante dos dados obtidos pela análise termogravimétrica pôde-se relacionar a variação de massa com a massa molar da riboflavina, pois como a amostra não apresentava umidade em sua composição como verificado pela curva DSC, foi possível relacionar a massa inicial utilizada na análise termogravimétrica ( $4,43376\text{ g}$ ) com a massa molar de  $376,4\text{ g mol}^{-1}$  da riboflavina, verificando-se que em cada um dos estágios de perda de massa faz menção a uma massa molar.

Desta forma, relacionando-se os parâmetros da separação cromatográfica juntamente com os espectros UV/Vis obtidos e informações da literatura relacionadas com a estrutura da

riboflavina e seus produtos de degradação,<sup>[68,69]</sup> as análises por RMN e a análise termogravimétrica pôde-se verificar que o primeiro grupamento a ser fragmentado na estrutura da riboflavina seria o ribitol (Fig. 42), permanecendo a estrutura do anel da isoalozaxina, pois tanto o perfil espectral do produto 1 quanto do produto 3 apresentam características muito similares ao espectro da riboflavina, forte indicativo que mantiveram o anel isoalozaxina em sua estrutura molecular..



**Figura 42. Estrutura da Riboflavina com designação do anel isoalozaxina e ribitol.**

Podendo ser verificado que como o ribitol possui uma estrutura molecular com características muito polar, este composto não apresentou retenção na FE do cartucho de extração, sendo eluido com a água de lavagem. Assim, este composto não foi analisado pelo método cromatográfico.

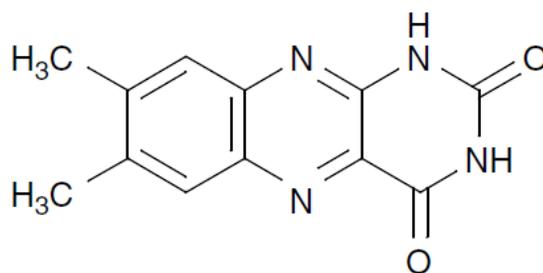
Através da curva termogravimétrica pôde-se observar que até temperatura de 270,0° C a riboflavina não apresenta nenhuma perda de massa e que a partir desta temperatura até 305,0° C ocorre intensa clivagem na estrutura provocando a formação de outros compostos que podem ser determinados a partir da massa molar obtido nos cálculos apresentados na Tab.15.

**Tabela 15. Relação entre temperatura, massa e a massa molar da riboflavina a partir da análise termogravimétrica.**

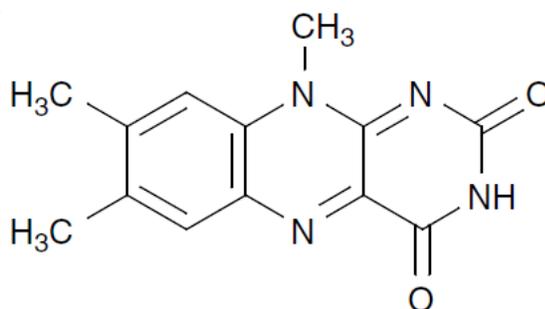
Temperatura (°C)	Massa (g)	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Produto
25,0	4,4337	376,40	Riboflavina
271,9	4,4337	376,40	Riboflavina
287,5	3,0185	256,26	3
289,4	2,8530	242,23	1
292,0	2,5704	218,22	4
303,0	2,2406	190,21	5

Em temperaturas acima de 305,0°C ocorre maior taxa de clivagem da estrutura até chegar a 1000,0° C, onde restaram apenas 0,2317 g da massa inicial (5,23%) que corresponde, provavelmente, a massa de algum óxido formado.

Como a análise por RMN da mistura da amostra degradada pela reação de Fenton houve a presença de um sinal a mais do que o obtido para a riboflavina conclui-se que houve a formação de 2 produtos de degradação, referentes aos H(1,2) presente no anel aromático com as possíveis estruturas (Figs. 43 e 44).

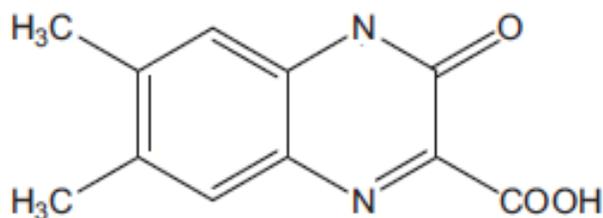


**Figura 43. Estrutura do produto de oxidação 1 (242,23 g mol<sup>-1</sup>) da riboflavina.**

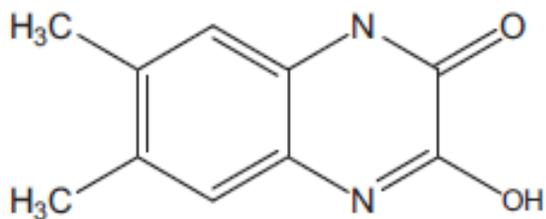


**Figura 44. Estrutura do produto de oxidação 3 (256,26 g mol<sup>-1</sup>) da riboflavina.**

Os produtos 4 e 5 não puderam ser identificados pela análise por RMN, pois a quantidade de massa destes compostos na amostra provavelmente estava abaixo do limite de detecção da técnica. Na análise cromatográfica verificaram-se picos de baixa intensidade o que não definiu o perfil espectral de forma adequada, no entanto pôde-se constatar que para esses compostos ocorreu a clivagem do anel da isoaloxazina, cujos produtos juntamente com o radical hidroxil presente no meio reacional poderia formar as estruturas dos compostos 4 e 5 abaixo relacionados; fato também observado na análise termogravimétrica, conforme os valores obtidos na Tab.15 e dados das Fig. 45 e 46.



**Figura 45. Estrutura do produto de oxidação 4 (218,22 g mol<sup>-1</sup>) da riboflavina.**



**Figura 46. Estrutura do produto de oxidação 5 ( $190,21 \text{ g mol}^{-1}$ ) da riboflavina.**

Com a obtenção destes resultados, verificou-se a possibilidade de obtenção de produtos de oxidação da riboflavina após a reação de Fenton que ajudam na identificação do composto inicial, pois dão a identidade digital oxidativa da molécula.

## 5.2. Ensaio com Cianocobalamina

A vitamina B<sub>12</sub> chamada, também de cianocobalamina, C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P, apresenta átomo de cobalto central coordenado a seis pares eletrônicos do anel da corina que é substituído com numerosos substituintes metilas, acetamida e proprionamida. A coordenação ocorre através dos quatro nitrogênios pirrólicos na posição equatorial e duas ligações coordenadas na posição axial através dos grupos dimetilbenzimidazol (DMB) e cianeto (CN), conforme a estrutura apresentada na Fig. 47<sup>[67]</sup>.

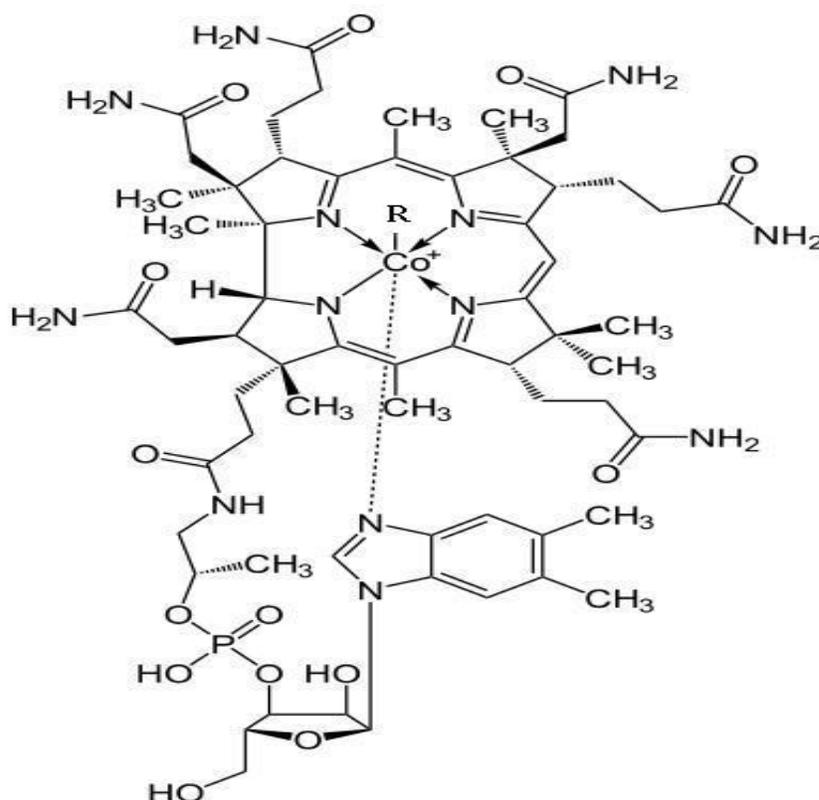
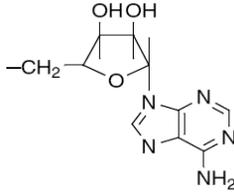


Figura 47. Estrutura da Cobalamina<sup>[67]</sup>.

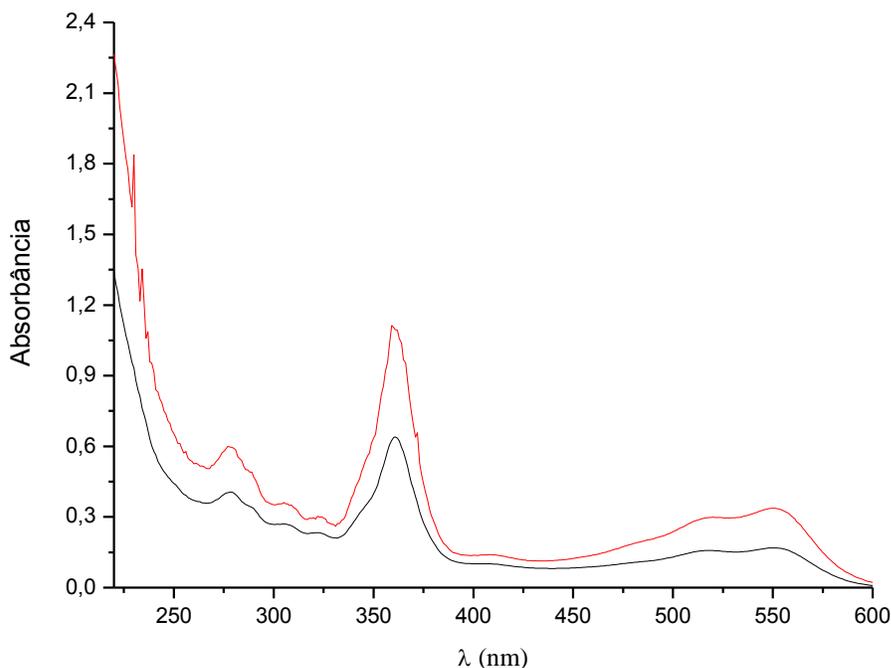
Dependendo do grupamento R substituído na estrutura da cobalamina Fig. 47 e Tab.16 diferentes formas da vitamina B12 podem ser obtidas.

**Tabela 16. Estrutura e nome da cobalamina de acordo com a substituição do grupo R <sup>[67]</sup>.**

Designação (nome)	Grupo R
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	-CN
Metilcobalamina	-CH <sub>3</sub>
5-desoxiadesnoilcobalamina	

A cianocobalamina (pKa 1,59) em soluções aquosas é estável ao ar e a temperatura quando protegida da luz em pH na faixa de 4,5 a 7,0, podendo nestes casos, ser aquecida até 120° C durante 20 min sem ocorrer perda considerável de sua estrutura e conseqüentemente, de sua atividade vitamínica. Porém, é destruída na presença de luz, agentes oxidantes fortes e em altas concentrações de agentes redutores como o ácido ascórbico, sulfito e sais de Fe(II) <sup>[67]</sup>.

Para a caracterização da cianocobalamina foram obtidos espectros de absorção da radiação eletromagnética na região do UV-Vis (Fig. 48) nas concentrações de 30,0 e 60,0 mg L<sup>-1</sup>, sendo observados 4 máximos de absorção nos comprimentos de onda 277, 360, 516 e 550 nm.

