



Cabrini Ferraz de Souza

**Desenvolvimento de métodos baseados na
eletroforese capilar com diferentes abordagens de
detecção para determinação de organoestanhos,
estrobilurinas e aminoglicosídeos**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Química do Departamento de
Química da PUC-Rio.

Orientador: Ricardo Queiroz Aucelio

Rio de Janeiro
Setembro de 2013



Cabrini Ferraz de Souza

Desenvolvimento de métodos baseados na eletroforese capilar com diferentes abordagens de detecção para determinação de organoestanhos, estrobilurinas e aminoglicosídeos

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Ricardo Queiroz Aucelio

Orientador
Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Ricardo Jorgensen Cassella

UFF

Prof. Marcone Augusto Leal de Oliveira

UFJF

Profa. Flávia F. de C. Marques

UFF

Profa. Aurora Pérez Gramatges

UFRJ

Profa. Fatima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química - PUC-Rio

Profa. Tatiana Dillenburg Saint'Pierre

Departamento de Química - PUC-Rio

José Eugenio Leal

Coordenador(a) Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 30 de Setembro de 2013

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Cabrini Ferraz de Souza

Mestre em Química, com área de concentração em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro em 2008. Graduiu-se em Química, licenciatura e bacharel, na Universidade Federal de Juiz de Fora em 2006. Trabalha na CPRM – Serviço Geológico do Brasil desde 2010.

Ficha Catalográfica

Souza, Cabrini Ferraz de

Desenvolvimento de métodos baseados na eletroforese capilar com diferentes abordagens de detecção para determinação de organoestanhos, estrobilurinas e aminoglicosídeos / Cabrini Ferraz de Souza; orientador: Ricardo Queiroz Aucelio. – 2013.

264 f.: il. (color.); 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2013.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Eletroforese capilar. 3. Estrobilurinas. 4. Aminoglicosídeos. 5. Organoestanhos. 6. Pontos quânticos. 7. Fluorescência induzida por laser. 8. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. I. Aucelio, Ricardo Queiroz. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

À minha família, em especial minha Mãe,
pelo exemplo de força e coragem.

Ao meu marido, Nilson, pelo carinho, paciência,
apoio e parceria durante toda a minha vida acadêmica.

Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus por mais uma conquista.

Ao meu orientador e professor, Ricardo Queiroz Aucelio, pela oportunidade, paciência e orientação durante a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora.

A todos os professores do Departamento de Química da PUC-Rio que contribuíram para o aumento do meu conhecimento na área acadêmica.

A secretária da pós-graduação, Fátima, pela ajuda nas questões burocráticas e pela atenção.

Aos pesquisadores e técnicos do LEEA, Alessandra, Adriana, Andrea, Sônia, Paulo, Leila, Junior, Anastácia e Vanessa, pelas colaborações e pelos trabalhos realizados, que mesmo de forma indireta, contruíram para realização deste trabalho.

Aos amigos e alunos da pós-graduação do LEEA, Juliana, Eliane, Helen, Ana Catalina, Rafael, Mônica, Ana Paula e em especial ao grande amigo Sarzamin, a amizade e o companherismo de vocês fizeram toda a diferença.

Aos professores, técnicos e alunos do LABSPECTRO, Tatiana, Roberta, Álvaro e Rafael, pelas orientações e ajuda na utilização do ICP-MS.

Aos amigos e à chefe do LAMIN – CPRM, Maria Alice, pelo carinho ao me

receber e também pelo apoio e a paciência que tiveram comigo durante o desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Agradeço especialmente à minha amiga Ana Barandas, pela amizade, pela compreensão e por ter segurado as pontas quando precisei.

Ao meu marido, Nilson, por ter sido companheiro, fiel em todos os momentos difíceis. Sua presença ao meu lado por todo esse tempo foi muito importante e especial e continuará sendo por toda a vida.

Ao CNPq e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

“Adquire sabedoria, adquiere inteligência, e não te esqueças
nem te apartes das palavras da minha boca.
Não a abandones e ela te guardará; ama-a, e ela te protegerá.
A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria,
emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento.
Exalta-a, e ela te exaltará; e, abraçando-a tu, ela te honrará.
Dará à tua cabeça um diadema de graça e
uma coroa de glória te entregará”
Provérbios 4: 5-9

Resumo

Souza, Cabrini Ferraz de; Aucelio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento de métodos baseados na eletroforese capilar com diferentes abordagens de detecção para determinação de organoestanhos, estrobilurinas e aminoglicosídeos.** Rio de Janeiro, 2013. 264 p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Neste trabalho, métodos baseados em diferentes abordagens em eletroforese capilar (CE) foram propostos. No caso da determinação de compostos organoestanhos ou OTs (difenilestanho e monofenilestanho) em fluidos biológicos, foi usada abordagem de eletroforese capilar por zona (CZE) hifenada com a espectrometria de massas (do tipo quadrupolo) com fonte de plasma indutivamente acoplado (CE-ICP-MS). As condições de análise foram estudadas no modo univariado visando otimizar a composição da solução eletrolítica (tampão acetato 5,0 mmol L⁻¹, pH 2,8) e obter os parâmetros instrumentais (45°C, +30 kV e 30 s de tempo de introdução hidrodinâmica de amostra). A solução de complementação foi uma solução aquosa 5,0 mmol L⁻¹ de NH₄NO₃ contendo 10% metanol em volume e 1,0 µg L⁻¹ de Cs⁺, com pH ajustado para 2,8 com tampão acetato. A vazão dessa solução foi mantida em 40 µL min⁻¹. Os OTs foram diluídos em solução de metanol:tampão acetato de sódio 50:50% v/v ou apenas em tampão acetato de sódio pH 2,8. As condições de detecção do ICP-MS foram ajustadas em 1200 W, 15 L min⁻¹ de vazão de argônio para formação do plasma, 1 L min⁻¹ de vazão de argônio auxiliar. A vazão de argônio do nebulizador foi ajustada diariamente. Os isótopos de estanho ¹²⁰Sn e ¹¹⁸Sn foram monitorados, assim como o ¹³³Cs⁺ para controlar a eficiência e estabilidade do processo de nebulização. A resposta linear do método ficou entre 0,050 a 2,0 mg L⁻¹ de Sn (0,42 a 17 µmol L⁻¹). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) em termos de Sn foram de 15 µg L⁻¹ (0,13 µmol L⁻¹) e 50 µg L⁻¹ (0,42 µmol L⁻¹), calculados utilizando a menor concentração dos picos dos analitos que podem ser diferenciados do sinal de fundo. A repetibilidade para o tempo de migração e área dos picos ficou próximo a 5%. O método foi aplicado na análise de urina, sangue total e plasma fortificados com os OTs. Recuperações entre 75 e 95% foram obtidas. No caso da determinação de sete pesticidas da classe das estrobilurinas (azoxistrobina,

dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina e kresoxim-metil) em sopas infantis, foi usada a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC) com detecção fotométrica (no UV) com capilar de caminho óptico estendido. Um estudo multivariado, usando um planejamento 3^3 Box Behnken, indicou que a melhor separação para os pesticidas foi com solução aquosa de eletrólito composto por tampão tetraborato de sódio ($5,1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 9,0) contendo 51 mmol L^{-1} de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 24% acetonitrila (ACN) em volume. As condições instrumentais foram $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $+30 \text{ kV}$ de diferença de potencial aplicada, 45 s de tempo de introdução hidrodinâmica de amostra e detecção em 210 nm. Para aumentar o poder de detecção, foi usada a concentração dos analitos no capilar. Para tal, as soluções de padrões e amostras foram dissolvidas em solução tampão tetraborato de sódio 45 mmol L^{-1} : acetonitrila 80:20% v/v. As curvas analíticas apresentaram comportamento linear e os valores de LOD ficaram entre $7,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ou 18 nmol L^{-1} (piraclostrobina) a $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ou 33 nmol L^{-1} (fluoxastrobina). Os valores de LOQ ficaram entre $21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ou 54 nmol L^{-1} (piraclostrobina) a $45 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ou 98 nmol L^{-1} (fluoxastrobina). A repetibilidade ficou entre 1,7 a 7,9% para a área de pico e entre 0,25 a 0,71% para o tempo de migração. A precisão intermediária, avaliada com análises realizadas em diferentes dias, apresentou valores entre 1,3 a 5,3 % para a área de pico e entre 0,06 a 0,90% para o tempo de migração. O método foi aplicado na análise de sopas prontas infantis fortificadas com as estrobilurinas. Os pesticidas foram extraídos aplicando o método QuEChERS com ajuste de pH com tampão acetato e limpeza com extração em fase sólida dispersiva. Os resultados das análises obtidos com um método cromatográfico adaptado da literatura foram estatisticamente iguais aos alcançados com o método proposto. A CZE foi o modo de separação escolhido para mostrar o potencial da determinação indireta de aminoglicosídeos com medição de fluorescência de pontos quânticos (excitação com laser de diodo em 410 nm) amplificada na presença dos analitos. A fotoluminescência dos pontos quânticos (nanopartículas de CdTe modificados com ácido tioglicólico monodispersas em solução) foi mais intensa em solução tampão (pH 8,0) contendo entre 5 e 10 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio. A interação no capilar entre aminoglicosídeos (neomicina e canamicina) e os pontos quânticos provocou aumento de fotoluminescência dependente do pH do meio (indício de interação de natureza

eletrostática). Alguns parâmetros de mérito foram avaliados com uma faixa linear curta (0,1 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para canamicina e 0,03 a 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para neomicina). Os valores mínimos detectados de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 58 $\mu\text{g L}^{-1}$ (canamicina) e 0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ou 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ (neomicina) mostram que essa é uma abordagem interessante para a determinação sensível de aminoglicosídeos.

Palavras-chave

Eletroforese capilar; Estrobilurinas; Aminoglicosídeos; Organoestanhos; Pontos quânticos; Fluorescência induzida por laser; Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado.

Abstract

Souza, Cabrini Ferraz de; Aucelio, Ricardo Queiroz (Advisor). **Development of capillary electrophoresis based methods with different detection approaches for determination of organotins, strobilurins and aminoglycosides.** Rio de Janeiro, 2013. 264 p. Doctoral Thesis – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

In this work, analytical methods based on different approaches using capillary electrophoresis (CE) have been proposed. For the determination of organotins or OTs (diphenyltin and monophenyltin) in biological fluids, the separation using capillary zone electrophoresis (CZE) was applied using tandem with inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS). The conditions for the analysis were optimized in an unvaried way aiming to find the conditions for the electrolyte solution (acetate buffer, 5.0 mmol L⁻¹, pH 2.8) and the employed instrumental parameters (45°C, 30 kV and 30 s of the time for hydrodynamic introduction of the sample). A complementary solution was composed by NH₄NO₃ (5.0 mmol L⁻¹), 10% v/v of methanol and 1.0 g L⁻¹ of Cs⁺ in acetate buffer with pH adjusted to 2.8. The flow of this solution was set to 40 μL min⁻¹. The OTs were diluted either in a methanol: acetate buffer 50:50% v/v solution or only in sodium acetate buffer pH 2.8. The conditions for detection by ICP-MS were set to 1200 W, 15 L min⁻¹ for the Ar plasma flow and 1,0 L min⁻¹ for the auxiliary Ar. The nebulizer Ar flow was adjusted daily. The monitored tin isotopes were ¹²⁰Sn ¹¹⁸Sn. The isotope ¹³³Cs was also monitored in order to control the efficiency and stability of the nebulization. The method presented a linear response between 0.05 and 2.0 mg L⁻¹ (0.42 a 17 μmol L⁻¹) for Sn. The value for the limits of detection (LOD) and for the limits of quantification (LOQ) for Sn were 15 μg L⁻¹ (0.13 μmol L⁻¹) e 50 μg L⁻¹ (0.42 μmol L⁻¹), calculated based on the lowest concentration of the analyte peaks that can be differentiated from the background signal. The repeatability for migration time and peak area was approximately 5%. The method was applied in the analysis of organotin fortified blood and urine samples with recoveries between 75 and 95%. In the case of the determination of seven strobilurin class pesticides (azoxystrobin, dimoxystrobin, fluoxastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin and kresoxim-methyl) in baby food (vegetable and fruit soups),

the micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) was used using photometric detection (UV) in a capillary with extended optical path. A multivariate study, with 3^3 Box Behnken design, indicated the best composition for the electrolytic solution to separate the seven pesticides: a sodium tetraborate buffer (5.1 mmol L^{-1} , pH 9.0) solution containing 51 mmol L^{-1} sodium dodecyl sulfate and acetonitrile (24% in volume). The instrumental conditions were 25°C , 30 kV of applied voltage, 45 s for hydrodynamic introduction of the sample and detection at 210 nm. To increase the detection power, the concentration of the analytes into the capillary was used by using the Normal Stacking Mode. For this purpose, the solutions of standards and samples were prepared in 45 mmol L^{-1} sodium tetraborate buffer solution: acetonitrile 80:20% v/v. The analytical curves presented a linear behavior and the LOD values were between $7.0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ or 18 nmol L^{-1} (pyraclostrobin) to $15 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ or 33 nmol L^{-1} (fluoxastrobin). The LOQ values were between $21 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ or 54 nmol L^{-1} (pyraclostrobin) a $45 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ou 98 nmol L^{-1} (fluoxastrobin). The repeatability was between 1.7 to 7.9% for the peak area and between 0.25 to 0.71% for the migration time. The intermediate precision, evaluated by the analysis performed in different days were between 1.3 to 5.3 % for the peak area and between 0.06 and 0.90% for the migration time. The method was applied in the analysis of baby food spiked with strobilurin. Pesticides were extracted using the QuEChERS method with pH adjustment with acetate buffer and clean-up using the dispersive solid phase extraction. The analysis results were statistically identical to those obtained with a chromatographic method adapted from the literature. The CZE separation mode was chosen to evaluate the potential of the indirect determination of aminoglycosides through the amplified photoluminescence from quantum dots (excitation laser diode 410 nm) in the presence of the analytes. The photoluminescence from quantum dots (monodispersed CdTe nanoparticles modified with thioglycolic acid) was more intense in buffer solution (pH 8.0) containing between 5 and 10 mmol L^{-1} sodium tetraborate. The interaction between aminoglycosides (kanamycin and neomycin) and quantum dots inside the capillary caused the increasing of fluorescence in a pH-dependent way (indicating the electrostatic nature for the interaction). A few figures of merit were evaluated with a short linear range (0.1 to $1.0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ for kanamycin and 0.03 to $0.5 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ for neomycin). The

minimum values detected were 0.1 nmol L^{-1} or $58 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (kanamycin) and 0.03 nmol L^{-1} or $27 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (neomycin) showing that the proposed approach can be used to detect aminoglycosides in a relatively sensitive way.

Keywords

Capillary electrophoresis; Strobilurins; Aminoglycosides; Organotins; Quantum dots; Laser induced fluorescence; Inductively coupled plasma mass spectrometry.

Sumário

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | Introdução | 32 |
| 1.1. | Agrotóxicos | 32 |
| 1.1.1. | Estrobilurinas | 35 |
| 1.1.1.1. | Métodos analíticos para determinação de estrobilurinas | 39 |
| 1.1.1.2. | O método QuEChERS | 44 |
| 1.1.2. | Compostos Organoestanhos | 48 |
| 1.1.2.1. | Métodos analíticos para determinação de organoestanhos | 50 |
| 1.2. | Medicamentos de uso veterinário | 56 |
| 1.2.1. | Aminoglicosídeos | 57 |
| 1.2.1.1. | Métodos analíticos para determinação de aminoglicosídeos | 60 |
| 1.3. | Objetivos | 62 |
| 1.3.1. | Objetivos específicos | 63 |
| 2 | Eletroforese Capilar | 65 |
| 2.1. | Instrumentação | 66 |
| 2.2. | Fundamentos teóricos | 67 |
| 2.2.1. | Fluxo eletrosmótico | 67 |
| 2.2.2. | Mobilidade Eletrosmótica | 68 |
| 2.2.3. | Mobilidade Eletroforética | 70 |
| 2.2.4. | Mobilidade Efetiva | 72 |
| 2.2.5. | Introdução de amostras | 73 |
| 2.3. | Métodos de Separação | 74 |
| 2.3.1. | Eletroforese Capilar de Zona (CZE) | 75 |
| 2.3.1.1. | Eletrólito (Solução tampão) | 77 |
| 2.3.1.2. | Aditivos | 78 |
| 2.3.2. | Cromatografia eletrocinética micelar capilar (MEKC) | 78 |
| 2.3.2.1. | Micelas | 80 |
| 2.3.2.2. | Migração em MEKC | 80 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.3. Concentração dos analitos no capilar | 85 |
| 2.3.4. Detecção em CE | 87 |
| 2.3.4.1. Absorção no UV-Vis | 87 |
| 2.3.4.2. Fluorescência | 88 |
| 2.3.4.3. Semicondutores nanocristais | 90 |
| 2.3.4.4. Eletroforese capilar acoplada ao ICP-MS | 96 |
| | |
| 3 Materiais e Métodos | 100 |
| 3.1. Reagentes e Materiais | 100 |
| 3.2. Equipamentos | 101 |
| 3.2.1. Eletroforese Capilar | 101 |
| 3.2.2. ICP-MS e acessório para o acoplamento com CE | 102 |
| 3.2.3. Equipamentos Auxiliares | 103 |
| 3.3. Determinação de organoestanhos | 104 |
| 3.3.1. Procedimentos para CZE em CE-ICP-MS | 104 |
| 3.3.2. Soluções para CE-ICP-MS | 105 |
| 3.3.3. Preparação das amostras analisadas por CE-ICP-MS | 105 |
| 3.4. Determinação de estrobilurinas | 106 |
| 3.4.1. Procedimentos para cromatografia eletrocinética micelar capilar (MEKC) | 106 |
| 3.4.2. Soluções para os experimentos com MEKC | 107 |
| 3.4.3. Preparo das amostras analisadas por MEKC | 108 |
| 3.5. Determinação de aminoglicosídeos | 110 |
| 3.5.1. Nanopartículas TGA-CdTe | 110 |
| 3.5.2. Procedimentos para CE-LIF | 110 |
| 3.5.3. Soluções para os experimentos com CE-LIF | 111 |
| 3.6. Validação | 112 |
| 3.7. Parâmetros analíticos de mérito (PAM) | 112 |
| 3.7.1. Resposta Linear | 112 |
| 3.7.2. Limites de detecção e quantificação | 114 |
| 3.7.3. Precisão | 115 |
| 3.7.3.1. Repetibilidade | 115 |
| 3.7.3.2. Precisão Intermediária | 116 |
| 3.7.4. Exatidão | 116 |

| | |
|---|-----|
| 3.8. Incertezas | 117 |
| 4 Estudo para determinação dos organoestanhos por CE-ICP-MS | 125 |
| 4.1. Otimização das condições de separação eletroforética | 125 |
| 4.2. Ajuste final de condições para separação do trifenilestanho e do difenilestanho por CZE | 135 |
| 4.3. Parâmetros de mérito | 142 |
| 4.3.1. Resposta linear | 142 |
| 4.3.2. Limite de detecção e de quantificação instrumental | 145 |
| 4.3.3. Repetibilidade | 146 |
| 4.3.4. Precisão Intermediária | 147 |
| 4.3.5. Exatidão | 148 |
| 4.3.5.1. Preparo das amostras de urina e sangue | 148 |
| 4.4. Incertezas | 154 |
| 5 Determinação de estrobilurinas por MEKC com detecção por fotometria de absorção molecular | 156 |
| 5.1. Ajuste da condição de separação das estrobilurinas: planejamento experimental | 156 |
| 5.2. Concentração dos analitos no capilar | 186 |
| 5.3. Parâmetros de mérito | 193 |
| 5.3.1. Resposta Linear | 193 |
| 5.3.2. Limite de detecção e limite de quantificação | 197 |
| 5.3.3. Repetibilidade | 198 |
| 5.3.4. Precisão Intermediária | 199 |
| 5.4. Exatidão | 200 |
| 5.4.1. Preparo das amostras de sopas prontas infantis | 200 |
| 5.5. Incertezas | 211 |
| 6 Determinação de aminoglicosídeos por CE-LIF após interações com nanopartículas de CdTe modificadas com ácido tioglicólico | 213 |
| 6.1. Características das nanopartículas de TGA-CdTe . | 213 |
| 6.2. Comportamento das nanopartículas de TGA-CdTe e interações com aminoglicosídeos em condições de eletroforese | |

| | |
|--|-----|
| capilar. | 215 |
| 6.3. Interação entre os demais aminoglicosídeos e as nanopartículas TGA-CdTe | 224 |
| 6.4. Parâmetros de mérito | 229 |
| 6.4.1. Resposta linear | 229 |
| 6.4.2. Limite de detecção de limite de quantificação | 233 |
| 6.4.3. Precisão | 234 |
| 7 Conclusões | 236 |
| 8 Referências | 238 |

Lista de figuras

- Figura 1: Estrutura dos pesticidas estrobilurinas naturais (adaptado ref.). 36
- Figura 2: Estrutura das estrobilurinas: (a) azoxistrobina (metil-(E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxy)pirimidina-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato); (b) dimoxistrobina ((E)-2-(metoxiamino)-N-metil-2-[a-(2,5 - xililoxi)-o-tolil]acetamida); (c) kresoxim-metil (metil (E)-metoxiimino[α-(o-toliloxi)-o-tolil]acetato); (d) picoxistrobina (metil (E)-3-metoxi-2-{2-[6-(trifluorometil)-2-piridiloximetil]fenil}acrilato); (e) fluoxastrobina (E-{2-[6-(2-clorofenoxy)-5-fluoropirimidina-4-iloxi]fenil}(5,6-didro-1,4,2-clorofenoxy)-5-fluoropirimidina-4-iloxi]fenil (5,6-dihidro-1,4,2-dioxazin-3-il)metanoneO-metiloxine; (f) piraclostrobina (metil{2-[1-(4-clorofenil)pirazol-3-iloximetil]fenil}(metoxi)carbamato; e (g) trifloxistrobina (metil(E)-metoximino-{(E)-α-[1[(α,α,α-trifluoro-m-tolil)etilideneaminoxio-o-tolil]acetato. 37
- Figura 3: Fluxograma representativo do método QuEChERS original. 45
- Figura 4: Estrutura química de três fenilestanho. 49
- Figura 5: Estrutura dos aminoglicosídeos: (a) canamicina, (b) gentamicina, (c) amicacina, (d) tombramicina,(e) estreptomomicina e (f) neomicina. 59
- Figura 6: Esquema de um instrumento para eletroforese capilar. E: eletrodo (adaptado da ref. 116). 66
- Figura 7: Esquema da dupla camada elétrica no capilar. 68
- Figura 8: Representação esquemática de um eletroferograma de uma solução com analitos neutros e iônicos de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva. 72
- Figura 9: Esquema representativo da separação por CZE, N = analitos neutros (adaptado ref. 116). 77
- Figura 10: Esquema representativo da separação por MEKC usando micelas aniônicas (adaptado da ref.¹¹⁶). 79

- Figura 11: Esquema de um eletroferograma mostrando a janela de eluição em MEKC¹¹⁶. 81
- Figura 12: Diagrama esquemático de um arranjo de spin nos orbitais moleculares. 89
- Figura 13: Esquema da excitação e emissão dos nanocristais com camadas de energia típico da estrutura de semicondutores. V_B é a camada de valência, C_B é a camada de condução, ΔE é o deslocamento de Stokes, E_g é a energia do *band gap*, E_{ex} é a energia de excitação e $E_{em 0-4}$ são as energias de emissão. 93
- Figura 14: Esquema de um ICP-MS (A) e o filtro de massa quadrupolo (B). 98
- Figura 15: Acoplamento CE-ICP-MS. (1) Entrada do capilar no nebulizador, (2) Eletrodo, (3) Entrada de argônio, (4) Câmara de nebulização, (5) Entrada para o equipamento ICP-MS. 103
- Figura 16: Fluxograma do procedimento utilizado para extração dos pesticidas pelo método QuEChERS. 109
- Figura 17: Diagrama de causa e efeito (*Ishikawa*) para a técnica CE. 122
- Figura 18: Análise de uma solução padrão contendo MPT, DPT e TPT (na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por CZE. Variações no preparo das soluções dos analitos: (a) água ultrapurificada, (b) metanol: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 2,81 50:50% v/v e (c) acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 2,81. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 2,81. Capilar 60 cm x $75 \mu\text{m}$ d.i., 25 kV, 25°C, injeção de 15 s a 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm. 127
- Figura 19: Análise de soluções-padrão dos OTs ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por CZE. (1) TPT, (2) DPT, (3) MPT. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} e 1 mol L^{-1} , pH 2,81. Capilar 60 cm x $75 \mu\text{m}$ d.i., 25 kV, 25°C, tempo de injeção de 15s a 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm. 128
- Figura 20: Análise de soluções padrão dos organoestanhos ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método CZE. (1) TPT e (2) MPT e DPT

Eletrólito de trabalho: acetato de sódio (10 mmol L^{-1}) com adições de diferentes concentrações de ácido acético: (a) 0,25 (pH: 3,31); (b) 0,5 (pH: 3,07), (c) 1,0 (pH: 2,81) e (d) $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,60). Capilar 60 cm x $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 25 kV, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de injeção de 15 s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm. 129

Figura 21: Estudo para avaliação da adição de solvente orgânico ao eletrólito de trabalho: (a) 10% v/v de acetonitrila, (b) 25% v/v de acetonitrila, (c) 10% de metanol, (d) 25% de metanol. (1) TPT e (2) MPT e DPT. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} e ácido acético 1 mol L^{-1}). Capilar 60 cm x $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 25 kV, 25°C , tempo de injeção de 15s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm. 131

Figura 22: Análise solução padrão dos organoestanhos ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por CZE. Variação da concentração de CTAB no eletrólito de trabalho: (a) sem CTAB, (b) adição de $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$, (c) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e (d) $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito de trabalho acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , 1 mmol L^{-1} . Capilar 60 cm x $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 25 kV, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de injeção de 15 s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm. 133

Figura 23: Eletroferogramas obtidos para os organoestanhos com o uso de 15 mmol L^{-1} do surfactante CHAPS com eletrólito: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} e 1 mol L^{-1} pH = 2,81; (a) solução com apenas MPT (3) e (b) solução com (1) TPT, (2) MPT e DPT, (3) MPT (c) solução com os três analitos e eletrólito acrescido de 10% de MeOH. Capilar 60 cm x $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 25 kV, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de injeção de 15 s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm. 134

Figura 24: Efeito da variação da diferença de potencial aplicada na separação do difenilestanho e do trifenilestanho por CZE (a) 25 kV e (b) 30 kV. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1} , pH 2,81. Capilar 60 cm x $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 45°C , tempo de injeção de 15s com pressão de 50 mbar. Detecção em 210 nm. (1) TPT e (2) DPT. 136

Figura 25: Variação da concentração do acetato de sódio no

eletrólito de trabalho (a) 5 mmol L⁻¹, (b) 10 mmol L⁻¹ e (c) 20 mmol L⁻¹ com 1 mol L⁻¹, pH 2,81. (1) TPT e (2) DPT. Capilar 60 cm x 75 µm d.i., 25 kV, 25°C, tempo de injeção de 15s. Detecção em 210 nm. Pressão de 50 mbar aplicada após 10 minutos de corrida.