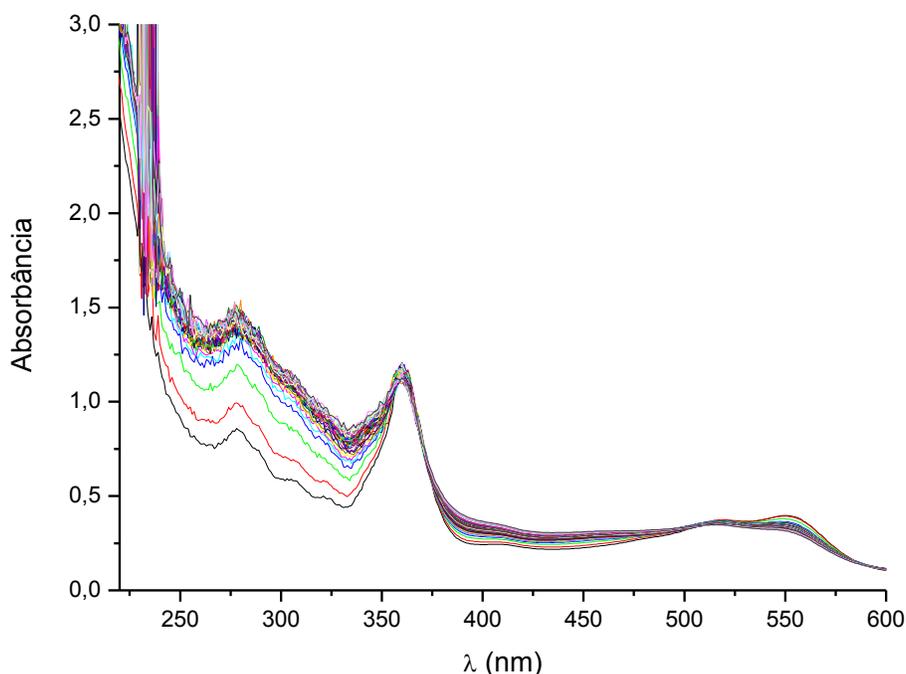


**Figura 48. Espectro eletrônico da cianocobalamina em solução aquosa.** Condições: concentrações de 30,0 ( — ) e 60,0 mg L<sup>-1</sup> ( — ).

Para a realização do estudo da reação de degradação da cianocobalamina na presença do reagente de Fenton, foram utilizadas soluções nas concentrações de: 60,0 mg L<sup>-1</sup> cianocobalamina, de 500,0 mg L<sup>-1</sup> Fe(II) e de 0,01 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com tempo de reação de 360 min. Estas condições foram selecionadas em função da baixa absorvidade molar do composto e do espalhamento de luz provocado pelo reagente de Fenton (Fig. 48 e 49), o que dificulta a obtenção dos dados para estudo do perfil da reação de degradação. Ainda, foi verificado em estudos preliminares que se a concentração da cianocobalamina estiver baixa e do reagente de Fenton alta, a reação de degradação ocorre rapidamente, não possibilitando a obtenção de perfil espectral da reação de degradação.

Por outro lado, se a concentração da cianocobalamina for muito elevada e a concentração do reagente de Fenton for baixa o processo de degradação é muito lento,

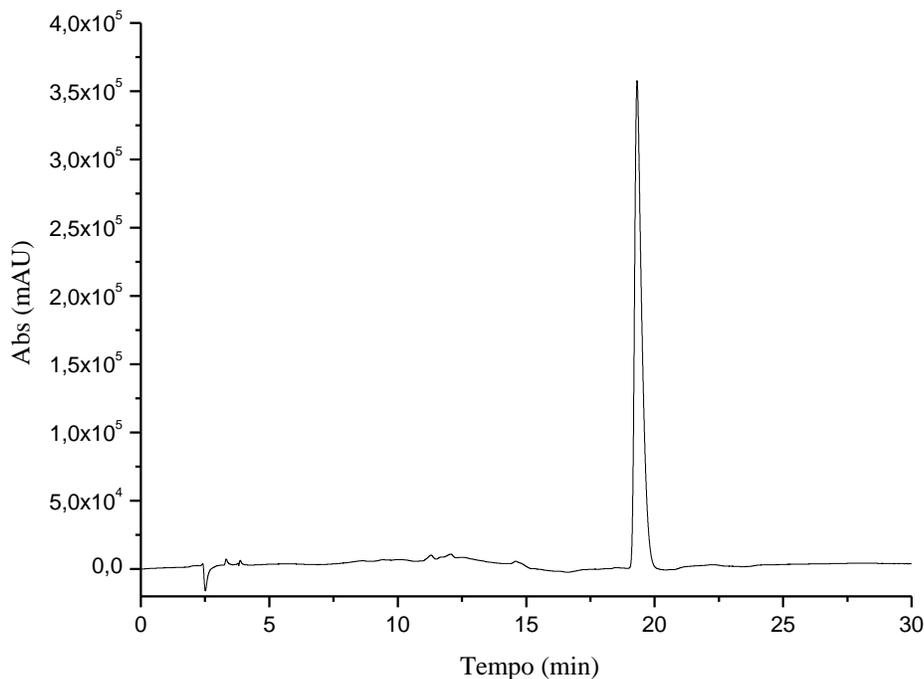
inviabilizando o estudo e a aplicação da reação para fins de obtenção da identidade digital oxidativa do composto. Assim, uma concentração intermediária tanto para a amostra como para o reagente foram selecionadas para o estudo cinético, conforme apresentado na Fig. 49.



**Figura 49. Espectro de absorção na região do UV/Vis para a reação de degradação da cianocobalamina com o reagente de Fenton.** Condições: Cianocobalamina  $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $500,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  durante os 360 min de reação. As medidas foram efetuadas entre 0,5 min – 60 min; 1,0 min - 61 a 120 min; 2,0 min – 121 a 180 min e 5,0 min até 360 min.

Analisando-se a Fig. 49, pôde-se verificar que o reagente de Fenton provocou a diminuição da intensidade dos sinais da cianocobalamina nos máximos de absorção, demonstrando que o composto pode ser degradado nas condições estudadas. Diante da possibilidade de degradação e também de um método cromatográfico capaz de promover a eluição da cianocobalamina foram realizados ensaios de degradação da cianocobalamina com o reagente de Fenton utilizando o sistema SIA.

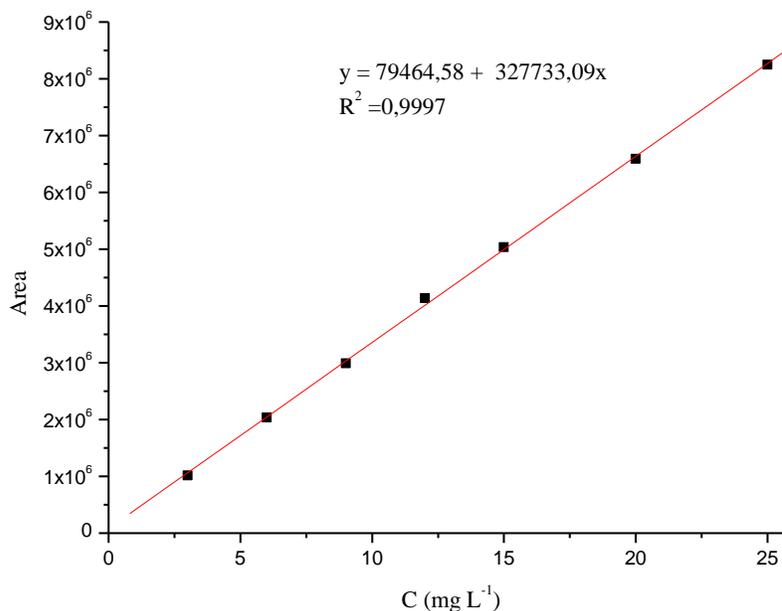
Primeiramente verificou-se o comportamento cromatográfico da cianocobalamina (Fig. 50) nas condições especificadas no *Capítulo 4 - Materiais e Métodos*, (pg. 57) mesmo método de análise utilizado para a riboflavina.



**Figura 50. Cromatograma da solução padrão da Cianocobalamina 20,0 mg L<sup>-1</sup>.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra, 235 nm.

Com a análise cromatográfica permitiu-se verificar que o tempo de retenção ( $t_r$ ) da cianocobalamina foi de 19,3 min, pois o espectro do pico correspondente a este tempo de retenção coincide com o da cianocobalamina. Ainda, verificou-se que a cianocobalamina possui um máximo de absorção na região de 235 nm, mas também pode ser monitorada em 280 e 360 nm, o que foi realizado na análise cromatográfica. Para calcular as variações de concentração do analito foi construída uma curva de analítica para a cianocobalamina (Fig. 51) utilizando as soluções padrão nas concentrações de 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 20,0 e

25,0 mg L<sup>-1</sup> com volume de injeção de amostra de 50 µL e com monitoramento do sinal analítico em 235 nm.



**Figura 51. Curva de calibração da Cianocobalamina nas concentrações de 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mg L<sup>-1</sup>.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min; vazão 1,0mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra, 235 nm.

Após, foram iniciados os testes com a cianocobalamina utilizando o sistema SIA, sendo primeiramente verificado o perfil cromatográfico da cianocobalamina sob as condições do sistema SIA, com relação ao eluente utilizado na extração em fase sólida.

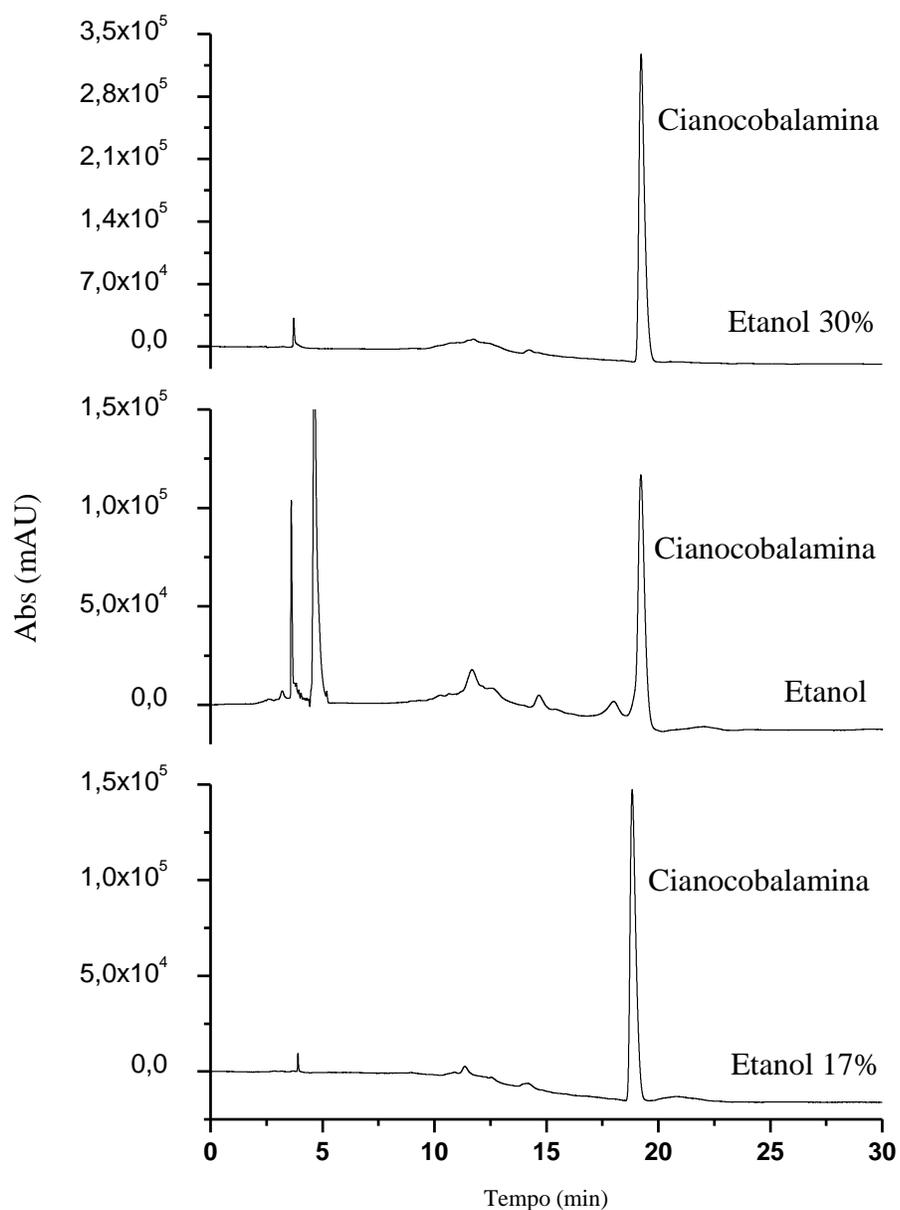
A sequência de passos utilizadas pelo sistema SIA estão especificadas na Tab.17 utilizando as soluções nas concentrações de 100,0 mg L<sup>-1</sup> de Cianocobalamina e 200 µL de cada eluente: álcool etílico, álcool etílico 17% (v/v) e álcool etílico 30% (v/v) para cada amostra e como FE C18 (50 mg) na EFS em todos o sistema SIA utilizado.