136

Figura 26: Efeito da variação da temperatura na separação do difenilestanho e do trifenilestanho por CZE, (a) 45 °C, (b) 35 °C e (c) 25 °C. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 5,0 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹, pH 2,81. Capilar 60 cm x 75 µm d.i., 25 kV, 25°C, tempo de injeção de 15 s. Detecção em 210 nm. . (1) TPT e (2) DPT.

137

Figura 27: Efeito da variação do tempo de injeção (a) 10, (b) 30 e (c) 50s. Eletrólito de trabalho: tampão acetato (5,0 mmol L⁻¹, pH 2,81). Capilar 60 cm x 75 µm d.i., 45 °C, 30 kV. Detecção em 210 nm. (1) TPT e (2) DPT.

138

Figura 28: Efeito da variação de ambas, da concentração do acetato de sódio (pH 2,81) e do NH₄NO₃ presente na solução de complementação. (a) 5, (b) 10 e (c) 15 mmol L⁻¹. Solução contendo TPT (1) e DPT (2), sinal monitorado ¹²⁰Sn. (d) Sinal do ¹³³Cs. Capilar de 56 cm x 75 µm d.i., 30 kV, 45 °C.

140

Figura 29: Estudo para avaliação da presença de metanol na solução de preparo dos analitos, (a) Metanol: acetato de sódio 5 mmol L⁻¹ (pH 2,81) 50/50% v/v; (b) Tampão acetato (0,5 mmol L⁻¹, pH 2,60); (c) 100% solução aquosa. Solução contendo TPT (1) e DPT (2) e o sinal monitorado foi o ¹²⁰Sn. Capilar de 56 cm x 75 µm d.i., 30 kV, 45 °C.

141

Figura 30: Curvas analíticas e gráficos de resíduos para o TPT (A) e DPT (B).

144

Figura 31: Teste de diluição da amostra de urina. (a) fator de diluição igual a dois; (b) fator de diluição igual a cinco e (c) fator de diluição igual a dez. Condições de análise conforme Tabela 2.

149

Figura 32: Análise de uma amostra de urina, (a) amostra enriquecida com os OTs, (c) branco da amostra, (c) solução

- padrão contendo (1) TPT e (2) DPT. Condições de análise conforme Tabela 2. 150
- Figura 33: Análise de uma amostra de urina após procedimento com SPE, (a) branco da amostra (b) solução padrão contendo (1) TPT e (2) DPT, (c) amostra enriquecida com os OTs após procedimento de extração, (d) sinal do Cs⁺. Condições de análise conforme Tabela 2. 151
- Figura 34: Amostra de sangue e plasma após diluição 10 vezes com a solução eletrolítica. (a) plasma, (b) sangue e (c) solução padrão. (1) TPT e (2) DPT. 153
- Figura 35: Eletroferogramas das amostras de plasma e sangue total diluídos 50 vezes com solução eletrolítica. (a) branco plasma, (b) amostra de plasma enriquecida com os OTs, (c) branco do sangue, (d) amostra de sangue enriquecida com os OTs. (e) sinal do ¹³³Cs⁺. 153
- Figura 36: Gráfico de barras com as incertezas de cada componente nos níveis estudados. (A1) $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e (A2) $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para TPT. (B1) 1×10^{-6} mol L⁻¹ e (B2) $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para DPT. 155
- Figura 37: Espectros de absorção dos pesticidas (A) Azo, (B) Dimo, (C) Kreso, (D) Fluo, (E) Pico, (F) Pira e (G) Tri, obtidos no eletrólito de corrida. 158
- Figura 38: Eletroferogramas de um estudo univariado da variação da porcentagem de ACN no eletrólito de trabalho (a) 15%, (b) 17% e (c) 20%. Solução padrão contendo as sete estrobilurinas (1×10^{-5} mol L⁻¹). Demais condições Tabela 10. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 160
- Figura 39: Eletroferogramas variando a concentração de borato no eletrólito (a) 40, (b) 80, (c) 100 e (d) 120 mmol L⁻¹. Eletrólito com SDS em 30 mmol L⁻¹, pH 8,60 e 17% ACN. Demais condições Tabela 10. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 161
- Figura 40: Resposta das resoluções entre os pares de picos após planejamento CCD 2³. Pesticidas identificados com

| | |
|--|-----|
| números de 1 a 7. Experimentos realizados seguindo a ordem aleatória e condições da Tabela 12. Demais condições Tabela 10. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). | 164 |
| Figura 41: Resultado para o tempo de migração total para cada experimento do planejamento CCD 2 ³ . Experimentos realizados seguindo a Tabela 12. | 166 |
| Figura 42: Gráfico de Pareto indicando os efeitos estatisticamente significativos para a resolução entre os pares de picos 2 e 3 (gráfico A) e entre 4 e 5 (gráfico B). Resultado obtido pelo planejamento CCD 2 ³ . (L) dimensão linear e (Q) quadrática do efeito. | 167 |
| Figura 43: Resultado da resolução obtida após planejamento CCD 2 ² . Pesticidas identificados com números de 1 a 7. Experimentos realizados seguindo a ordem aleatória estabelecida na Tabela 14. Azo (1), Dimo (2), Kreo (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). | 169 |
| Figura 44: Resultado para o tempo de migração do último pico em cada experimento após planejamento CCD 2 ² . Experimentos realizados seguindo a Tabela 14. | 169 |
| Figura 45: Gráfico de Pareto indicando os efeitos estatisticamente significativos para o planejamento CCD 2 ² mostrando a importância dos fatores para a resolução entre os pares de picos 2 e 3 (A) e entre 3 e 4 (B). (L) dimensão linear e (Q) quadrática do efeito. | 170 |
| Figura 46: Gráfico dos resíduos para a resolução entre 2 e 3 (A) e para a resolução entre 3 e 4 (B). | 171 |
| Figura 47: Gráficos dos valores observados versus preditos para os resultados das resoluções entre os analitos 2 e 3 (A) e entre 3 e 4 (B). | 172 |
| Figura 48: Gráfico da função “desejabilidade” para o planejamento CCD 2 ² . | 174 |
| Figura 49: Eletroferogramas com as condições indicadas pelo planejamento CCD 2 ² após uso da função desejabilidade. Azo | |

| | |
|--|-----|
| (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). Eletrólito: tampão borato 40 mmol L ⁻¹ , pH 9,0, 64 mmol L ⁻¹ de SDS, 25% de ACN. Demais condições Tabela 10. | 175 |
| Figura 50: Resultado da resolução obtida após planejamento BBD 3 ³ . Pesticidas identificados com números de 1 a 5. Experimentos realizados seguindo a ordem aleatória estabelecida na Tabela 16. Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5). | 178 |
| Figura 51: Resultado para o tempo de migração do último pico (Tri) em cada experimento após planejamento BBD 3 ³ . Experimentos realizados seguindo a Tabela 16. | 179 |
| Figura 52: Gráfico de Pareto indicando as condições que afetam as resoluções entre 2 e 3 (A) e entre 3 e 4 (B). Dimo (2), Kreso (3) e Fluo (4). | 180 |
| Figura 53: Gráfico da dispersão dos resíduos (A) e gráficos dos valores previstos e valores observados (B) para a resolução entre Dimo (2) e Kreso (3). | 181 |
| Figura 54: Gráfico da dispersão dos resíduos (A) e gráficos dos valores previstos e valores observados (B) para a resolução entre Kreso (3) e Fluo (4). | 182 |
| Figura 55: Gráfico da função “desabilidade” para resolução entre os analitos e tempo total de análise. Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5) | 183 |
| Figura 56: Eletroferogramas com as condições indicadas pelo planejamento BBD 3 ³ após uso da função desejabilidade. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). Demais condições Tabela 16. | 186 |
| Figura 57: Processo de concentração dos analitos no capilar. Pesticidas preparados nos seguintes meios (7,5 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹): (a) ACN: tampão tetraborato 35 mmol L ⁻¹ 30:70 % v/v, 15 s; (b) ACN: tampão tetraborato 35 mmol L ⁻¹ 30:70 % v/v, 30 s; (c) ACN: tampão tetraborato 45 mmol L ⁻¹ 10:90 % v/v, 30 s; (d) 100% água, 30 s (e) ACN: 45 mmol L ⁻¹ tampão tetraborato 10:90 % v/v, 45 s. Pressão 50 mbar. Demais condições Tabela | |

17. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 188
- Figura 58: Otimização das condições de preparo da solução dos analitos. Variações da porcentagem de ACN na solução, (a) 10%, (b) 15%, (c) 20%, (d) 25%. Demais condições Tabela 17. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 191
- Figura 59: Otimização das condições de preparo da solução dos analitos. Variações da concentração de tetraborato de sódio, (a) 45, (b) 55 e (c) 60 mmol L⁻¹. Porcentagem de ACN constante em 20%. Demais condições Tabela 17. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 191
- Figura 60: Otimização do tempo de injeção da solução padrão no processo de concentração de analito no capilar (a) 40 s, (b) 45 s, (c) 50 s, (d) 60 s (e) 65 s com pressão de 50 mbar. Demais condições Tabela 17. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 192
- Figura 61: Resultados obtidos para área e altura dos picos dos analitos em função do tempo de introdução das soluções a 50 mbar por injeção hidrodinâmica. 192
- Figura 62: Curvas analíticas e os gráficos de resíduos dos pesticidas: azoxistrobina, dimoxistrobina, kresoxim-metil e fluoxastrobina. 195
- Figura 63: Curvas analíticas e os gráficos de resíduos para os pesticidas: picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina. 196
- Figura 64: Eletroferogramas das amostras de papinha de vegetais após procedimento de extração QuEChERS: (a) branco da amostra, (b) amostra após adição dos pesticidas, (c) padrão dos analitos com os sete pesticidas. (*) interferentes. Condições de análise ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 202
- Figura 65: Eletroferogramas das amostras de sopas infantis após procedimento de extração QuEChERS: (a) branco 270 nm, (b) amostra 270 nm, (c) padrão 270 nm, (d) padrão 210 nm, (e)

- branco 210 nm e (f) amostra 210 nm. Condições de análise ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7) 203
- Figura 66: Análise da amostra de papinha de vegetais após adição dos pesticidas e variações nas quantidades de PSA e C-18 adicionado ao extrato no processo de limpeza: (a) branco e (b) amostra após adição de 25 mg; (c) branco e (d) amostra após adição de 50 mg; (e) branco e (f) amostra após adição de 100 mg de PSA e C-18. Condições de análise ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 204
- Figura 67: Eletroferogramas de uma amostra de papinha de fruta após a adição dos pesticidas e processo de extração QuEChERS, (a) sem ajuste de pH, (b) após ajuste de pH e (c) solução padrão dos pesticidas. Demais condições ver 205
- Figura 68: Análise de uma amostra de papinha de fruta após procedimento QuEChERS com adição de ácido acético e acetato de sódio. (a) branco da amostra, (b) amostra com adição dos sete pesticidas, (c) solução padrão dos pesticidas e (*) interferentes da matriz. Demais condições ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). 206
- Figura 69: Diagrama para o procedimento de extração por QuEChERs que deve ser utilizado para extração de estrobilurinas em amostras de sopas prontas infantis. 208
- Figura 70: Cromatograma de uma amostra de sopa de vegetais após adição dos pesticidas e processo de extração e limpeza. (1) Azo, (2) Dimo, (3) Fluo, (4) Kreso, (5) Pico, (6) Pira (7) Tri e (*) interferente. Resultado medido em 210 nm. 209
- Figura 71 : Cromatograma de brancos referente a uma amostra de sopa vegetal com adições de diferentes concentrações de Pira: (a) $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Pira (d) cromatograma de um solução padrão $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Análise por HPLC-DAD, medidas fluorescente realizadas

- com o par 270/340 nm para excitação/emissão. 209
- Figura 72: Gráfico de barras com as incertezas de cada componente nos níveis estudados. 212
- Figura 73: Espectros de absorção (A) e emissão fluorescente (B) das nanopartículas TGA-CdTe. 214
- Figura 74: Espectros de fluorescência das nanopartículas de TGA-CdTe na presença de diferentes concentrações canamicina: (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,3; (d) 5,0 ; (e) 6,7,; (f) 8,0; (g) 11; (h) 15; (i) 32; (j) 48,0; (k) 65; (l) 82 ; (m) 98; (n) 132 e (o) $165 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Adaptado referência 183. 215
- Figura 75: Eletroferogramas das nanopartículas após variações da concentração do tampão, (a) tampão borato $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, (b) 10 mmol L^{-1} e (c) 50 mmol L^{-1} em pH 8,0. Injeção de 30 s de $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, temperatura de 25°C , voltagem de 25 kV, capilar de $75 \mu\text{m}$ d.i. Unidade relativa de fluorescência (RFU). 217
- Figura 76: Eletroferogramas das nanopartículas após variações do tempo de injeção: (a) 20, (b) 24, (c) 28, (d) 32, (e) 35 e (f) 40 s. Concentração do tampão tetraborato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 8,0). Injeção de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, temperatura de 20°C , diferença de potencial 25 kV, capilar de $75 \mu\text{m}$ d.i. 218
- Figura 77: Eletroferogramas das dispersões de nanopartículas (a); nanopartículas misturadas previamente com neomicina (b); nanopartículas misturadas previamente com canamicina (c). Injeção de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas. Neomicina e canamicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na dispersão contendo nanopartículas. Eletrólito tampão tetraborato 10 mmol L^{-1} em pH 8,0; 20°C ; 25 kV; capilar de $75 \mu\text{m}$ d.i. e tempo de injeção de 20 s com pressão de 50 mbar 219
- Figura 78: Representação esquemática do procedimento de interação no capilar entre aminoglicosídeos (representado pelas cargas positivas) e nanopartículas TGA-CdTe (representado pelas cargas negativas). (A) injeção e (B) aplicação pontencial.

- EOF: fluxo eletroosmótico 221
- Figura 79: Eletroferogramas após interação dos aminoglicosídeos e nanopartículas no capilar. (a) controle; (b) após introdução de canamicina e (c) após a introdução de neomicina. Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, por 20 s seguida da introdução de neomicina ou canamicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo tempo de 20 s. Tampão 10 mmol L^{-1} em pH 8,0. Temperatura de 20°C , voltagem de 25 kV, capilar de $75 \mu\text{m d.i.}$ 221
- Figura 80: Influência do pH na interação entre neomicina-nanopartículas. Os eletroferogramas (a) sinal da solução controle e (b) solução de neomicina ambos em pH 8,0. Em (c) sinal da solução controle e (d) solução de neomicina ambos em pH 8,5. Em (e) sinal da solução controle e (f) solução de neomicina ambos em pH 9,0. Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, por 20 s seguida da introdução de neomicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo tempo de 20 s, 20°C , 25 kV e capilar de $75 \mu\text{m d.i.}$ 222
- Figura 81: Eletroferogramas das nanopartículas após interação com os diferentes aminoglicosídeos, (a) branco; (b) neomicina; (c) canamicina; (d) tobramicina; (e) amicacina; (f) gentamicina e (g) estreptomicina. Eletrólito de trabalho: tampão tetraborato (10 mmol L^{-1} , pH 8,0). Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, por 20 s seguida da introdução dos aminoglicosídeos na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por 20s. Temperatura de 20°C , diferença de potencial de 25 kV, capilar de $75 \mu\text{m d.i.}$ 225
- Figura 82: Eletroferograma após adição de SDS no eletrólito de corrida. Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas: (a) branco, por 20 s e (b) introdução de canamicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo tempo de 20 s. Demais condições Tabela 27. 228
- Figura 83: Curva analítica e gráfico de resíduos para canamicina 230

| | |
|---|-----|
| Figura 84: Curva analítica e gráfico de resíduo para neomicina. | 231 |
| Figura 85: Eletroferogramas de uma curva analítica para canamicina. | 232 |
| Figura 86: Eletroferogramas de uma curva analítica para neomicina. | 232 |

Lista de tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Resultados após variação do pH (concentração de ácido acético no eletrólito). | 130 |
| Tabela 2: Condições escolhidas para as análises por CE-ICP-MS. | 141 |
| Tabela 3: Parâmetros das curvas analíticas. | 145 |
| Tabela 4: Dectabilidade de TPT e DPT. | 146 |
| Tabela 5: Valores da repetibilidade para o tempo de migração dos analitos e área. | 146 |
| Tabela 6: Valores da precisão intermediária e teste F para área e tempo de migração dos OTs. | 147 |
| Tabela 7: Valores das recuperações das amostras de urina. | 149 |
| Tabela 8: Parâmetros calculados para a comparação entre os métodos. | 152 |
| Tabela 9: Valores das incertezas calculadas para os dois níveis de concentração estudados para os dois analitos. | 154 |
| Tabela 10: Condições iniciais utilizadas no desenvolvimento do método. | 159 |
| Tabela 11: Fatores e níveis aplicados no planejamento CCD 2 ³ . | 162 |
| Tabela 12: Combinação aleatória do planejamento CCD 2 ³ . | 163 |
| Tabela 13: Parâmetros e níveis considerados no planejamento CCD 2 ² . | 168 |
| Tabela 14: Combinações para o planejamento CCD 2 ² . | 168 |
| Tabela 15: Níveis das variáveis aplicadas no planejamento BBD 3 ³ . | 176 |
| Tabela 16: Combinação do planejamento BBD 3 ³ . | 177 |
| Tabela 17: Valores ideais considerados segundo o planejamento BBD 3 ³ . | 185 |
| Tabela 18: Condições estabelecidas para determinação das sete estrobilurinas por MEKC. | 193 |
| Tabela 19: Parâmetros das curvas analíticas dos pesticidas. | 197 |
| Tabela 20: Valores de limite de detecção e de limite de | |

| | |
|---|-----|
| quantificação dos analitos usado o método MEKC. | 198 |
| Tabela 21: Valores da repetibilidade do método MEKC para os pesticidas | 199 |
| Tabela 22: Precisão intermediária do método para tempo e área dos pesticidas. | 200 |
| Tabela 23: Valores das recuperações para os pesticidas nas amostras de sopas infantis de vegetais após o primeiro procedimento de extração por QuEChERs. | 202 |
| Tabela 24: Recuperações para os pesticidas nas amostras de sopas infantis composta de frutas após procedimento de extração por QuEChERs com ajuste de pH. | 206 |
| Tabela 25: Valores dos parâmetros obtidos após comparação de métodos. | 210 |
| Tabela 26: Valores das incertezas calculadas para os dois níveis de concentração estudados para os dois analitos. | 211 |
| Tabela 27: Condições de análise para aminoglicosídeos-TGA-CdTe. | 224 |

1 Introdução

1.1. Agrotóxicos

O uso intensivo de substâncias químicas na agricultura para o controle de pragas e doenças se disseminou há pouco mais de meio século. Essa prática teve grande crescimento após as grandes guerras mundiais em consonância com o desenvolvimento da indústria química e com o aumento da população que demandou a produção mais extensiva de produtos agropecuários. As substâncias aplicadas para o controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas são utilizadas também em florestas, nos ambientes hídricos (urbanos e industriais), nas pastagens para a pecuária e em campanhas sanitárias para o combate a vetores de doenças.¹

A Lei Federal no 7.802, em seu Artigo 2º, Inciso I², que trata sobre esse grupo de substâncias/agentes no país, define agrotóxicos e afins como “os produtos ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também em ambientes urbano, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”. Essa definição está de acordo com a estabelecida pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) para pesticidas^{3,4} e em consonância com a definição de agrotóxico da Food and Agriculture Organization (FAO) da Organização das Nações Unidas (ONU).

Na literatura internacional em língua inglesa, o grupo de substâncias/produtos químicos aqui definidos como agrotóxicos recebe a

denominação de pesticida (*pesticide*). O termo “agroquímico” (*agrochemical*), o mais próximo de agrotóxico é utilizado, em menor escala, na língua portuguesa e engloba outros produtos como os fertilizantes e adubos inorgânicos. No campo, esses insumos são amplamente tratados por “veneno” ou “remédio”.⁵

A escolha da melhor denominação para esse grupo de substâncias gera grande discussão, pois seu nome pode estar associado à função que exerce no meio em que é aplicado, sem a intenção de ocultar seus efeitos nocivos à saúde humana e animal, ou pode ser usada uma nomenclatura mais aceitável para a população de forma a não gerar desconfiança ao considerar seu uso.

Pela legislação brasileira os agrotóxicos são classificados como: inseticidas, fungicidas ou herbicidas. A denominação pesticida é dada à substância ou à mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação ou destruir, direta e indiretamente, insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura. Os pesticidas podem ser classificados quanto à finalidade (aficida, ovicida, larvicida, raticida, formicida, acaricida, inseticida, entre outros) e quanto ao modo de ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante) sendo possível o enquadramento em mais de uma classe. Quanto à origem, a divisão envolve substâncias inorgânicas (compostos de mercúrio, de bário, enxofre e compostos de cobre), os pesticidas de origem vegetal, bacteriana e fúngico (piretrinos, antibióticos e fitocidas), e os pesticidas que são substâncias orgânicas sintéticas. Os pesticidas na forma de substâncias orgânicas constituem o maior grupo de produtos com alta atividade fisiológica, sendo as principais classes os organoclorados e os organofosforados.¹

A intoxicação por agrotóxico pode ser dividida em três diferentes tipos: a intoxicação aguda, cujos sintomas surgem rapidamente algumas horas após a exposição por um curto período, a doses elevadas de produtos muito tóxicos; a intoxicação subaguda ou sobreaguda, que ocorre por exposição moderada ou pequena a produtos de alta ou média toxicidade e os sintomas podem aparecer em alguns dias ou semanas; e a intoxicação crônica caracterizada por efeitos crônicos que tem surgimento tardio que podem aparecer após meses ou anos da exposição pequena ou moderada a um ou vários produtos tóxicos. Os agrotóxicos estão divididos em quatro classes toxicológicas (I = rótulo vermelho, II = rótulo amarelo, III = rótulo azul e IV = rótulo verde). A classe I abrange os considerados altamente tóxicos para seres humanos; a classe II são os mediamente tóxicos, a III

são os pouco tóxicos e a IV são os compostos considerados praticamente não-tóxicos para seres humanos.¹

No período de 1999 a 2010 foram registradas pelo SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – Ministério da Saúde/FIOCRUZ), cerca de 66.982 intoxicações por agrotóxico de uso agrícola. Durante esse período o número de intoxicações por ano no país variou em torno de 6.000 casos. No ano de 2010 o número registrado foi de 5.463 casos de intoxicação. As circunstâncias para as intoxicações são variadas, sendo a grande maioria devido a acidentes individuais, coletivos e ambientais e também a erro de administração, ingestão de alimentos e tentativa de suicídio.⁶

Atualmente cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxicos são utilizados no Brasil por safra. Em média, são 20 L por hectare cultivado. Mais da metade são herbicidas (como o glifosato), depois vêm os inseticidas e fungicidas (usados, por exemplo, para combater a ferrugem asiática da soja). Ao dividir o volume total utilizado no campo pela população, se poderia dizer que o consumo anual é de cerca de 5 L por brasileiro, mas sobe para 31 L ao se levar em conta somente a população rural. A produção brasileira de grãos no período 2011/2012 chegou a 157,8 milhões de toneladas, uma redução de 3,1% em relação à safra anterior, quando foi de 162,9 milhões de toneladas, segundo o sexto levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). O milho e a soja, culturas de maior peso na produção, chegam a 83% de toda a safra, com um volume de 130,4 milhões de toneladas. Essas culturas são as que mais consomem agrotóxicos no Brasil juntamente com a cana-de-açúcar, o algodão, o café e a laranja. Essas substâncias também podem estar presentes nos hortigranjeiros consumidos diariamente, já que o controle de pragas por meio de agrotóxicos é intenso nessas culturas e criações.⁷

As formulações usadas na produção de pesticidas são desenvolvidas com propriedades específicas que são dependentes das estruturas químicas e características físicas dos constituintes. Consequentemente, diferentes classes de pesticidas podem ser usadas em combinação e, talvez, em diferentes momentos do cultivo para aumentar o efeito desejado⁸. Mesmo assim, ainda que usados corretamente, acidentes decorrentes do uso de pesticidas são comuns. Muitas classes de pesticidas podem prejudicar o meio ambiente e provocar intoxicações graves nos seres vivos.⁹

A saúde humana pode ser afetada pelos agrotóxicos direta ou indiretamente, pelo contato com estas substâncias, com produtos (alimentos) ou com ambientes contaminados.