**Tabela 17. Sequência de passos utilizados pelo sistema SIA para cianocobalamina com a otimização do eluente (etanol, etanol 17% e etanol 30%) utilizado na extração em fase sólida.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	H <sub>2</sub> O	3	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	H <sub>2</sub> O	1	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Cianocobalamina 100,0 mg L <sup>-1</sup>	4	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	H <sub>2</sub> O	3	3	2,0	Aspirar	100
13	H <sub>2</sub> O	1	3	2,0	Aspirar	100
14	Cianocobalamina 100,0 mg L <sup>-1</sup>	4	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	Etanol (manual)	----	----	-----	-----	200
	Etanol 17% (manual)	----	----	-----	-----	200
	Etanol 30% (manual)	----	----	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

**Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.**

Os resultados obtidos com esta investigação estão apresentados na Fig. 52 onde pôde-se verificar que o álcool etílico (etanol) não possui comportamento adequado como eluente, pois o cromatograma apresenta-se com vários picos cromatográficos que não são condizentes com o perfil da amostra analisada, pois a análise refere-se apenas à cianocobalamina. Assim, o perfil cromatográfico apresentado no cromatograma deveria conter apenas 2 picos, um referente ao eluente utilizado no estágio inicial da análise e um outro referente a cianocobalamina.



**Figura 52. Cromatograma da solução padrão da cianocobalamina utilizando o sistema SIA com a otimização do eluente (etanol, etanol 17% e etanol 30%) utilizado na extração em fase sólida.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50 \mu\text{L}$  de amostra, 235 nm.

Na tentativa de melhorar o perfil cromatográfico, foi testado como eluente 17%, de Etanol, pois esta proporção era a composição da fase móvel B utilizada na separação

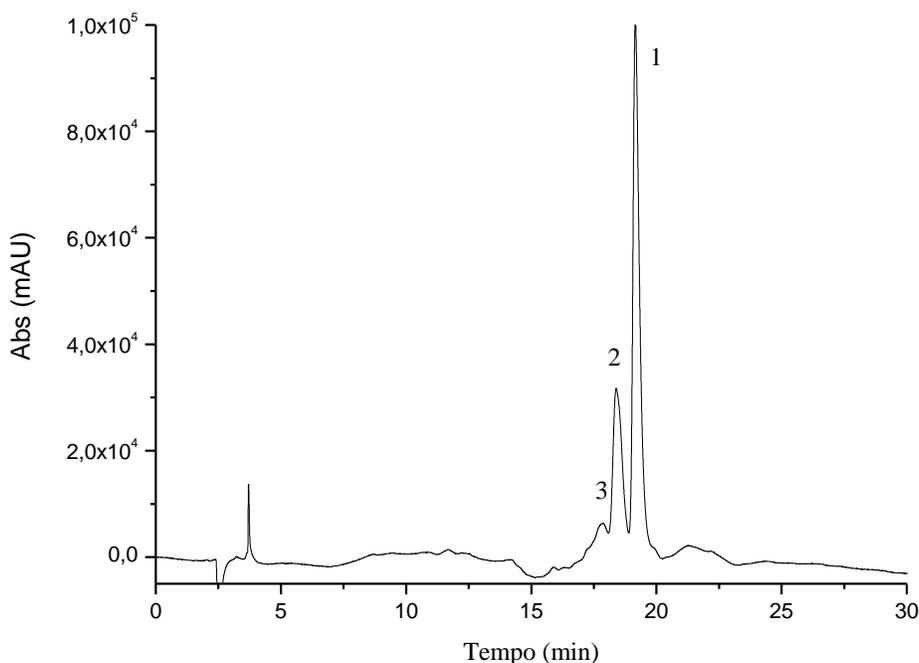
cromatográfica anterior; sob esta condição o perfil cromatográfico melhorou (Fig. 52) não apresentando mais vários sinais, no entanto, o sinal do analito diminuiu de intensidade, pois o eluente nesta proporção não era efetivo para retirar a cianocobalamina da FE (C18) do cartucho de extração. Estes resultados indicaram que a concentração de etanol deveria ser aumentada e quando se utilizou 30% de Etanol como eluente melhores resultados foram obtidos, com a intensificação do sinal da cianocobalamina e melhora na separação cromatográfica.

Após esta investigação foram iniciados os testes de degradação da cianocobalamina com o reagente de fenton seguindo condições semelhantes aquelas utilizadas para a riboflavina, tais como a sequência das etapas (Tab. 18) e as concentrações de 60,0 mg L<sup>-1</sup> para a cianocobalamina, 1200,0 mg L<sup>-1</sup> para Fe(II) e 0,01 mol L<sup>-1</sup> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acordo com o especificado na Tab. 18 e na Fig. 53.

**Tabela 18. Sequência de passos utilizados pelo sistema SIA para realizar a degradação da cianocobalamina com reagente de Fenton.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	Cianocobalamina 60,0 mg L <sup>-1</sup>	4	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Fe(II) 1200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	3	2,0	Aspirar	100
13	Cianocobalamina 60,0 mg L <sup>-1</sup>	4	3	2,0	Aspirar	100
14	Fe(II) 1200,0 mg L <sup>-1</sup>	3	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	Etanol 30% (manual)	---	----	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.



**Figura 53. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 18.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra, 235 nm.

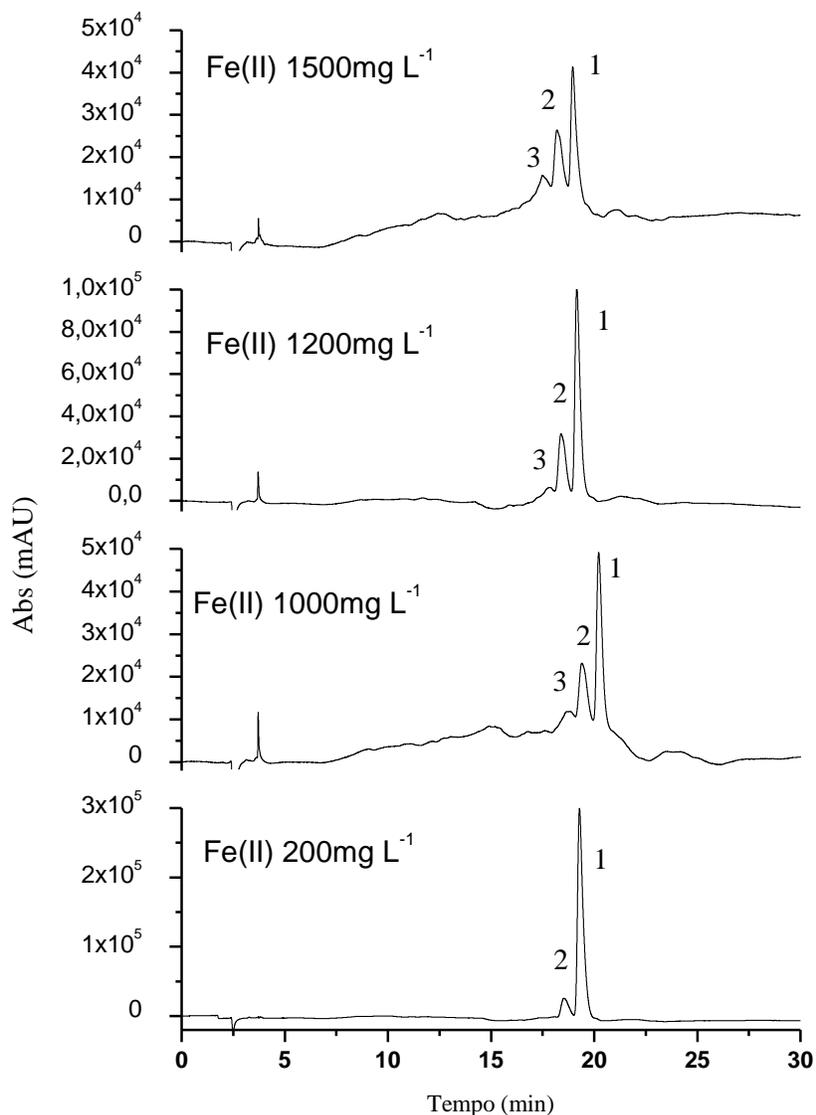
O resultado apresentado (Fig. 53) demonstra que houve a formação de produtos de oxidação, mas não com perfil adequado para se obter a identidade digital oxidativa da cianocobalamina; pois esperava-se que, em virtude da massa molecular desta ser elevada ocorresse a formação de maior número de produtos da reação de oxidação da cianocobalamina com o reagente de Fenton. Assim, foram investigadas outras concentrações da solução de Fe(II) (200,0; 1000,0; e 1500,0 mg L<sup>-1</sup>) seguindo as condições especificadas na Tab. 19 como tentativa de aumentar o número de produtos formados após a reação de oxidação com o reagente de Fenton.

**Tabela 19. Sequência de passos utilizados pelo sistema SIA para realizar a degradação da cianocobalamina com reagente de Fenton verificação da concentração da solução de Fe(II).**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	Cianocobalamina 60,0 mg L <sup>-1</sup>	4	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Solução de Fe(II) - (200,0; 1000,0; 1200,00 e 1500,0 mgL <sup>-1</sup> )	3	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	3	2,0	Aspirar	100
13	Cianocobalamina 100,0 mg L <sup>-1</sup>	4	3	2,0	Aspirar	100
14	Solução de Fe(II) - (200,0; 1000,0; 1200,0 e 1500,0 mgL <sup>-1</sup> )	3	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	Etanol 30% (manual)	---	---	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

**Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.**

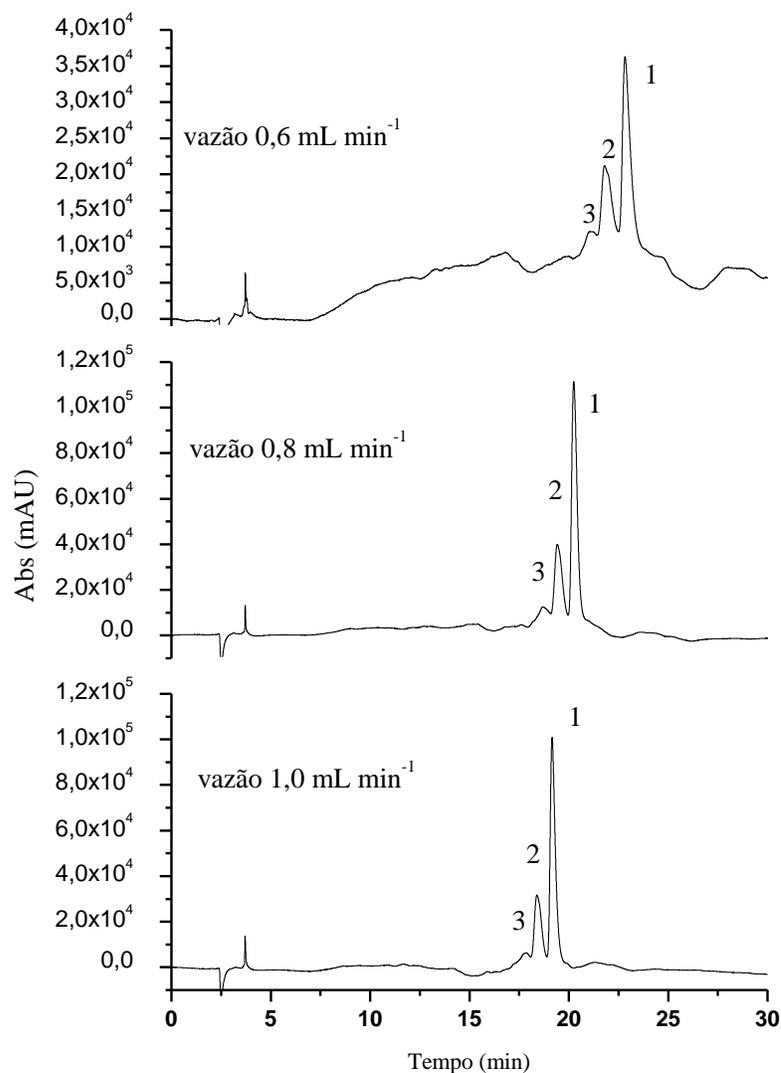
Os resultados obtidos (Fig.54) sob estas condições demonstraram que a solução de Fe(II) em todas as concentrações testadas promoveu a degradação da cianocobalamina e formação de produtos de oxidação. Para a solução de Fe(II) 200,0mg L<sup>-1</sup> a taxa de degradação foi mais lenta e menos efetiva para a formação dos produtos da oxidação. Para as soluções nas concentrações de 1000,0; 1200,0 e 1500,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) os resultados foram bastante similares com relação ao número de produtos (Fig.54), no entanto como a condição com 1200,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) foi utilizada para a degradação de riboflavina e a condição de 1500,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) provoca maior impregnação de Fe(III) tanto no sistema SIA como no cartucho de extração, portanto os testes subsequentes foram realizados com a solução de Fe(II) de 1200,0 mg L<sup>-1</sup>.