1.1.1.

Estrobilurinas

As estrobilurinas são os pesticidas mais novos introduzidos no mercado e têm como característica a baixa persistência no meio ambiente. Porém, por causa do seu grande consumo em plantações, o monitoramento das estrobilurinas em alimentos é de especial importância.¹⁰ As estrobilurinas sintéticas, que foram produzidas a partir de estrobilurinas naturais, sendo estes compostos mais facilmente degradados em plantas, animais e em água.^{11,12}

Os pesticidas da classe das estrobilurinas são substâncias naturais isoladas principalmente de cogumelos (basidiomicetes) e atuam como fungicidas. Seu nome é derivado dos cogumelos do gênero *Strobilurus* e a estrobilurina-A foi o primeiro pesticida dessa classe isolado a partir de culturas de líquidos de *Strobilurus tenacellus* por Anke e colaboradores.^{13,14,15} Todas as estrobilurinas naturais possuem a estrutura do acrilato (E)-3-metoxi-2-(5-fenilpenta-2,4-dienil), sendo que a diferença entre cada uma delas é decorrente dos tipos de substituintes do anel aromático nas posições 3 e 4. Na Figura 1 é mostrada a estrutura e dois possíveis substituintes do anel (estrobilurina-A e estrobilurina-B).

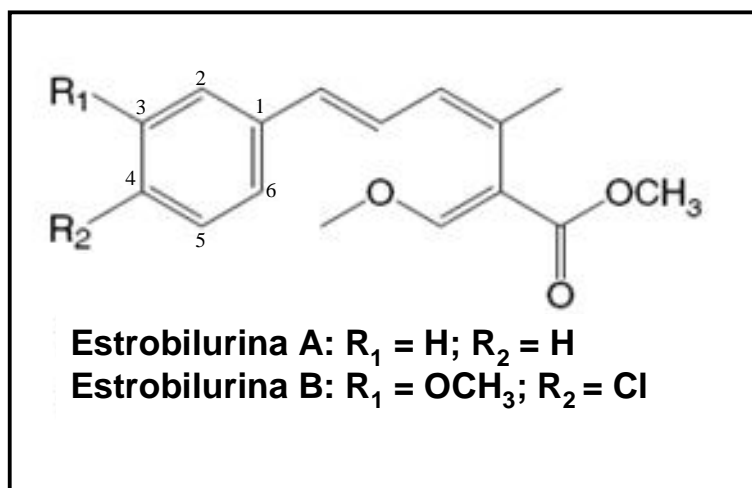


Figura 1: Estrutura dos pesticidas estrobilurinas naturais (adaptado ref.16).

As estrobilurinas naturais foram os compostos de partida para produção de estrobilurinas sintéticas que são mais estáveis e mais potentes quando usados comercialmente na agricultura para controle de fungos. As estrobilurinas sintéticas foram introduzidas no mercado a partir de 1997 e o primeiro da classe a ser sintetizado e registrado foi a azoxistrobina. Na Figura 2 são apresentadas as fórmulas estruturais das estrobilurinas e seus respectivos nomes segundo a IUPAC.

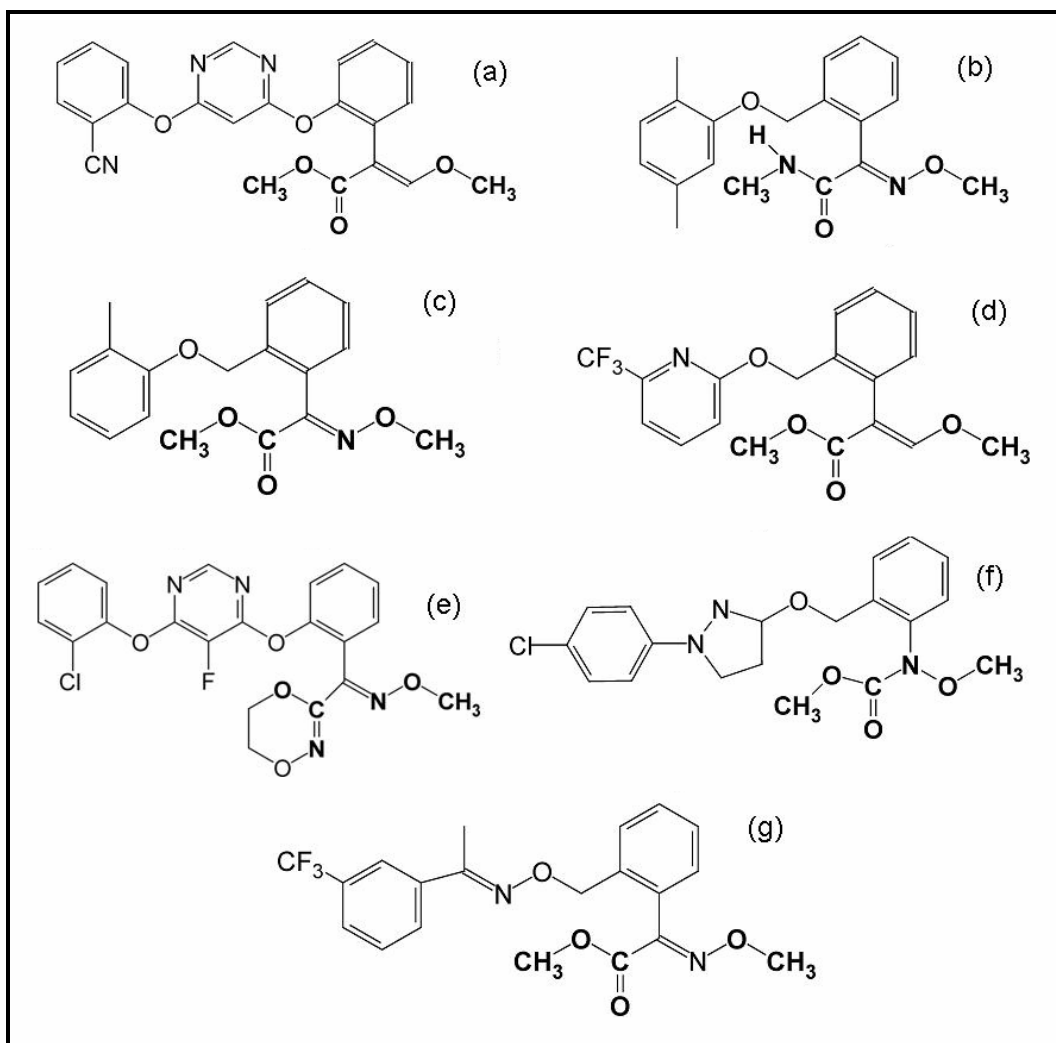


Figura 2: Estrutura das estrobilurinas: (a) azoxistrobina (metil-(E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidina-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato); (b) dimoxistrobina ((E)-2-(metoxiamino)-N-metil-2-[a-(2,5 - xililoxi)-o-tolil]acetamida); (c) kresoxim-metil (metil (E)-metoxiimino[α -(o-toliloxi)-o-tolil]acetato); (d) picoxistrobina (metil (E)-3-metoxi-2-{2-[6-(trifluorometil)-2-piridiloximetil]fenil}acrilato); (e) fluoxastrobina (E-{2-[6-(2-clorofenoxi)-5-fluoropirimidina-4-iloxi]fenil}(5,6-didro-1,4,2-clorofenoxi)-5-fluoropirimidina-4-iloxi]fenil (5,6-dihidro-1,4,2-dioxazin-3-il)metanoneO-metiloxine); (f) piraclostrobina (metil{2-[1-(4-clorofenil)pirazol-3-iloximetil]fenil}(metoxi)carbamato); e (g) trifloxistrobina (metil(E)-metoximino-{(E)- α -[1[(α,α,α -trifluoro-m-tolil)etilideneaminoxio]-o-tolil]acetato).

As estrobilurinas inibem a respiração celular ligando-se a um sítio específico nas mitocôndrias, o local de oxidação do quinol (ou do ubiquinol) do citocromo b, e desse modo a transferência de elétrons entre o citocromo b e c

cessa, o que leva a diminuição da taxa de oxidação do NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) e da síntese do ATP (adenosina trifosfato). Como consequência, a produção de energia cessa e o parasita (fungo) morre. Esse modo de ação é diferenciado e tem alvo específico, sendo diferente da inibição do citocromo c, que é o mecanismo conhecido de asfixia do cianato e do monóxido de carbono. As estrobilurinas são mais conhecidas como fungicidas inibidores quinonas (Q_oI), cuja característica importante é a ação rápida e concentrada no primeiro período do ciclo de vida dos fungos, isto é, no estágio de esporos. A aplicação das estrobilurinas produz nas plantas uma cor verde mais saudável (“efeito verde”) e gera um aumento significativo no volume e na qualidade da colheita. A maioria dos fungicidas estrobilurinas tem um período residual de aproximadamente 21 dias.¹⁵

Todos os pesticidas estrobilurinas comerciais têm amplo espectro de atividade antifúngica, sendo eficazes contra todos os grandes grupos de fungos patogênicos em plantas (Oomicetes, Deuteromicetes, Ascomicetes e Basidiomicetes). As estrobilurinas podem ser usadas em diferentes lavouras, por exemplo, a picoxistrobina pode ser usada em lavouras de algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, feijão, milho, soja e trigo. A piraclostrobina pode ser aplicada em lavouras de algodão, alho, amendoim, aveia, banana, batata, café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, cevada, citros, crisântemo, feijão, maçã, mamão, manga, melão, melancia, milho, pepino, pimentão, rosa, soja, tomate, trigo e uva. O kresoxim-metil pode ser aplicado nas lavouras de algodão, arroz, batata, café, cevada, crisântemo, feijão, maçã, melão, pepino, rosa, soja, tomate, trigo e uva. A azoxistrobina também tem uma ampla aplicação: alface, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, berinjela, beterraba, café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, cevada, citros, couve-flor, crisântemo, feijão, figo, girassol, goiaba, mamão, manga, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêssego, pimentão, soja, tomate, trigo e uva. A trifloxistrobina pode ser utilizada na lavoura de algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, café, caqui, cebola, cenoura, cevada, citros, eucalipto, feijão, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, soja, tomate e trigo.¹⁸

Os pesticidas da classe das estrobilurinas são considerados relativamente seguros em termos de efeitos agudo, crônico e em longo prazo. As quantidades esperadas para causar toxicidade aguda em indivíduos de 68 kg seriam as seguintes:

de 500 até 5.000 mg kg⁻¹ (ingestão oral), de 2.000 a 20.000 mg kg⁻¹ (exposição cutânea) e de 2,0 a 20,0 mg L⁻¹ (inalação). As estrobilurinas são tóxicas para peixes e invertebrados aquáticos, por isso, a aplicação em torno de poços d'água devem ser acompanhadas de cuidados que são indicados nas embalagens dos produtos.¹⁷

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de 0,043 mg kg⁻¹ para a picoxistrobina, 0,040 mg kg⁻¹ para a piraclostrobina, 0,02 mg kg⁻¹ para azoxistrobina, 0,030 mg kg⁻¹ para trifloxistrobina e para kresoxim-metil é 0,040 mg kg⁻¹.¹⁸ Para a dimoxistrobina e fluoxastrobina, o limite ainda não foi estabelecido.

Internacionalmente, a garantia de alimentos seguros é regulamentada pelo *Codex Alimentarius* (CODEX) que estabelece normas, diretrizes e códigos de boa prática para o comércio de alimentos que viajam o mundo todo. Assim os consumidores podem confiar na segurança e qualidade dos alimentos que compram e os importadores podem confiar que os alimentos estão de acordo com suas especificações. O CODEX estabelece limites máximos de resíduos (LMR) para alguns dos pesticidas da classe das estrobilurinas em diversos tipos de alimentos e também a IDA, que para a azoxistrobina é de 0,02 mg kg⁻¹, para kresoxim-metil é 0,40 mg kg⁻¹, para trifloxistrobina 0,04 mg kg⁻¹, para piraclostrobina é de 0,03 mg kg⁻¹ e para os demais os valores de LMR ainda não foram estabelecidos.¹⁹

1.1.1.1.

Métodos analíticos para determinação de estrobilurinas

Métodos analíticos para a determinação simultânea de fungicidas inibidores Q₀I, grupo das estrobilurinas, foram desenvolvidos utilizando técnicas cromatográficas (gasosa e líquida) para análises de diferentes tipos de amostras, como por exemplo, frutas, vegetais, sucos, vinhos e amostras ambientais. Os exemplos mais relevantes são indicados abaixo.

O primeiro método para determinação de pesticidas da classe das estrobilurinas foi desenvolvido por Christensen e Granby²⁰ que determinaram kresoxim-metil, trifloxistrobina e azoxistrobina em amostras de maçã, uva e trigo. O procedimento de extração líquido-líquido (LLE) foi realizado com acetato de

etila: ciclohexano e remoção das impurezas por permeação cromatográfica em gel (GPC) seguido por determinação por cromatografia a gás (GC) com detecção por captura de elétrons (EC), nitrogênio/fosforo (NP) e espectrometria de massa (MS). Os limites de detecção (LOD) ficaram entre 0,004 e 0,014 mg kg⁻¹ para as três estrobilurinas.

Um dos métodos proposto por Abreu e colaboradores²¹ possibilitou a determinação de azoxistrobina, kresoxim-metil e trifloxistrobina em uva e em vinho por cromatografia líquido de alta performance (HPLC) com detecção fotométrica de absorção com detector de arranjo de diodo (DAD). O limite de quantificação (LOQ) em uvas e vinhos variou entre 0,219 mg kg⁻¹ para azoxistrobina e 0,523 mg kg⁻¹ para kresoxim-metil. Em outro trabalho, Abreu e colaboradores²² validaram o método HPLC-DAD para determinar os pesticidas citados acima, além da piraclostrobina e outros fungicidas, como o famoxadone e o fenamidone. O método foi aplicado nas mesmas amostras citadas anteriormente. As amostras passaram por extração líquido-líquido (LLE) com mistura de acetato de etila:hexano 50:50% v/v. O LOQ foi de 0,6 e 0,8 mg kg⁻¹ para as amostras de uva e vinho respectivamente. Esses métodos desenvolvidos foram comparados com análises feitas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS).

Taylor e colaboradores¹¹ desenvolveram um método para análise de resíduos de 38 pesticidas (incluindo azoxistrobina, kresoxim-metil e trifloxistrobina) em amostras de extrato bruto de frutas e de vegetais usando cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa em duas dimensões (LC-MS-MS), eluição em modo isocrático e fase estacionária de C18. O método foi desenvolvido sem nenhum processo de limpeza dos extratos das amostras de uva, kiwi, morango, espinafre, limão, pêssego e nectarina. Para as análises, foram feitas fortificações nas amostras em níveis de 0,01 e 0,8 mg kg⁻¹. Para estrobilurinas, os maiores valores de recuperação obtidos entre as diversas amostras analisadas foram de 83% para a azoxistrobina em maçã, 87% e 76% para kresoxim-metil e trifloxistrobina, respectivamente em amostra de kiwi. Outro método que utilizou LC-MS-MS foi desenvolvido por Sannino e colaboradores²³ para determinação de 24 pesticidas, sendo três estrobilurinas (azoxistrobina, trifloxistrobina e kresoxim-metil), determinados em amostras de maçã, suco de limão concentrado e tomate. Os pesticidas foram separados em uma coluna polar

de fase reversa e eluídos com gradiente de solventes. Os estudos foram realizados com fortificação das amostras em níveis entre 0,001 e 0,020 e também entre 0,010 e 0,200 mg kg⁻¹, com recuperações obtidas na faixa entre 76 e 106%.

Schurek e colaboradores²⁴ desenvolveram um método para determinação de seis estrobilurinas (azoxistrobina, picoxistrobina, dimoxistrobina, kresoxim-metil, piraclostrobina e trifloxistrobina) utilizando a técnica de GC com análise direta em tempo real (DART) como fonte de íons acoplada ao espectrômetro de massa do tipo tempo de voo (TOF-MS). Com o uso de um padrão interno, as recuperações em amostras de trigo mostraram boa exatidão na faixa entre 78 e 92%. Os valores de LOQ obtidos no método proposto foram: 5 µg kg⁻¹, 12 µg kg⁻¹, 10 µg kg⁻¹, 30 µg kg⁻¹, 12 µg kg⁻¹ e 6 µg kg⁻¹ para azoxistrobina, picoxistrobina, dimoxistrobina, kresoxim-metil, piraclostrobina e trifloxistrobina, respectivamente. Valores de recuperação menores que 90% foram obtidos para dimoxistrobina (85%), piraclostrobina (78%) e trifloxistrobina (83%).

As estrobilurinas azoxistrobina e piraclostrobina foram determinadas em amostra de água de superfície (rio) e subterrânea em conjunto com 14 outros pesticidas de seis diferentes classes (orgofosforados, piretroides, imidazoles, carbamato, tetrazina, triazole)²⁵. O procedimento de extração utilizado foi por imersão direta de uma fibra de poliacrilato (DI-SPME) em temperatura de 50 °C durante 30 min. Para a extração a fibra foi introduzida diretamente no injetor do cromatógrafo a gás (GC) para dessorção em 280 °C. O método foi validado usando água ultrapura fortificada com os pesticidas em diferentes níveis de concentração. O método foi aplicado em 26 amostras coletados no Platô Neópolis no estado de Sergipe, Brasil. Os valores de LOQs obtidos com método desenvolvido utilizando a microextração em fase sólida (SPME) foram iguais a 1,0 e 0,05 µg L⁻¹ para piraclostrobina e azoxistrobina, respectivamente. Resíduos de piraclostrobina e azoxistrobina foram encontrados em três diferentes amostras nas concentrações de 3,12 e 0,15 µg L⁻¹. Os autores consideraram que o estudo e determinação dos resíduos de pesticidas na região foram satisfatórios e indicaram um potencial risco de contaminação ambiental que pode ser prejudicial à vida humana e animal considerando que foram encontradas concentrações de resíduos de pesticidas acima do permitido na legislação Brasileira (0,04 µg L⁻¹).

A determinação de sete estrobilurinas (azoxistrobina, kresoxim-metil, picoxistrobina, piraclostrobina, dimoxistrobina, metominostrobin e

trifloxistrobina) por procedimentos cromatográficos foi desenvolvida por Viñas e colaboradores em três diferentes métodos para amostras de sopas prontas infantis, frutas e sucos. Dois desses métodos foram desenvolvidos utilizando GC-MS com SPME para amostra de sopas infantis (papinha para bebês)²⁶ e microextração líquido-líquido (LLME) para amostras de suco e frutas.²⁷ Os valores de LOQ atingidos nesses métodos foram da ordem de ng g^{-1} utilizando SPME que tornou o método trezentas vezes mais sensível. Porém, após testes para avaliar o efeito de matriz através da comparação das inclinações das curvas analíticas de padrões aquosos e de adição padrão, o resultado mostrou que seria necessário o uso de adição padrão para quantificação dos fungicidas em diferentes sopas infantis. A LLME proporcionou altos valores de pré-concentração dos pesticidas e o método apresentou o LOD da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ antes do procedimento de pré-concentração, mas o uso de adição padrão também foi aconselhado para obter um resultado mais exato. O terceiro método para a determinação das sete estrobilurinas em amostra de fruta foi desenvolvido utilizando a técnica de extração com barras de agitação cobertas de material absorvente (SBSE) acoplada ao HPLC-DAD.²⁸ As amostras foram colocadas no ultrassom, após adição de etanol antes de ser submetida ao procedimento de extração. O uso de padrão *surrogate* (o fungicida draxolon, que tem propriedades próximas aos das estrobilurinas) adicionado antes de todo o processo de preparação de amostra permitiu fazer a quantificação por curva analítica sem a necessidade do uso de procedimento de adição de padrão. Os valores de LOD desse método ficaram entre 0,3 e 2,0 ng g^{-1} para trifloxistrobina e metominostrobin, respectivamente, após o procedimento de pré-concentração que aumentou a sensibilidade entre 7 e 90 vezes (para metominostrobin e trifloxistrobina, respectivamente), quando comparado ao método sem a SBSE. O método SBSE-HPLC-DAD foi repetitivo e proporcionou recuperações entre 80 e 105% para amostras fortificadas com os pesticidas. Em duas das quinze amostras analisadas foram encontrados baixos níveis de piraclostrobina e trifloxistrobina.

A voltametria também já foi utilizada para determinação de azoxistrobina e dimoxistrobina em amostras de uva, batata e suco de uva. No método foi aplicada uma extração em fase sólida para eliminar interferências das amostras de batata e uva, para o suco de uva não foi preciso nenhum pré-tratamento da amostra. O LOQ de 119 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a amostra de suco de uva e 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para amostras de

batatas e uva foram encontrados para dimoxistrobina e azoxistrobina, usando o eletrodo de gota pendente de mercúrio. Recuperações entre 72,3% a 96,7% para dimoxistrobina e entre 81,7% a 102,3% para azoxistrobina foram encontrados²⁹.

A eletroforese capilar (CE) vem sendo utilizada em alguns trabalhos analíticos voltados para determinação de pesticidas em diferentes tipos de amostras aplicando seus vários modos de operação, como por exemplo, a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC). Em alguns casos se identifica o uso de concentração no capilar (*on-line*) dos analitos pelo modo de empilhamento normal (*stacking*). Essa estratégia é usada para melhorar a baixa sensibilidade da técnica com detecção fotométrica (detecção em torno de 200 nm e com caminho óptico da ordem de milímetros). Juan-García e colaboradores³⁰, por exemplo, comparou dois processos de concentração em capilar da amostra para melhorar a sensibilidade de um método MEKC para a quantificação de um grupo de pesticidas (fludioxonila, procimidone, piriproxifena, dinoseb e carbendazima) extraídos de amostras de uvas e alface. Hernández-Borges e colaboradores^{31,32} também testaram várias técnicas de pré-concentração de pesticidas extraídos de sucos de frutas e leite de soja usando a técnica de CE. Ravelo-Pérez e colaboradores³³ usaram a MEKC e o modo de empilhamento com polaridade reversa do eletrodo (REPSM) para a pré-concentração de pesticidas em extratos de amostras de tomates³⁴ e de vinhos^{33,35}, onde apenas a azoxistrobina da família das estrobilurinas estava presente, apresentando LOD de 0,092 mg L⁻¹.

Um método foi desenvolvido por Souza e colaboradores³⁶ utilizando a técnica MEKC para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina em amostra de urina com aplicação de concentração dos analitos no capilar. Valores de LOQ iguais a 32 µg L⁻¹ e 70 µg L⁻¹ foram encontrados para picoxistrobina e piraclostrobina, respectivamente. Esses valores foram alcançados após aplicar a concentração dos analitos no capilar de caminho óptico estendido (210 mm). Em todos os trabalhos citados, os autores afirmaram ter conseguido aumentar a sensibilidade do método consideravelmente quando utilizaram os modos de concentração da amostra no capilar.

A técnica de eletroforese capilar até o momento não foi aplicada para determinação de dimoxistrobina e fluoxastrobina, assim como para a determinação de vários pesticidas da classe das estrobilurinas em uma mesma análise.

1.1.1.2.

O método QuEChERS

O preparo de amostra é uma etapa crucial dentro de um procedimento analítico. Os métodos desenvolvidos em química analítica na maioria das vezes são para determinar substâncias em níveis traços. As baixas concentrações dos analitos, suas distintas propriedades químicas e a complexidade das matrizes, tornam necessária uma etapa prévia de preparo da amostra. Devido ao fato de que as medições são normalmente efetuadas em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados. Os principais objetivos do preparo da amostra são, portanto, promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse e a remoção, tanto quanto possível, dos interferentes. Perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises.

O método QuEChERS vem sendo utilizado para extração de uma grande variedade de compostos em diferentes tipos de matriz, uma vez que permite a extração quantitativa de diversas substâncias com diferentes propriedades físico-químicas em um curto período de tempo sem o uso de solventes tóxicos.

Em 2003, Anastassiades e colaboradores³⁷, com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo procedimento de preparo de amostras para extração de resíduos de pesticidas denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) sendo que a pronúncia deve ser “catchers”³⁸. Esse método tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto, seguro e pode ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas. A Figura 3 apresenta um fluxograma com as etapas básicas do método QuEChERS original.

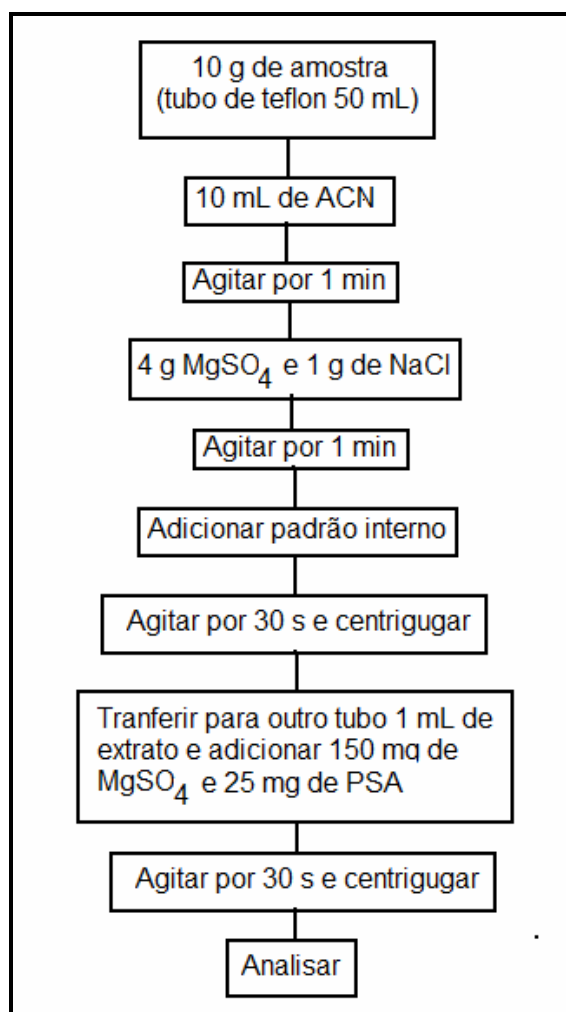


Figura 3: Fluxograma representativo do método QuEChERS original.