**Figura 54. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 19 investigação da concentração da solução de Fe(II) 200,0; 1000,0; 1200,0 e 1500,0 mg L<sup>-1</sup>.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0 min; vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra, 235 nm.

Os resultados obtidos demonstraram o que estava dificultando a obtenção da impressão digital oxidativa era a separação cromatográfica que não se demonstrou adequado para a separação dos produtos de oxidação (Figs. 53 e 54) e não as condições de degradação. Desta

forma, foram realizadas modificações na vazão da FM (Fig. 55) utilizada na separação cromatográfica e manteve-se as seguintes condições de oxidação: concentração de 60,0 mg L<sup>-1</sup> da cianocobalamina, 1200,0 mg L<sup>-1</sup> de Fe(II) e 0,01 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acordo com a sequência especificada na Tab.19.



**Figura 55. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton (Fe(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 19 modificação da vazão da FM 0,6; 0,8 e 1,0 mL min<sup>-1</sup>.** Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição 0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 30,0min; injeção de 50 µL de amostra, 235 nm.

As tentativas de modificação da vazão no gradiente da fase móvel não levaram a separação cromatográfica adequada (Fig. 55); assim, restou como alternativa a modificação da composição da FM e, como o eluente utilizado na extração do analito era composto por 30% de álcool etílico, a Fase B que continha 17% de álcool etílico foi substituída pela Fase C com 30% álcool etílico. Os primeiros testes foram realizados utilizando-se Fase A (1% de etanol e 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) e Fase C (30% etanol e 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) com ajuste de pH 7,00 para ambas soluções e mantendo as proporções do gradiente utilizado nos testes anteriores descrito no *Capítulo 4 – Materiais e Métodos (para determinação da riboflavina)* que também não resultaram em melhora na separação cromatográfica.

Diante desses resultados, foram testadas outras proporções para a eluição cromatográfica utilizando a eluição por gradiente mantendo se as Fases A e C utilizadas, e utilizando as condições de eluição especificadas nas Tab. 20 a 23.

**Tabela 20. Especificações do gradiente de eluição (90-10)% para a análise da cianocobalamina.**

Composição Gradiente (90-10) %		
Tempo (min)	Fase A	Fase C
0,0 a 2,5	90,0%	10,0%
2,5 a 10,0	50,0%	50,0%
10,0 a 15,0	30,0%	70,0%
15,0 a 20,0	10,0%	90,0%
20,0 a 22,0	0,0%	100,0%
22,0 a 25,0	0,0%	100,0%

**Tabela 21. Especificações do gradiente de eluição (80-20)% para a análise da cianocobalamina.**

Composição do Gradiente (80-20)%		
Tempo (min)	Fase A	Fase C
0,0 a 2,5	80,0%	20,0%
2,5 a 10,0	50,0%	50,0%
10,0 a 15,0	20,0%	80,0%
15,0 a 20,0	10,0%	90,0%
20,0 a 22,0	0,0%	100,0%
22,0 a 25,0	0,0%	100,0%

**Tabela 22. Especificações do gradiente de eluição (75-25)% para a análise da cianocobalamina.**

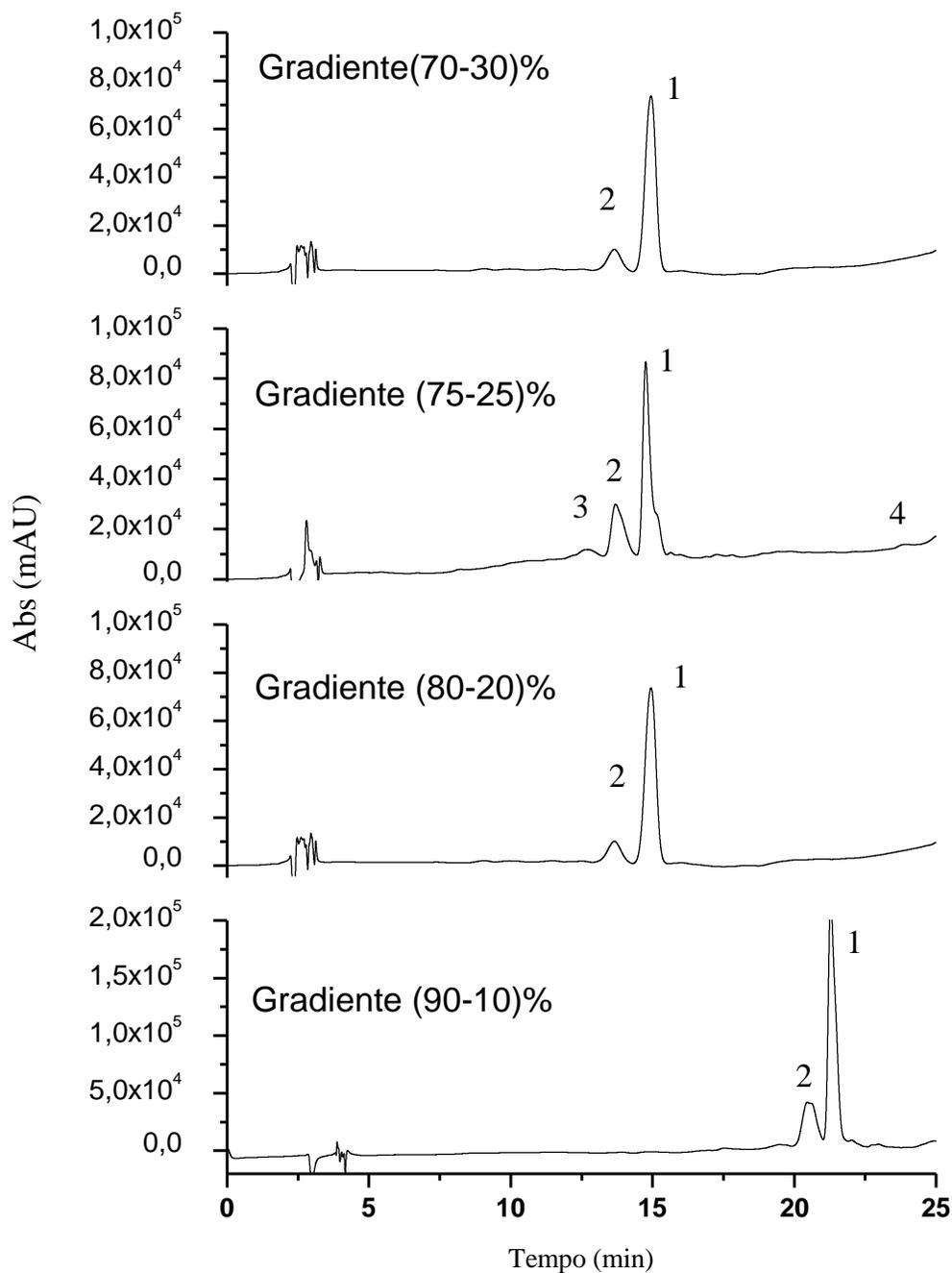
Composição Gradiente (75-25) %		
Tempo (min)	Fase A	Fase C
0,0 a 2,5	75,0%	25,0%
2,5 a 10,0	50,0%	50,0%
10,0 a 15,0	25,0%	75,0%
15,0 a 20,0	10,0%	90,0%
20,0 a 22,0	0,0%	100,0%
22,0 a 25,0	0,0%	100,0%

**Tabela 23. Especificações do gradiente de eluição (70-30)% para a análise da cianocobalamina.**

Composição do Gradiente (70-30)%		
Tempo (min)	Fase A	Fase C
0,0 a 2,5	70,0%	30,0%
2,5 a 10,0	50,0%	50,0%
10,0 a 15,0	30,0%	70,0%
15,0 a 20,0	10,0%	90,0%
20,0 a 22,0	0,0%	100,0%
22,0 a 25,0	0,0%	100,0%

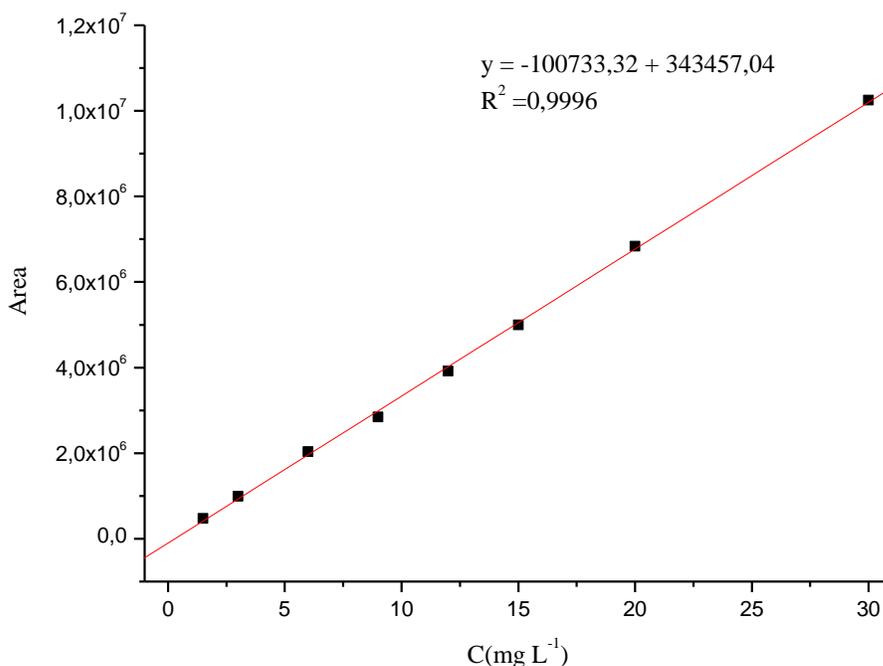
As análises das amostras foram realizadas seguindo-se as mesmas condições e sequência da Tab. 19, porém com modificação do método cromatográfico para determinação da cianocobalamina, conforme as condições das Tab. 20 a 23, sendo que os resultados obtidos sob estas condições estão apresentados na Fig. 56.

Analisando o cromatograma obtido (Fig. 56) pode-se verificar que o gradiente (90-10)% não se mostrou adequado, pois apresentou um maior tempo de retenção e não promoveu separação adequada dos compostos. Para os gradientes (80-20)%, (75-25)% e (70-30)% os resultados foram muito similares tanto com relação ao tempo de análise quanto a separação cromatográfica que foram adequados, no entanto, o gradiente (75-25)% apresentou a vantagem de definir um pequeno sinal analítico com tempo de retenção de 12,3 min; além de melhorar a intensidade do sinal analítico em 13,5 min e de evidenciar a ocorrência de um sinal analítico de baixa intensidade em 23,5 min (Fig. 56).



**Figura 56.** Cromatograma da cianocobalamina sob a reação de Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 19 modificação no gradiente de eluição conforme as especificações da Tab 20 a 23. Condições Cromatográficas: Gradiente de eluição conforme as Tab. 20 a 23, injeção de 50  $\mu\text{L}$  de amostra, 235 nm.

Com a nova condição cromatográfica otimizada utilizando Fase A (1% de etanol e  $0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) e Fase C (30% de etanol e  $0,02 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) com ajuste de pH 7,00 e utilizando-se o modo de eluição por gradiente (75/25)% da Tabela 22 construiu-se nova curva analítica (Fig.57) para calcular as variações de concentração da cianocobalamina.



**Figura 57. Curva de calibração da Cianocobalamina nas concentrações de 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 20,0 e 30,0 mg L<sup>-1</sup> com Fase A/Fase C.** Condições Cromatográficas: gradiente de eluição: 0,0 a 2,5 min - Fase A/Fase C (75/25)%; 2,5 a 10,0 min - Fase A/Fase C (50/50)%; 10,0 a 15,0 min - Fase A/Fase C (25/75)%; 15,0 a 20,0 min - Fase A/Fase C (10/90)%; 20,0 a 22,0 min - Fase A/Fase C (0/100)% mantendo constante até 25,0min; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50 \mu\text{L}$  de amostra, 235nm.

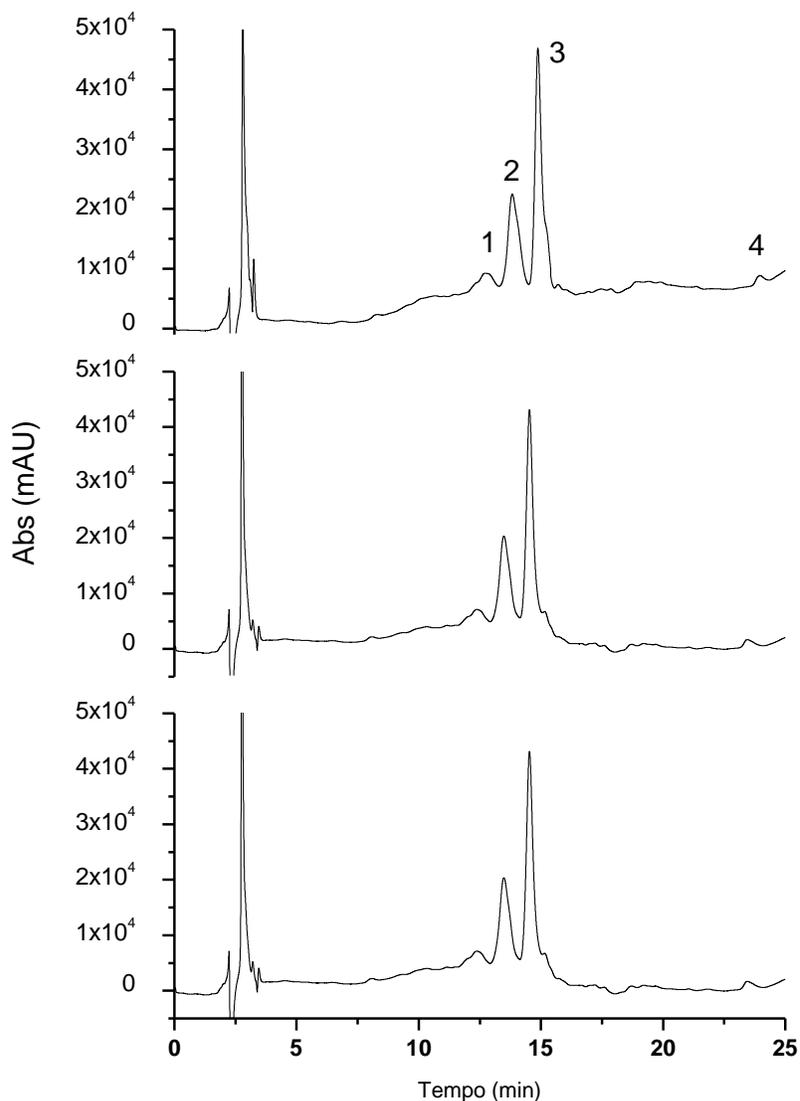
Para se verificar a reprodutibilidade das análises obteve-se a identidade digital oxidativa da cianocobalamina em triplicata sob as novas condições: condições de oxidação especificadas na Tab.24; concentrações de  $60,0 \text{ mg L}^{-1}$  para Cianocobalamina, Fe(II)  $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{L}$  do eluente (30% de Etanol).

**Tabela 24. Sequência de passos otimizados para realizar a degradação da cianocobalamina com a reação de Fenton pelo sistema SIA.**

Etapa	Evento	Porta	Tempo (s)	Velocidade de Bombeamento (mL min <sup>-1</sup> )	Direção da Vazão	Volume (µL)
6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01 mol L <sup>-1</sup>	1	12	2,0	Aspirar	400
7	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
8	Cianocobalamina 60,0 mgL <sup>-1</sup>	4	12	2,0	Aspirar	400
9	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
10	Fe(II) 1200,0mg L <sup>-1</sup>	3	12	2,0	Aspirar	400
11	Descarte	5	24	2,0	Injetar	800
12	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,01mol L <sup>-1</sup>	1	3	2,0	Aspirar	100
13	Cianocobalamina 60,0 mgL <sup>-1</sup>	4	3	2,0	Aspirar	100
14	Fe(II) 120,00 mg L <sup>-1</sup>	3	3	2,0	Aspirar	100
15	Bobina de reação (BR)	2	8	2,0	Injetar	500
16	Tempo de permanência (BR)	2	30	-----	-----	-----
17	BR e FS	2	75	2,0	Injetar	2500
18	Etanol 30% (manual)	---	----	-----	-----	200
19	Lavagem	2	60	2,0	Injetar	2000 – H <sub>2</sub> O

**Linha pontilhada (-----) corresponde a não utilização desses parâmetros reacionais.**

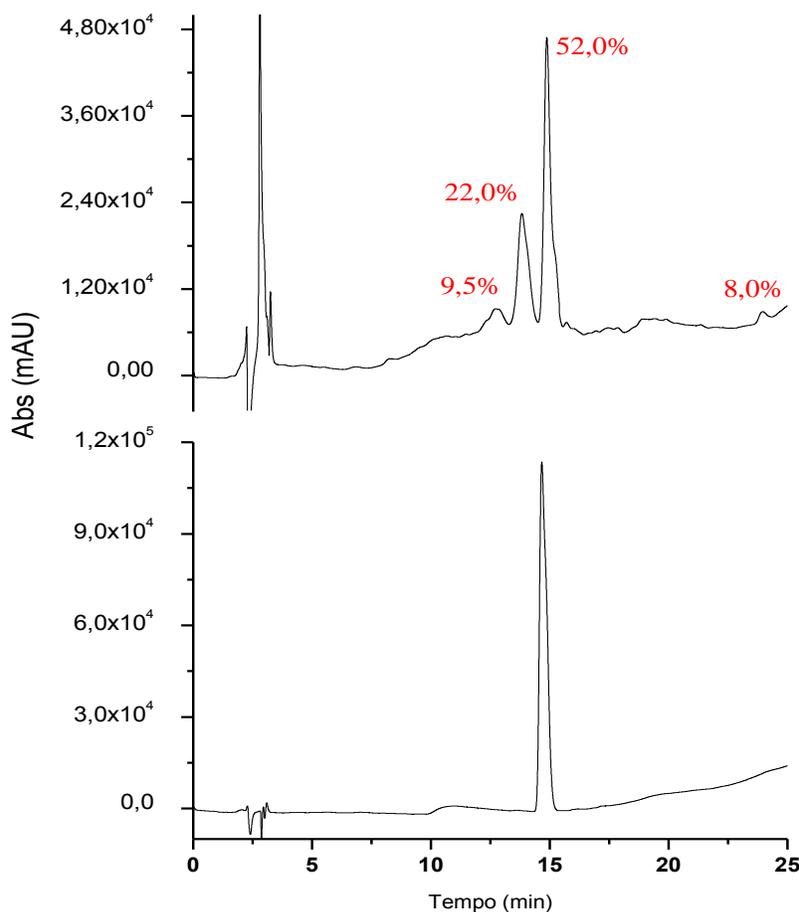
Como método cromatográfico foi utilizado: Fase A (1% de etanol e 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) e Fase C (30% etanol e 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) com ajuste de pH 7,00; para ambas as soluções e utilizando se o gradiente - 0,0 a 2,5 min - Fase A/Fase C (75/25)%; 2,5 a 10,0 min - Fase A/Fase C (50/50)%; 10,0 a 15,0 min - Fase A/Fase C (25/75)%; 15,0 a 20,0 min - Fase A/Fase C (10/90)%; 20,0 a 22,0 min- Fase A/Fase C (0/100)% mantendo constante até 25,0 min, sempre com vazão constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 µL de amostra e monitoramento do sinal analítico em 235nm obtendo-se os resultados apresentados na Fig. 58.



**Figura 58. Cromatograma da cianocobalamina sob a reação Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) utilizando o sistema SIA, conforme as condições da Tab. 24 verificação da reprodutibilidade dos resultados.** Condições Cromatográficas: gradiente de eluição: 0,0 a 2,5 min - Fase A/Fase C (75/25)%; 2,5 a 10,0 min - Fase A/Fase C (50/50)%; 10,0 a 15,0 min - Fase A/Fase C (25/75)%; 15,0 a 20,0 min - Fase A/Fase C (10/90)%; 20,0 a 22,0 min- Fase A/Fase C (0/100)% mantendo constante até 25,0min; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50\mu\text{L}$  de amostra, 235 nm.

Com a obtenção dos produtos de oxidação da cianocobalamina após a reação de Fenton e com a curva de analítica (Fig. 57) pôde-se verificar que a concentração inicial da

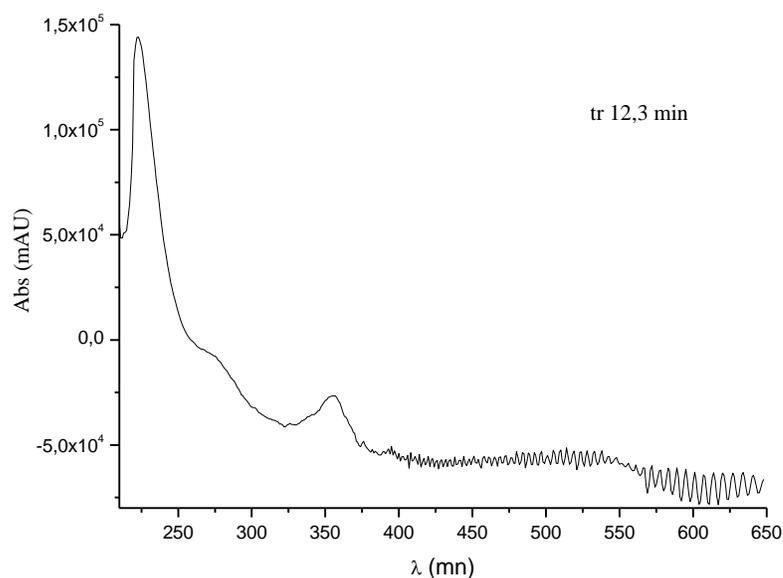
cianocobalamina sem ser submetida à reação de Fenton, utilizando o sistema SIA foi de  $23,4 \text{ mg L}^{-1}$ . Após a cianocobalamina ser submetida à reação de Fenton a concentração foi de  $4,3 \text{ mg L}^{-1}$  conforme os dados apresentados na Fig. 59 na qual relaciona-se a porcentagem da cianocobalamina e dos produtos de oxidação após a reação de Fenton.



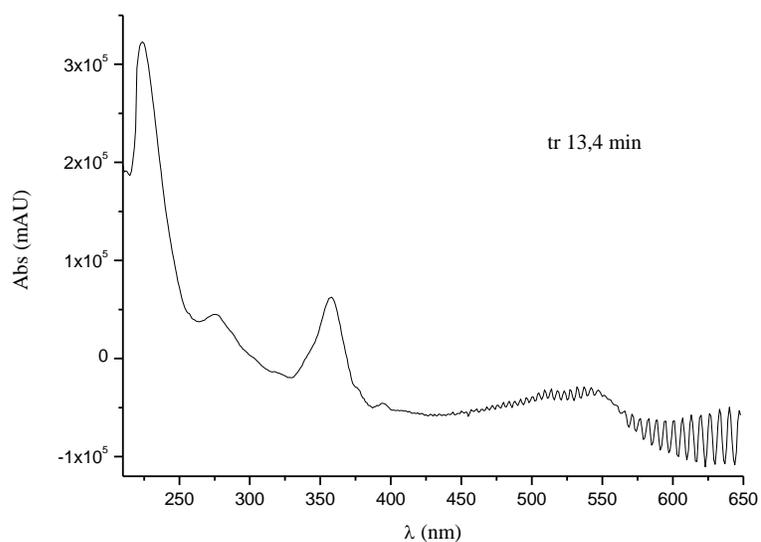
**Figura 59. Cromatograma da cianocobalamina e identidade digital oxidativa da cianocobalamina obtida após oxidação parcial utilizando-se reação Fenton ( $\text{Fe(II)/H}_2\text{O}_2$ ) em sistema SIA com as porcentagens de cada produto de oxidação.** Condições Cromatográficas: gradiente de eluição: 0,0 a 2,5 min - Fase A/Fase C (75/25)%; 2,5 a 10,0 min - Fase A/Fase C (50/50)%; 10,0 a 15,0 min - Fase A/Fase C (25/75)%; 15,0 a 20,0 min - Fase A/Fase C (10/90)%; 20,0 a 22,0 min - Fase A/Fase C (0/100)% mantendo constante até 25,0min; vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , injeção de  $50 \mu\text{L}$  de amostra, 235 nm.