A quantidade de amostra utilizada deve ser a menor possível, desde que representativa de todo o conteúdo a ser analisado. De maneira geral, amostras sólidas, como a maioria dos alimentos, requerem etapas mais complexas e demoradas de preparo. Uma das possibilidades de obter amostras sólidas homogêneas é através do corte das amostras em pedaços menores seguido de processamento até obter uma pasta homogênea. Dados da literatura mostram que a quantidade de amostra mais utilizada no desenvolvimento do método QuEChERS é de 10 g, sendo esta considerada ideal quando comparada a quantidades de 15 a 100 g normalmente utilizadas em outros métodos multirresíduo³⁸.

Os solventes mais utilizados para extração no método QuEChERS são: acetato de etila, acetona e acetonitrila (ACN), sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens. Acetona e ACN são miscíveis em água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz. Quando uma

extração é realizada com acetona, há necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa, o mesmo não é necessário quando se utiliza ACN, uma vez que a adição de sais ao extrato (efeito *salting-out*) faz com que ocorra separação de fases mais facilmente. A ACN é o solvente utilizado no método de extração multirresíduo.

Na extração com ACN, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa. A utilização de sais secantes para melhorar a recuperação de pesticidas polares foi descrita por Anderson e colaboradores³⁹, os quais utilizaram sulfato de sódio anidro. No desenvolvimento do método QuEChERS normalmente é empregada uma mistura de 1 g de cloreto de sódio e 4 g de sulfato de magnésio. A escolha do $MgSO_4$ foi devido a maior capacidade de remover água, quando comparado a outros sais. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares. Um novo método de *clean-up* denominado extração em fase sólida dispersiva (Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE) é proposto juntamente com o método QuEChERS, onde 1 mL do extrato é colocado em contato com uma mistura contendo 25 mg do sorvente amina primária-secundária (primary secondary amine, PSA) e 150 mg de $MgSO_4$. Ao contrário dos métodos já existentes para *clean-up* com SPE que utilizam cartuchos ou colunas, a D-SPE permite que o *clean-up* e a redução de água residual sejam efetuados de uma forma rápida e simultânea. Esta etapa de remoção de água proporciona um extrato final de menor polaridade, facilitando assim a precipitação de coextrativos polares. O sorvente retém as interferências da matriz, sendo que depois da agitação manual e centrifugação o extrato está pronto para ser injetado, por exemplo, em um sistema cromatográfico.³⁸

O processo de agitação mais utilizado é por vortex. Esse processo é semelhante à agitação manual que possui várias vantagens, como por exemplo: (i) possibilidade de realizar a extração em campo; (ii) a extração ocorre em um único frasco fechado, não expondo o analista e (iii) rapidez, uma vez que não há necessidade de limpeza do agitador entre extrações.³⁸ Também pode ser substituído por agitação manual dependendo do número de amostras a ser analisadas.

O método QuEChERS pode ser modificado do procedimento original com ajuste de variáveis como o pH do meio. As frutas e os vegetais apresentam um pH natural que varia entre 2,5 e 6,5. Portanto, o ajuste do pH também está relacionado à presença de coextrativos na fase orgânica, uma vez que se observa uma maior presença de gordura e ácidos graxos quando a extração é efetuada em meio ácido. No método QuEChERS original não foi realizada nenhuma correção de pH. O pH é importante tanto para compostos sensíveis à degradação em meio alcalino, como para aqueles sensíveis em meio ácido. Em geral, recomenda-se uma faixa de pH entre 4 e 5, uma vez que a mesma proporciona recuperações acima de 70% para pesticidas sensíveis em meio ácido, além de garantir estabilidade para aqueles pesticidas que degradam em meio alcalino. O tamponamento dos extratos entre pH 4 e 5 com ácido acético ($pK_a = 4,75$) e acetato de sódio tem sido adotado. Ácido acético e acetato de sódio estão presentes de forma natural em várias frutas e vegetais, portanto, a utilização deste tampão evita que novos reagentes sejam utilizados e que interferências indesejáveis venham a ocorrer.⁴⁰

O método QuEChERS já foi aplicado em análises de diferentes tipos de amostras para extração de algumas estrobilurinas e múltiplos pesticidas. Um estudo colaborativo foi realizado por Lehotay⁴¹ para determinar 20 pesticidas (dentre eles azoxistrobina e kresoxim-metil) de classes variadas em amostras de frutas e vegetais (uva, laranja e alface) para estudo de um método oficial para extração desses pesticidas. O método QuEChERS aplicado pelos laboratórios participantes constituiu das seguintes etapas: (i) 15 g de amostra é pesada para um tubo de centrifuga com adição de 15 mL de acetonitrila com ácido acético 1% v/v, 6 g de $MgSO_4$ e 1,5 g de acetato de sódio e o tubo é agitado e centrifugado; (ii) uma porção do extrato é misturado na proporção de 3:1 (m/m) de $MgSO_4$ e sorvente amina primária secundária (PSA) (200 mg para cada mL de extrato); (iii) o extrato foi então analisado por GC-MS. As recuperações para azoxistrobina em amostras enriquecidas foram de $92 \pm 18\%$. Kresoxim-metil foi determinado em amostra de uva ($9,2 \pm 3,2 \text{ ng g}^{-1}$) e as recuperações foram iguais a 112 ± 18 .

González e colaboradores⁴² também avaliaram o método QuEChERS para extração de 90 pesticidas de classes variadas (dentre eles a trifloxistrobina) utilizando a cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massa multidimensional (UPLC – MS/MS). Quando comparado a outros procedimentos de extração e limpeza da matriz por SPE, o método

QuEChERS proporcionou melhores resultados de recuperação em amostras de suco de frutas para trifloxistrobina (70%). A principal desvantagem da abordagem QuEChERS em relação ao SPE é com relação ao fator pré-concentração.

A estrobilurina piraclostrobrina foi determinada em amostra da planta, casca, amendoim e solo com LC-MS/MS após extração com método QuEChERS.⁴³ As etapas do método de extração aplicado foram: (i) 10 g de amostra homogênea foram pesados e transferidos para um tudo de 50 mL e 10 mL de ACN foram adicionados; (ii) o tubo foi agitado por 30 minutos; (iii) depois, 4 g de MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl foram adicionados e as amostras foram agitadas vigorosamente com vortex por 1 min e centrifugadas por 5 min em 3800 rpm; (iv) 1 mL do extrato foi transferido para micro tubos de centrifuga (2 mL) contendo 100 mg de PSA e 150 mg de MgSO₄ anidro; (v) as amostras foram misturadas vigorosamente em vortex por 1 min e centrifugado 2 min em 6000 rpm (vi) o extrato foi filtrado e analisado. As recuperações variam entre 80,3 a 109,4% entre os três níveis de concentração avaliados nas diferentes amostras. O menor valor foi encontrado nas amostras de amendoim no maior nível de concentração. O método pode ser aplicado e utilizando em amostras reais para determinação de piraclostrobrina.

1.1.2.

Compostos Organoestanhos

Organoestanhos (OTs, do inglês “*organotins*”) são substâncias vastamente utilizadas na indústria química como estabilizadores de PVC, pesticidas e em tintas anti-incrustantes aplicadas nos cascos de navios para evitar que algas, mexilhões e outros organismos se agarrem às embarcações. Um dos principais efeitos do uso de tais substâncias é o envenenamento do sistema biológico, principalmente de animais marinhos (moluscos e ostras), originando mutações e condenando espécies animais dessa cadeia alimentícia à extinção.⁴⁴

Os OTs são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações estanho-carbono e apresentam a fórmula geral R_nSnX_{4-n} , onde R é um grupo alquil ou aril, X é um ânion, como cloreto, óxido, hidróxido ou outro grupo funcional, e onde n varia de 1 a 4. O número de ligações Sn-C tem um grande efeito sobre as propriedades dos OTs, permitindo uma série de aplicações. Os

compostos tetraorganoestânicos R_4Sn não possuem atividade biológica significativa e sua maior aplicação comercial é como precursor para outros OTs. A atividade biológica máxima ocorre na série de OTs em que $n=3$ (compostos triorganoestânicos) e são utilizados comercialmente como biocidas em várias áreas. Organoestanhos trissubstituídos (Tri-OTs) são altamente tóxicos aos humanos e aos organismos aquáticos e podem causar efeitos nocivos mesmo em baixos níveis ($ng L^{-1}$).⁴⁵ A Figura 4 mostra as estruturas químicas da série de compostos com n de 1 a 3 e R sendo o radical fenil.

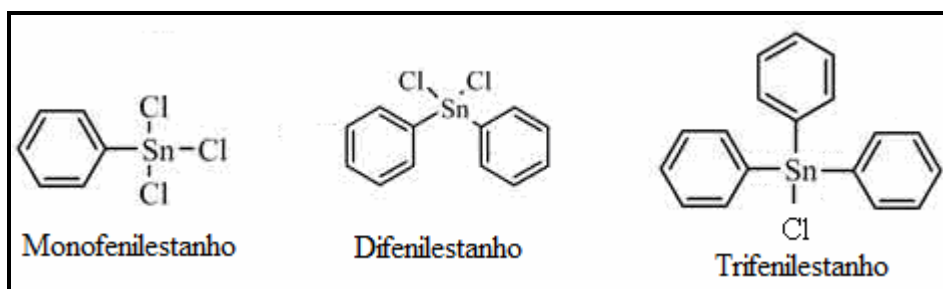


Figura 4: Estrutura química de três fenilestanho.

A toxicidade destas substâncias é diretamente dependente do tipo e do número de átomos de carbono ligados ao estanho⁴⁶. O tributilestanho (TBT) e, em menor extensão, o trifenilestanho (TPT) são liberados diretamente no ambiente aquático, onde podem facilmente degradar a compostos menos substituídos, e acumular nos sedimentos e nos organismos.⁴⁷

A preocupação a respeito do impacto ambiental causado pela utilização de tintas anti-incrustantes à base de OTs surgiu no início dos anos 80, quando ficou claro que os organismos que aderem nos cascos dos navios não eram as únicas vítimas, ou seja, outros animais e plantas eram expostos e contaminados⁴⁴. Vários estudos demonstraram os efeitos tóxicos dos OTs em espécies marinhas como moluscos, algas e zooplâncton.⁴⁸ Entre os mais significativos, estão os efeitos do TBT sobre a reprodução de ostras e neogastrópodes, e indicam que o composto está entre os mais tóxicos já introduzidos propositalmente no ambiente aquático.⁴⁴

Medidas legislativas para a restrição do uso destes compostos vêm sendo tomadas em muitos países, desde a década de 80. Entretanto, a maioria dos estudos voltados para os compostos organoestânicos registrados na literatura refere-se às áreas norte e ocidental dos oceanos Atlântico e Pacífico, abrangendo o

hemisfério norte, onde há um controle legislativo.⁴⁴ Dessa forma, o monitoramento de OTs em outras regiões do mundo, onde a legislação é escassa ou inexistente, é considerado de fundamental importância. No Brasil, poucos estudos foram realizados para verificar a presença de OTs no meio ambiente.^{49,50,51,52}

Várias pesquisas têm sido feitas com o objetivo de avaliar os efeitos dos OTs nos organismos vivos. Estudos mostraram que as microalgas se adaptam aos OTs e são capazes de acumular alguns desses compostos em baixas concentrações.⁵³ Os bivalves, organismos filtradores, apresentam grande potencial de bioacumulação destes compostos e, juntamente com moluscos e ostras, servem como bioindicadores da poluição por TBT nos ecossistemas marinhos, por possuírem habilidade limitada para metabolizar e eliminar tal composto. Essas observações alertam para o potencial risco ambiental relacionado à biotransferência desses compostos aos outros elos da cadeia alimentar, podendo alcançar o homem.⁴⁴ Os OTs vêm sendo encontrados também em muitas espécies de peixes em todas as partes do mundo podendo contaminar o homem que consome peixe em sua dieta alimentar. Pesquisas feitas nos EUA revelaram níveis significativos destes compostos no sangue humano. Altas doses de OTs podem danificar o sistema nervoso central e reprodutivo dos mamíferos.⁵⁴

O monitoramento de OTs nocivos no corpo humano é limitado a uma série de problemas, um deles seria a devido à tendência de bioacumulação dessas substâncias. Fluidos biológicos são amplamente utilizados como principal meio para verificar a possível contaminação de humanos por OTs.⁵⁵ Porém, as baixas concentrações encontradas requerem o desenvolvimento de métodos analíticos altamente sensíveis para suas determinações, em especial por causa da baixa atividade ótica e eletroquímica dessas substâncias. Na literatura podemos encontrar trabalhos que foram desenvolvidos para determinação de OTs em fluidos biológicos.^{56,57,58}

1.1.2.1.