Com estes resultados foi possível verificar que nas condições otimizadas para a reação de Fenton, esta foi a condição eficiente possibilitando a clivagem da cianocobalamina formando os produtos de oxidação que podem ser utilizados para obter a identidade digital oxidativa do composto. Desta forma, passou-se então a se investigar os prováveis produtos formados, para se obter a identidade oxidativa da cianocobalamina. O primeiro sinal cromatográfico com  $t_r$  2,9 min trata-se, provavelmente, do eluente da amostra, pois a utilização de uma maior porcentagem de álcool etílico 30% como eluente acabou resultando em um sinal analítico nos estágios iniciais da análise, pois a FM utilizada na separação da cianocobalamina é composta inicialmente por uma Fase A que contém apenas 1% de álcool etílico em fase aquosa.

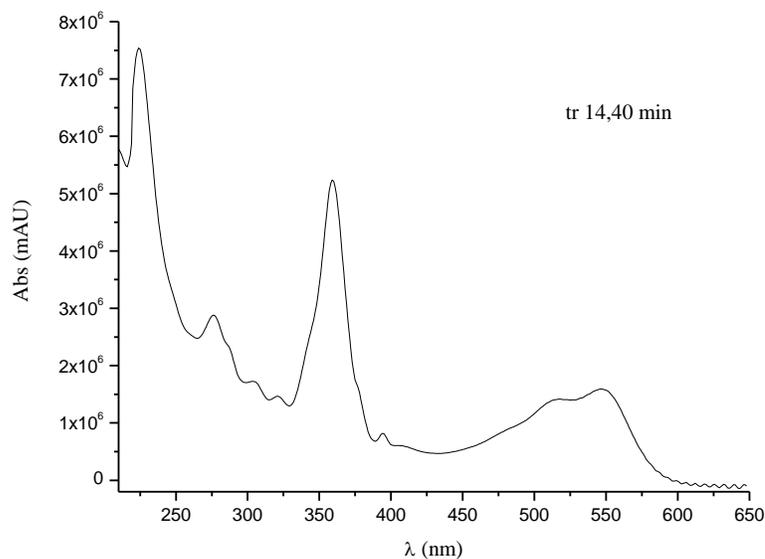
Os sinais cromatográficos 1, 2, e 4 são produtos de oxidação da cianocobalamina utilizando o reagente de Fenton, Os espectros obtidos para cada um dos picos cromatográficos são apresentados nas Figs. 60 a 63.



**Figura 60. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 1 da cianocobalamina com tempo de retenção de 12,3 min.** Condições reação de fenton: cianocobalamina( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ , Fe(II) ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 24 (pg. 122).

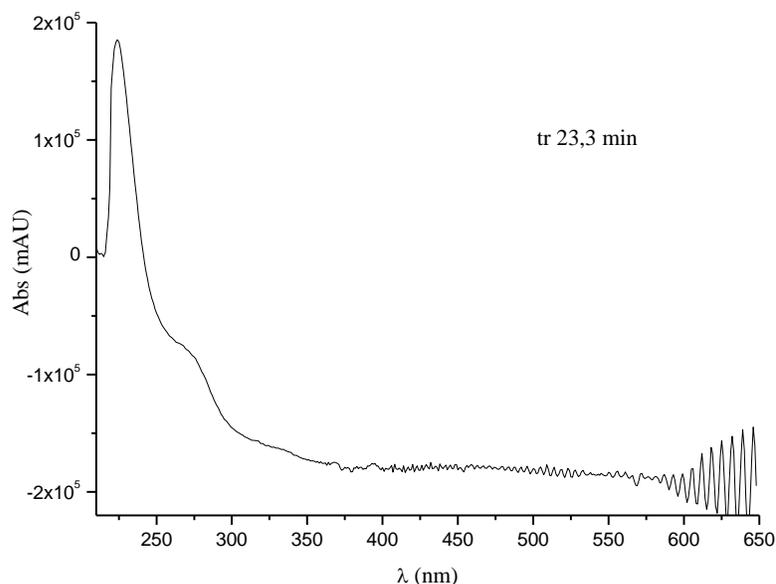


**Figura 61. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 2 da cianocobalamina com tempo de retenção de 13,4 min.** Condições reação de fenton: cianocobalamina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ ,  $\text{Fe(II)}$  ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100\mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100\mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 24 (pg. 122).



**Figura 62. Espectro UV/Vis do pico 3 ( parcela da cianocobalamina que não sofreu oxidação) com tempo de retenção de 14,5 min.** Condições reação de fenton: cianocobalamina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ ,  $\text{Fe(II)}$  ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100\mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 24 (pg. 122).

O perfil espectral apresentado na Fig. 62 é referente ao espectro da cianocobalamina, ou seja, pico 3 refere-se a cianocobalamina que restou no meio reacional sem ser oxidada.

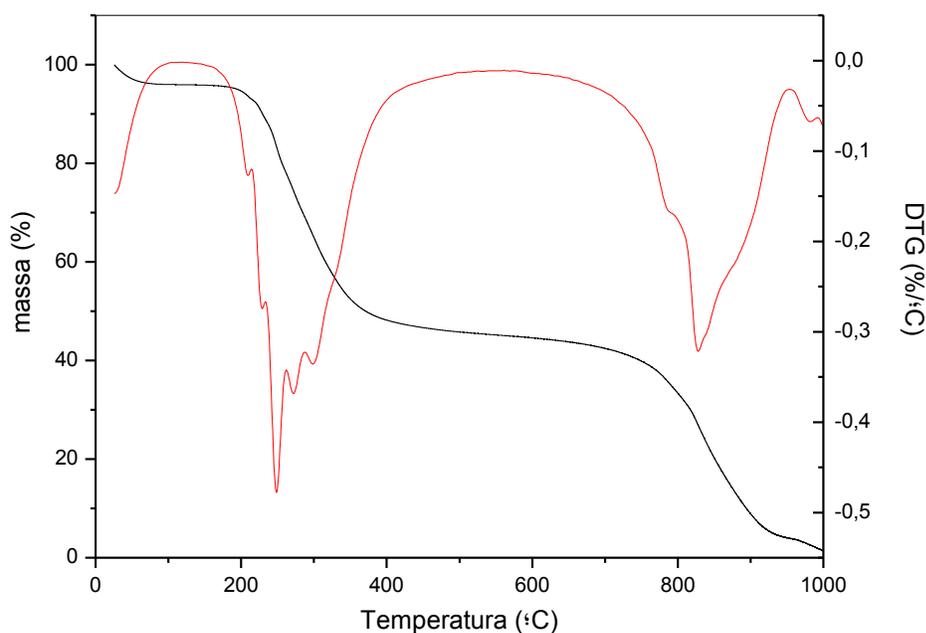


**Figura 63. Espectro UV/Vis do produto de oxidação 4 da cianocobalamina com tempo de retenção de 23,3 min.** Condições reação de fenton: cianocobalamina ( $60,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$ , Fe(II) ( $1200,0 \text{ mg L}^{-1}$ )  $100\mu\text{L}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ )  $100\mu\text{L}$  utilizando sistema SIA conforme as condições da Tab. 24 (pg. 122).

Para a obtenção da identidade digital oxidativa da cianocobalamina foi realizada a análise termogravimétrica e a investigação em artigos relacionados com a estrutura da cianocobalamina e seus produtos de degradação,<sup>[70]</sup> como os resultados apresentados pela riboflavina com as análises por EM e RMN não foram efetivos para obtenção da identidade oxidativa da riboflavina, assim tornou-se inviável a análise da cianocobalamina e os seus produtos de degradação por essas técnicas.

Com a obtenção da curva termogravimétrica (Fig. 64) nas condições especificadas no Capítulo 4 – Materiais e Métodos (pg. 59) pôde-se verificar que os primeiros estágios da degradação envolveram o rompimento das moléculas de água devido à umidade presente na

amostra, o que foi comprovado pela análise por DSC (Fig.65), onde o primeiro evento endotérmico que ocorreu entre 50 e 120°C que é característico da perda de umidade do composto.

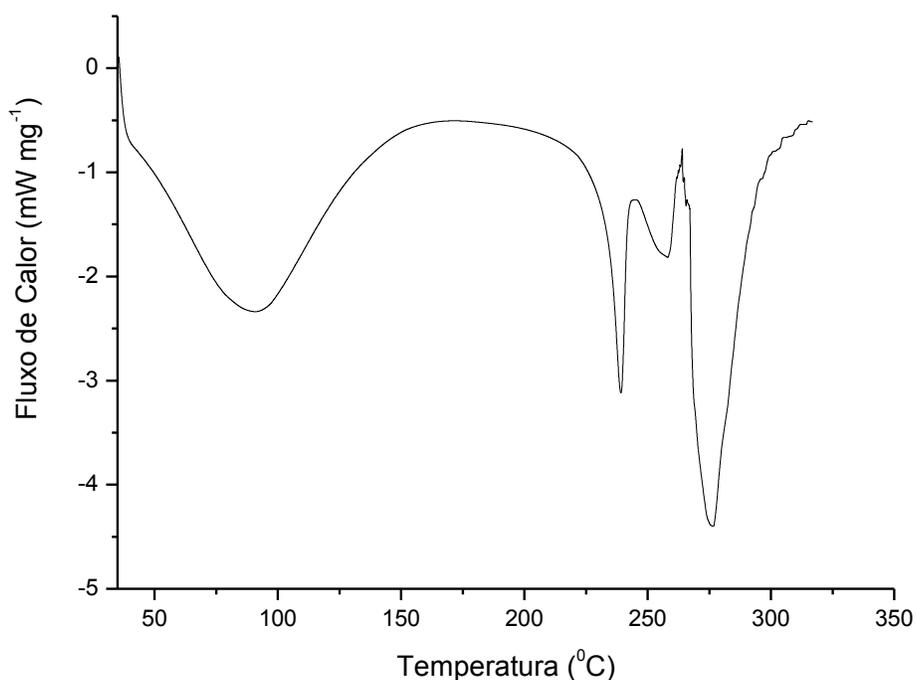


**Figura 64. Curva termogravimétrica (TG e DTG) para a cianocobalamina.** Condições: taxa de aquecimento  $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até a temperatura de  $1000^{\circ}\text{C}$  com uma vazão de  $100\text{ mL min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ .

Na curva termogravimétrica verificou-se que na temperatura entre 190 a 410°C ocorreu uma grande perda de massa, ou seja, a taxa de degradação nesta faixa de temperatura foi elevada com processo consecutivo de 4 etapas, conforme pode ser verificado pela curva DTG (Fig.64), o que, provavelmente, resultou na clivagem dos grupamentos ligados ao anel pirrólico. Entre 410 a 700° C o processo de degradação se manteve praticamente estável sem apresentar perda de massa significativa. Acima de 700° C ocorreu intensa degradação da estrutura até a temperatura de 1000° C onde, provavelmente, ocorreu a perda dos grupamentos ligados ao anel pirrólico (porfirina) como acetamida e propionamida, sendo que após a ruptura do anel pirrólico

restou apenas 0,05582 g do composto, porcentagem de 1,437% que pode ser atribuída à formação de óxidos, principalmente, o óxido de cobalto.

Para a curva de DSC (Fig. 65) foram observados a presença de 3 picos endotérmicos em temperaturas acima de 230° C que podem ser atribuídos a decomposição térmica do composto.



**Figura 65. Curva termogravimétrica diferencial (DSC) da cianocobalamina.** Condições: taxa de aquecimento 10°C min<sup>-1</sup> até a temperatura de 350 °C com uma vazão de 50 mL min<sup>-1</sup> de N<sub>2</sub>.

Com os resultados obtidos através da análise termogravimétrica (curvas TG, DTG e DSC) e com os espectros de cada um dos produtos de oxidação formados após a reação de Fenton, separados via cromatografia, pôde-se verificar que a estrutura central da cianocobalamina que, apresenta o anel pirrólico, é bastante estável. Assim, provavelmente as estruturas dos produtos de oxidação formados apresentam o grupamento porfirínico com a

clivagem dos grupamentos ligados a este grupamento, pois são grupos menos estáveis, portanto, susceptíveis à oxidação.

Com base nos dados obtidos da análise termogravimétrica e relacionando-se a massa do analito a cada variação de temperatura pôde-se efetuar cálculos relacionados com a massa molar dos compostos e chegar as prováveis estruturas dos produtos de oxidação formados, de acordo com os resultados apresentados na Tab. 25, obtendo-se assim, a identidade digital oxidativa da cianocobalamina (Figs. 66 a 69).

**Tabela 25. Relação entre temperatura, massa e massa molar da cianocobalamina a partir da análise termogravimétrica.**

Temperatura (°C)	Massa (g)	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )	Intermediário
25,0	3,8840	-----	Cianocobalamina + H <sub>2</sub> O
110,0	3,7269	1355,5	Cianocobalamina (3)
241,4	3,3636	1223,4	1
267,0	2,9616	1077,2	2
301,0	2,5097	912,8	4

As sequências de 1 a 5 na Fig. 66 demonstram, provavelmente onde ocorreram às clivagens na estrutura da cianocobalamina. A primeira clivagem ocorreu na pentose, por ser um composto que apresenta um baixo ponto de fusão e alta solubilidade em meio aquoso, sendo que após este evento deve ter ocorrido na sequência outras quebras de ligação formando os produtos de oxidação 1, 2 e 4 nas Figs. 67 a 69.

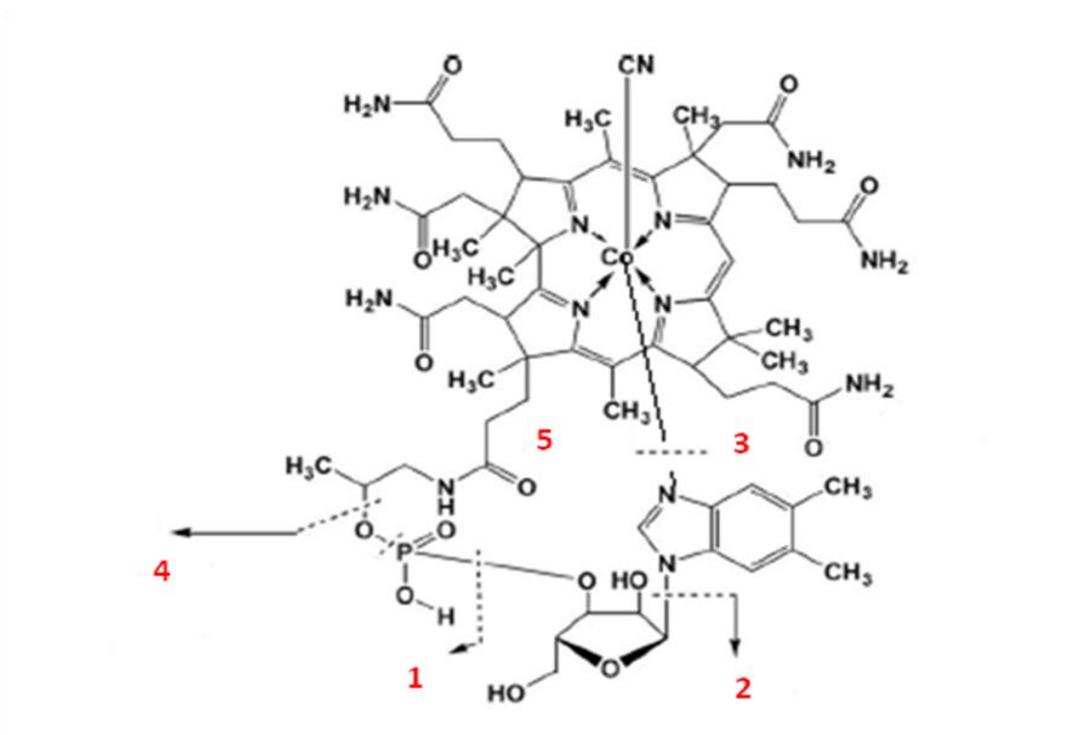


Figura 66. Estrutura da Cianocobalamina com as possíveis ordens de clivagem <sup>[70]</sup>.

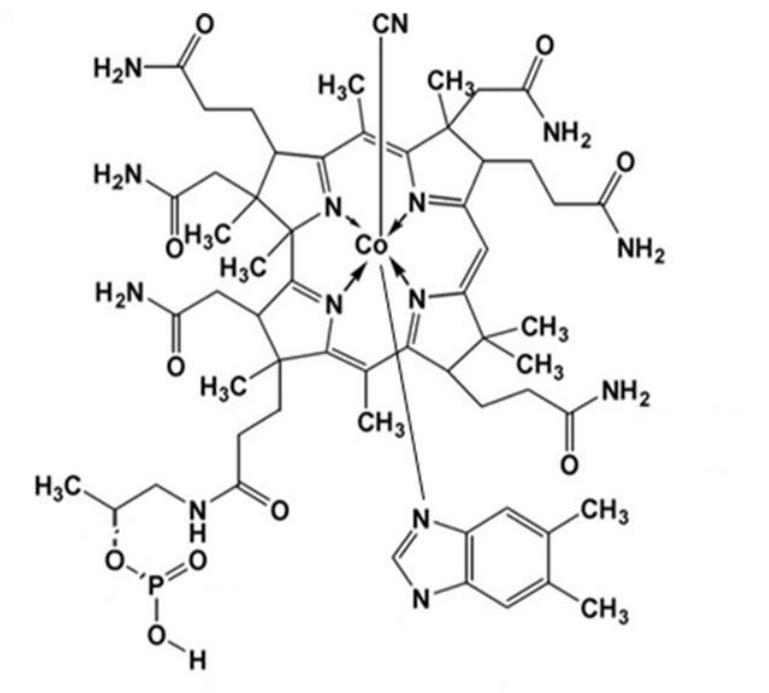


Figura 67. Estrutura do produto de oxidação 1 ( $1223,4 \text{ g mol}^{-1}$ ) da cianocobalamina.

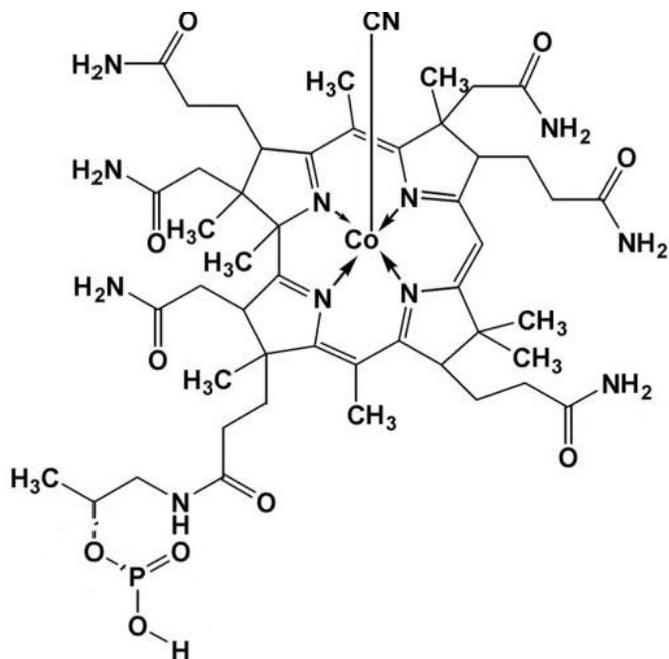


Figura 68. Estrutura do produto de oxidação 2 ( $1077,2 \text{ g mol}^{-1}$ ) da cianocobalamina.

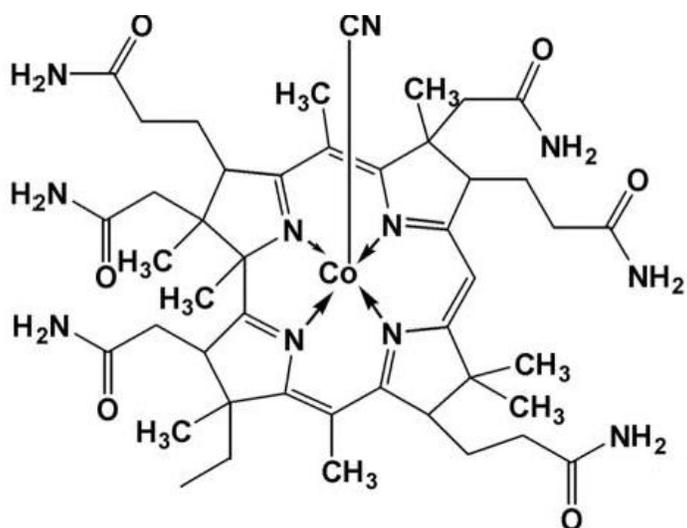


Figura 69. Estrutura do produto de oxidação 4 ( $912,8 \text{ g mol}^{-1}$ ) da cianocobalamina

Estas estruturas representam os prováveis fragmentos formados após a reação de oxidação da cianocobalamina utilizando a reação de fenton que resultou na obtenção do cromatograma com a identidade digital oxidativa do composto.

## 6. CONCLUSÕES

Com as investigações realizadas pôde-se verificar que a reação de Fenton provoca uma degradação efetiva destes compostos orgânicos investigados: riboflavina e cianocobalamina, podendo levar a degradação parcial ou total do analito, dependendo das condições utilizadas para promover a degradação.

A condição que possibilitou a formação dos produtos de oxidação da riboflavina dando origem a sua identidade digital oxidativa foi: 60,0 mg L<sup>-1</sup> de Riboflavina, 1200,0 mg L<sup>-1</sup>Fe(II), 0,01 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200 µL do eluente (álcool etílico) e como FE(C18) na extração em fase sólida. Sob estas condições verificou-se a formação de 4 produtos de oxidação que foram separados e detectados pela método cromatográfico que utilizou duas fases nas seguintes condições: Fase A composta por 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 1% álcool etílico e Fase B composta 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 17% álcool etílico, com ajuste de pH 7,00 para ambas as soluções, sendo o modo de eluição por gradiente (0,0 a 2,5 min – Fase A/Fase B (98/2)%; 2,5 a 15,0 min – Fase A/Fase B (0/100)%, mantendo constante até 40,0min) com vazão constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup> utilizando-se coluna C18.

A condição que possibilitou à formação dos produtos de oxidação que deram origem a identidade digital oxidativa da cianocobalamina foi: 60,0 mg L<sup>-1</sup> da cianocobalamina, 1200,0 mg L<sup>-1</sup> Fe(II), 0,01mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 200 µL do eluente (álcool etílico 30% (v/v)) e como FE(C18) na extração em fase sólida. Sob estas condições verificou-se a formação de 3 produtos de oxidação que foram separados e detectados pelo método cromatográfico composto por duas fases sendo: Fase A composta por 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 1% álcool etílico e Fase C composta 0,02 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e 30% álcool etílico, com ajuste de pH 7,00 para ambas as soluções, sendo o modo de eluição por gradiente nas condições 0,0 a 2,5 min - Fase A/Fase C (75/25)%; 2,5 a 10,0 min - Fase A/Fase C (50/50)%; 10,0 a 15,0 min -

Fase A/Fase C (25/75)%; 15,0 a 20,0 min - Fase A/Fase C (10/90)%; 20,0 a 22,0 min- Fase A/Fase C (0/100)% mantendo constante até 25,0 min, associada a uma vazão  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e como fase estacionária uma coluna C18.

Diante dos resultados obtidos verificou-se a possibilidade de desenvolver método cromatográfico alternativo que permita maior segurança na identificação dos compostos eluídos da coluna sem recorrer a técnicas como RMN e a espectrometria de massas. O método é baseado na obtenção da identidade digital oxidativa dos compostos após oxidação parcial do analito e separação dos produtos da reação que fornecem informações adicionais como: número de espécies formadas, relação entre as áreas das espécies formadas e espectro de cada uma das espécies.

Pôde-se verificar que os produtos formados após a oxidação utilizando reação de Fenton (dados para riboflavina e cianocobalamina) são os mesmos que quando da clivagem da molécula utilizando-se CL com detector de espectrometria de massas (conforme consulta à literatura), confirmando mais uma vez que, a identificação do composto através da impressão digital oxidativa da molécula, gerada após a segunda separação cromatográfica, utilizando espectros de um detector UV/Vis fornecem um conjunto de dados que permite identificar o analito que foi eluído da coluna cromatográfica, sendo que esta nova modalidade cromatográfica é viável e apresenta custo bem menor do que quando se utiliza Espectrômetro de Massas ou de Ressonância Magnética Nuclear.

## 7. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2007, p. 17-29, 273, 301, 367-370, 373, 384, 385.
- <sup>2</sup> LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009, p. 11-31, 96-124, 251-269, 301.
- <sup>3</sup> MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. **VOGEL: Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008, p. 265-271, 317-321, 400-401, 422-424.
- <sup>4</sup> SIDELMANN, U. G.; BJORNSDOTTIR, I.; SHOCKCOR, J. P.; HANSEN, S. H.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-MS approaches for the rapid characterisation of drug metabolites in urine: application to the human metabolism of naproxen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 569-570, 2001.
- <sup>5</sup> MIN CAI; YAN ZHOU; SUOLANG, G.; CIREN, B.; LI-SHENG, D. Chemical fingerprint analysis of rhizomes of *Gymnadenia conopsea* by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 301, 2006.
- <sup>6</sup> DERBALAH, A. S.; NAKATANI, N.; SAKUGAWA, H. Photocatalytic removal of fenitrothion in pure and natural waters by photo-Fenton reaction. **Chemosphere**, v. 57, p. 636, 2004.
- <sup>7</sup> NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. 98, p. 34-37, 2003.
- <sup>8</sup> GOSETTI, F.; GIANOTTI, V.; POLATI, S.; GENNARO, M. C. HPLC-MS degradation study of E110 Sunset Yellow FCF in a commercial beverage. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, p. 108-109, 2005.
- <sup>9</sup> KUNZ, A.; PERALTA, Z. P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 80-81, 2002.
- <sup>10</sup> PERA T. M.; GARCIA, M. V.; BANOS, M. A.; GIMENEZ, J.; ESPLUGAS, S. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation process: a general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 47, p. 221-225, 232-237, 2004.
- <sup>11</sup> GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. A review of imperative technologies for waste water treatment II: hybrid methods. **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 553-554, 2004.

- <sup>12</sup> ROCHA, F. R. P.; MARTELI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119-120, 2000.
- <sup>13</sup> MASSINI, J. C. Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da análise por injeção sequencial. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.704-705, 2008.
- <sup>14</sup> ECONOMOU, A. Sequential injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, no. 5, p. 416-422, 2005.
- <sup>15</sup> SCOTT, R. P. W. *Techniques and Practise of Chromatography*. Nova Iorque: Marcel Dekker, v. 70, 1995, p. 3-4.
- <sup>16</sup> DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 21, 1998.
- <sup>17</sup> ROW, K. H. Comparison of retention models for the dependence of retention factors on mobile phase composition in reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 797, p. 23-24, 1998.
- <sup>18</sup> BRYANT, C. H.; ADAM, A.; TAYLOR, D. R.; ROWE, R. C. A review of expert systems for chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 297, 1994, p. 317-347.
- <sup>19</sup> PAIXAO, J. A.; STAMFORD, T. L. M. Vitaminas lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 101-102, 2004.
- <sup>20</sup> JANDERA, P.; KOMERS, D.; GUIOCHON G. Effects of the composition of the mobile phase on the production rate in reversed-phase overloaded chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 787, p. 13-14, 1997.
- <sup>21</sup> NIKITAS, P.; PAPPALOUISI, A.; AGRAFIOTOU, P.; FASOULA, S. Simple models for the effect of aliphatic alcohol additives on the retention in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3616–3617, 2011.
- <sup>22</sup> QUIGLEY, W. W. C.; ECKER, S. T.; VAHEY, P. G.; SYNOVEC, R. E. Reversed phase liquid chromatography with UV absorbance and flame ionization detection using a water mobile phase and a cyano propyl stationary phase. Analysis of alcohols and chlorinated hydrocarbons. **Talanta**, v. 50, p. 570, 1999.
- <sup>23</sup> ESMANS, E. L.; BROES, D.; HOES, I.; LEMIERE, F.; VANHOUTTE, K. Liquid chromatography–mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization. **Journal of Chromatography A**, v. 794, p.109–110, 1998.

- <sup>24</sup> SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012, p.123-125.
- <sup>25</sup> SCHNEIDER, B. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in biosynthetic studies. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 51, p. 156–157, 2007.
- <sup>26</sup> TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises Quali e Quantitativa de Café Comerciais via Ressonância Magnética Nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 911, 2006.
- <sup>27</sup> LARSENA, J.; STAERKB, D.; CORNETT, C.; HANSENA, S. H.; JAROSZEWSKI, J. W. Identification of reaction products between drug substances and excipients by HPLC–SPE–NMR: Ester and amide formation between citric acid and 5-aminosalicylic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 839, 2009.
- <sup>28</sup> CORCORAN, O.; SPRAUL, M.; HOFMANN, M.; ISMAIL, I. M.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. 750 MHz HPLC-NMR spectroscopic identification of rat microsomal metabolites of phenoxy pyridines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 481, 1997.
- <sup>29</sup> STAERK, D.; KESTING J. R.; SAIRAFIANPOUR, M.; WITT, M.; ASILI, J.; EMAMI, S. A.; JAROSZEWSKI, J. W. Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1055, 2009.
- <sup>30</sup> DONG-ZHI, Y.; YI-QIANG, A.; XIANG-LAN, J.; DAO-QUAN, T.; YUAN-YUAN, G.; HONG-TAO, Z.; XIAO-WEN, W. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional chinese medicine preparation. **Talanta**, v. 85, p. 885–886, 2011.
- <sup>31</sup> TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; CHATAIGNE, G.; RIVIERE, C.; NGUYEN HOAI, N.; CHAU VAN, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; VANDER HEYDEN, Y. Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part II: Fingerprint alignment, data analysis and peak identification. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 35, 2012.
- <sup>32</sup> SUN, J. H.; SUN, S. P.; FAN, M. H.; GUO, H. Q.; LEE, Y. F.; SUN, R. X. Oxidative decomposition of p-nitroaniline in water by solar photo-Fenton advanced oxidation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 187–188, 2008.
- <sup>33</sup> OLLER, I.; MALATO, S.; SANCHEZ-PEREZ, J. A. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination: a review. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 414–4166, 2011.

- <sup>34</sup> STASINAKIS, A. S. Use of Selected Advanced Oxidation Processes (AOPs) for Wastewater Treatment: a mini review. **Global NEST Journal**, v. 10, no. 3, p. 376-385, 2008.
- <sup>35</sup> SCHRANK, S.G.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F. P. M.; SCHÖDER, H. F. R.; Elucidation of the behavior of tannery wastewater under advanced oxidation conditions. **Chemosphere**, v. 56, p. 411–412, 2004.
- <sup>36</sup> TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos oxidativos avançados: conceitos teóricos**. Caderno Temático. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, v. 3, 2004, p. 83.
- <sup>37</sup> GOI, A.; TRAPID, M. Hydrogen peroxide photolysis, Fenton reagent and photo-Fenton for the degradation of nitrophenols: a comparative study. **Chemosphere**, v. 46, p. 913-914, 2002.
- <sup>38</sup> ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v. 53, p. 51-56, 1999.
- <sup>39</sup> NOGUEIRA, R. F. P.; TROVO, A. G.; SILVA, M. R.; VILLA, R. D.; OLIVEIRA, M. C. Fundamentos e Aplicações dos processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 401-403, 2007.
- <sup>40</sup> NOGUEIRA, F. P.; JARDIM, W. F. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 69-70, 1998.
- <sup>41</sup> TOOR, A. P.; VERMA, A.; JOTSHI, C. K.; BAJPAI P. K.; SINGH, V. Photocatalytic degradation of Direct Yellow 12 dye using UV/TiO<sub>2</sub> in a shallow pond slurry reactor. **Dyes and Pigments**, v. 68, p. 54-58, 2006.
- <sup>42</sup> MURUGANANDHAM, M.; SWAMINATHAN, M. Decolourisation of Reactive Orange 4 by Fenton and photo-Fenton oxidation technology. **Dyes and Pigments**, v. 63, p. 316-319, 2004.
- <sup>43</sup> PEREZ, M.; TORRADES, F.; DOMENECH, X.; PERAL. J. Fenton and photo-Fenton oxidation of textile effluents. **Water Research**, v. 36, p. 2704–2705, 2002.
- <sup>44</sup> KANG, Y. W.; HWANG, K. Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process. **Water Research**, v. 34, no. 10, p. 2786–2787, 2000.
- <sup>45</sup> RATHI, A.; RAJOR, H. K.; SHARMA, R. K. Photodegradation of direct yellow-12 using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>. **Journal of Hazardous Materials**, v. B102, p.231-232, 2003.

- <sup>46</sup> BAHAMON, L. F. G.; MAZILLE, F.; BENITEZ, L. N.; PULGARIN, C. Photo-Fenton degradation of resorcinol mediated by catalysts based on iron species supported on polymers. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 217, p. 201, 2011.
- <sup>47</sup> KATSUMATA, H.; SADA, M.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; OHTA, K.; YOBIKO, Y. Humic acid degradation in aqueous solution by the photo-Fenton process. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 225–227, 2008.
- <sup>48</sup> SANTOS, A. C. V.; MASINI, J. C. A análise por injeção sequencial (SIA): vinte anos em uma perspectiva brasileira. **Química Nova**, v. 33, n. 9, 1949-1950, 2010.
- <sup>49</sup> MARSHALL, G.; WOLCOTT, D.; OLSON, D. Zone fluidics in flow analysis: potentialities and applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p. 29–30, 2003.
- <sup>50</sup> ARRUDA, M. A. Z.; COLLINS, C. H. Informações essenciais para a caracterização de um sistema de análise em fluxo. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 739-740, 2005.
- <sup>51</sup> HANSEN, E. H.; MIRO, M. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, no. 1, p. 18-19, 2007.
- <sup>52</sup> LENARDAO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C.; SILVEIRA, C. C. “Green Chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123, 2003.
- <sup>53</sup> OLIVEIRA, C. C.; SARTINI, R. P.; ZAGATTO, E. A. G. Microwave-assisted sample preparation in sequential injection: spectrophotometric determination of magnesium, calcium and iron in food. **Analytica Chimica Acta**, v. 413, p. 41–42, 2000.
- <sup>54</sup> BARNETT, N. W.; LENEHAN, C. E.; LEWIS, S. W. Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, no. 5, p. 347-348, 1999.
- <sup>55</sup> HUCLOVA, J.; SATINSKY, D.; PAVLICEK, O.; VEDRALOVA, L.; KARLICEK R. Using on-line solid phase extraction for determination of amiloride in human urine by sequential injection technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 573–574, p. 376-378, 2006.
- <sup>56</sup> BIDARI, A.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; HOSSEINI, M. R. M.; ASSADI, Y. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1840, 2011.
- <sup>57</sup> BRONDI, S. H. G.; LANÇAS, F. M. Development and Validation of a Multi-Residue Analytical Methodology to Determine the Presence of Selected Pesticides in Water

- Through Liquid Chromatography. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, no. 3B, p. 650-651, 2005.
- <sup>58</sup> SHAMSIPURA, M.; HASSANB, J. A novel miniaturized homogenous liquid-liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4878, 2010.
- <sup>59</sup> PICO, Y.; FERNANDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 118-119, 2007.
- <sup>60</sup> CHIYANG, H.; YUANYUAN, L.; JUNLAN, P.; KEAN, L.; FENG, L. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 136, 2007.
- <sup>61</sup> EL-SHAHATA, M. F.; BURHAMB, N.; ABDEL AZEEMB, S.M. Flow injection analysis-solid phase extraction (FIA-SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 1054-1055, 2010.
- <sup>62</sup> CANEVAROLO, S. V. J. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007, p. 209-261.
- <sup>63</sup> OZAWA, T. Thermal analysis: review and prospect. **Thermochimica Acta**, v. 355, p. 35-36, 2000.
- <sup>64</sup> CASTELLO, M. L. **Estudo da glicerina por Análises Térmicas**, Dissertação de Mestrado Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009, p. 16-20.
- <sup>65</sup> FUENTE, J. L.; BERMEJO, M. R.; SALVAN, C. M.; ESTEBAN, S. O. Thermal characterization of HCN polymers by TG-MS, TG, DTA and DSC methods. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 943, 2011.
- <sup>66</sup> SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 347-349, 2007.
- <sup>67</sup> BALL, G. F. M. **Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability**. London: CRC Press, 2006, p. 165-168, 276-278.
- <sup>68</sup> PHILLIPS, D. A.; JOSEPH, C. M.; YANG, G. P.; ROMERO, E. M.; SANBORN, J. R.; VOLPIN, H. Identification of lumichrome as a Sinorhizobium enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. **PNAS**, v. 96, no. 22, p.12277-12279, 1999.

- <sup>69</sup> PENZKOFER, A.; TYAGI, A.; KIERMAIER, J. Room temperature hydrolysis of lumiflavin in alkaline aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 217, p. 369–372, 2011.
- <sup>70</sup> CARKEET, C.; DUEKER, S. R.; LANGO, J.; BUCHHOLZ, B. A.; MILLER, J. W.; GREEN, R.; HAMMOCK, B. D.; ROTH, J. R.; ANDERSON, P. J. Human vitamin B12 absorption measurement by accelerator mass spectrometry using specifically labeled <sup>14</sup>C-cobalamin. **PNAS**, v. 103, no.15, p.5694-5697, 2006.