Métodos analíticos para determinação de organoestanhos

Técnicas cromatográficas são utilizadas para a separação e quantificação de OTs em diferentes tipos de amostras. Métodos utilizando a cromatografia líquida

de alta eficiência (HPLC) já foram desenvolvidos para a determinação dessas substâncias em amostras ambientais. Shobha e colaboradores⁵⁹ desenvolveram um método para determinar trifenilestanhos e tetrafenilestanho em amostra de água utilizando HPLC com detecção fotométrica em 254 nm sem derivação. O LOD do método foi igual a 0,01 mg L⁻¹ para os trifenilestanhos (cloreto, acetato e hidróxido) e 0,02 mg L⁻¹ para o tetrafenilestanho. A LLE foi realizada com tolueno (para cada 100 mL de amostra, 20 mL de solvente foram utilizados). O extrato foi evaporado e o resíduo reconstituído em 1 mL de ACN. Poboza e colaboradores⁶⁰ desenvolveram um método para determinar triorganoestanhos usando HPLC com coluna de troca catiônica (SCX-10 de 250 x 4,6 mm) em amostra de água. Para os analitos trimetilestanho (TMT), trietilestanho (TET) e tributilestanho (TBT), a detecção foi indireta em 262 nm com adição de 2 mol L⁻¹ de cloreto de benziltrimetilamonio na fase móvel contendo metanol: 10 mmol L⁻¹ tampão acetato (pH 5,9) 70:30% v/v. O trifenilestanho (TPT) também foi determinado, mas com detecção direta em 262 nm. O LOD do método foi igual a 2,5 mg L⁻¹ para TMT, 1,5 mg L⁻¹ para TET, 0,5 mg L⁻¹ para TBT e 0,15 mg L⁻¹ para TPT. No trabalho os autores avaliaram a extração em fase sólida (SPE) apenas para TBT e TPT utilizando diferentes sorventes (C₈, C₁₈, Fenil, XAD-2 e XAD-4). Recuperações próximas a 100% para esses dois analitos foram obtidas somente com cartuchos XAD-2 e eluição com metanol. Para o TPT todos os cartuchos, com exceção do XAD-4 (recuperação igual a 50%) apresentaram bons resultados de recuperação (valores próximo a 100%).

Os métodos mais utilizados são baseados na cromatografia a gás (GC) que apresentam ótima resolução^{50,52,61}, porém a principal desvantagem deste método é que estes usualmente requerem a produção de derivados voláteis dos OTS para proceder à separação.⁶² Godoy e colaboradores⁵⁰ desenvolveram um método para determinar monobutilestanho (MBT), dibutilestanho (DBT) e tributilestanho (TBT) em amostras de sedimentos marinhos em diferentes cidades da costa do estado de São Paulo (Ubatuba, São Sebastião, Guarujá, Santos e Cananéia). A técnica de GC com detecção fotométrica com chama pulsada (PFPD) foi utilizada. Os valores de LOD do método variam entre 8,4 a 66,3 mg g⁻¹ com filtro em 610 nm a faixa linear ficou entre 10 e 500 ng g⁻¹. A derivatização foi realizada com brometo pentilmagnésio (PeMgBr). A extração dos analitos foi realizada com tolueno: ácido acético (10:4 v/v) com adição do agente complexante

pirrolidinoditiocarbamato (APDC). Os maiores níveis de TBT foram encontrados nas amostras da cidade de Santos (em média 360 ng g^{-1}) e Guarujá (em média 670 ng g^{-1}) devido ao intenso tráfego de embarcações. Menores níveis foram obtidos na cidade de Cananéia (em média 50 ng g^{-1}) onde somente barcos de pesca estão presente. Almeida e colaboradores⁵² realizaram um trabalho para determinar TBT, TPT e seus derivados (DBT, MBT, monofenilestanho (MPT) e difenilestanho (DPT)) em amostra de sedimentos da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro. Esse trabalho teve como objetivo verificar possível contaminação relacionada com o uso de tintas anti-incrustantes (aplicadas nos cascos de embarcações), à base de compostos organoestanhos. A técnica analítica de GC-PFPD foi utilizada para as determinações com filtros de 610 e 390 nm para diminuir interferências de enxofre na determinação dos organoestanhos. A extração foi realizada com tolueno: ácido acético (10:4 v/v) e derivatização com PeMgBr . O LOD do método foi igual a $2,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para TBT, $1,9 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para DBT, $2,4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para MBT, $2,7 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para MPT, $2,6 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para DPT, $3,6 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para TPT. TPT não foi encontrado nas amostras e a distribuição das espécies de organoestanhos nos sedimentos foi irregular, sendo a contaminação restrita à área de maior tráfego de navios e estaleiros.

Ugarte e colaboradores⁶³ desenvolveram um método utilizando HPLC acoplado ao ICP-MS para especificação de organoestanhos (TBT, TPT, trimetilestanho (TMeT), tripropilestanho (TPrT) em amostras de água doce e salgada. O uso da técnica de HPLC é favorável devido a não necessidade de derivatização dos analitos. A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) oferece excelente sensibilidade, grande faixa de resposta linear, alta velocidade de análise e possibilidade de determinação isotópica. O acoplamento entre HPLC e ICP-MS é favorável, pois a taxa de fluxo comumente utilizada na técnica cromatográfica é compatível com o fluxo utilizado pelo sistema de introdução de amostra em ICP-MS. A fase móvel utilizada foi água:/ACN/ácido acético (50: 40: 10% v/v) em baixa vazão de fase móvel ($0,3 \text{ mL min}^{-1}$) e, para reduzir a quantidade de solvente no plasma, uma câmara de nebulização resfriada a $-5 \text{ }^\circ\text{C}$ foi utilizada, com oxigênio ($0,1 \text{ mL min}^{-1}$) como gás de complementação. O LOD (em termos de Sn) do método foi igual a 6 ng L^{-1} para TPrT, 11 ng L^{-1} para TPT, 135 ng L^{-1} para TMeT e 185 ng L^{-1} para TBT. A microextração em fase sólida (SPME) foi aplicada e para as amostra de água doce

analisadas nenhuma interferência foi verificada e em apenas uma das amostras foi encontrado $1,01 \text{ ng L}^{-1}$ de TMeT. Para as amostras de água salgada, a concentração de sal foi ajustada para minimizar a possibilidade de interferências. Para amostras fortificadas com os analitos, recuperações entre 71 e 104% foram obtidas, sendo os menores valores encontrados para as amostras de água salgada e para o analito TPT.

A eletroforese capilar (CE) também foi usada na separação de organoestanhos devido a sua alta eficiência e simplicidade.^{46,64,65,66,67} A CE apresenta vantagens, como alta velocidade e eficiência, fácil manuseio da amostra e baixo custo.⁴⁶ Nos métodos já desenvolvidos para determinação de OTs utilizando a técnica de CE, vários modos de detecção foram utilizados, a detecção direta⁶⁷ e indireta na região do UV-vis^{68,69} ou por fluorescência.⁶⁵

Os organoestanhos envolvidos nesse trabalho, (MPT), (DPT) e (TPT) foram estudados por Jones e Riddick⁶⁶ utilizando a técnica de CE com detecção por fotometria de absorção direta em 200 nm, apesar da baixa absorvidade molar dos OTs. A separação desses analitos foi obtida com uso de tampão acetato em pH 2,60 com adição de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ de brometo cetildimetiletilamonio (CABR) para diminuir problemas de alargamentos dos picos (devido à adsorção dos analitos à parede do capilar). O LOD dos analitos no capilar foram iguais a $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ para TPT e $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ para DPT (11 pg e 18 pg, em nL de amostra introduzida no capilar, respectivamente). O LOD para o monofenilestanho não foi calculado devido a problemas de instabilidade reportados pelos autores.

Outro método foi desenvolvido por Guo e colaboradores⁶⁷ para determinar TPrT, TBT, TPT e DPT usando detecção por fotometria de absorção direta em 200 nm. Os menores valores de LOD do método foram encontrados usando como eletrólito de trabalho 10 mmol L^{-1} de percolato de tetrabutilamonio (TBAP) contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido acético (pH 2,75), 10% de metanol, 40% de acetonitrila e 50% de água. Os valores encontrados foram 118 ng L^{-1} para TPrT, 93 ng L^{-1} para TBT, $3,4 \text{ ng L}^{-1}$ para TPT e 42 ng L^{-1} para DPT. Para eletrólito sem solvente orgânico, contendo 10 mmol L^{-1} de acetato de sódio, 1 mol L^{-1} de ácido acético em 100% água, os LOD obtidos foram 177 ng L^{-1} para TPrT, 202 ng L^{-1} para TBT, 25 ng L^{-1} para TPT e 84 ng L^{-1} para DPT. O eletrólito contendo a mistura de solventes orgânicos é favorável à detecção desses analitos devido a suas características de absorção nesse meio.

A detecção fotométrica indireta foi utilizada por Han e colaboradores⁶⁹ no método que desenvolveram para especiação de dimetilestanho (DMT), DBT e TBT. Piridina foi o cromóforo adicionado ao eletrólito de trabalho com detecção em 254 nm. Neste trabalho foi avaliado o efeito do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) no eletrólito. O eletrólito utilizado sem a presença de CTAB foi 5 mmol L⁻¹ de piridina e pH ajustado para 2,65 com ácido clorídrico, voltagem de +20 kV. Quando o CTAB (0,8 mmol L⁻¹) foi adicionado, a voltagem aplicada foi de - 20 kV e o pH ajustado para 2,52 com ácido clorídrico. Menores valores de LOD foram obtidos sem a presença de CTAB. Os valores obtidos foram: 1,3 mg L⁻¹ para DMT, 11,2 mg L⁻¹ para DBT e 9,9 mg L⁻¹ para TBT.

Lee e colaboradores⁶⁵ desenvolveram um método para determinar cinco cátions triorganoestanhos (TMeT, TET, TPrT, TBT e TPT) utilizando CE com detecção indireta por fluorescência. O eletrólito de trabalho utilizado continha 70 mmol L⁻¹ de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-etanosulfônico (HEPES) e 1 mmol L⁻¹ de 6-aminoquinolina (6-QA) como o fluoróforo que permitiu a determinação indireta dos OTs. A resposta linear do método ficou entre 67 a 505 ng L⁻¹. O LOD do método (em termos de Sn) foi igual a 152 ng L⁻¹ para TMeT, 142 ng L⁻¹ para TET, 126 ng L⁻¹ para TPrT, 84 ng L⁻¹ para TBT e 67 ng L⁻¹ para TPT.

CE acoplado com um sistema de geração de hidreto e espectrometria de fluorescência atômica (HG-AFS) foi utilizado por Li-Ping Yu⁴⁶ para especiação de TMT, MBT, DBT e TBT. O autor encontrou melhor resolução entre os picos utilizando como eletrólito de trabalho uma solução contendo 50 mmol L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃), 50 mmol L⁻¹ de tampão Tris, 5% v/v de metanol com pH ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) para 7,10. CTAB foi adicionado ao eletrólito na concentração de 0,008 mmol L⁻¹ para diminuir a adsorção dos analitos à parede do capilar. LOD na faixa entre 8 e 84 mg L⁻¹ foram obtidos para esses analitos no método desenvolvido e testes de recuperação em amostra não foram realizados.

O acoplamento entre CE e ICP-MS para determinar espécies de organoestanhos até o ano de 2010 não havia sido realizada. Esse acoplamento é favorável pelas principais características das técnicas, como a alta capacidade de separação e a elevada sensibilidade para íons metálicos. Yang e colaboradores⁷⁰

desenvolveram um método para determinar simultaneamente quatro espécies de organoestanhos (TMeT, TET, TPrT e TBT) por CE-ICP-MS para avaliar a contaminação de organismos aquáticos. A separação das espécies foi obtida aplicado a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC). O eletrólito de trabalho foi uma solução contendo 50 mmol L⁻¹ H₃BO₃, 12,5 mmol L⁻¹ de Na₂B₄O₇, 20 mmol L⁻¹ de SDS em pH 8,0. O LOD instrumental, calculado pelo desvio padrão do branco, foi estabelecido em 0,2 µg L⁻¹ para TMT, 0,2 µg L⁻¹ para TET, 0,3 µg L⁻¹ para TPrT e 0,7 µg L⁻¹ para TBT. Nas amostras, esses valores de LOD foram dez vezes maiores. As amostras de molusco bivalve marinho (*M. arenaria Linnaeus*) e de molusco de água doce (*C. fluminea*) foram analisadas após processo de digestão por microondas e as recuperações, após adição dos organoestanhos, variaram entre 93 e 103% nos moluscos de água salgada e entre 96 e 104% para moluscos de água doce.

A determinação de OTs em amostras biológicas por técnicas de separação (CE, HPLC e GC) incluem o procedimento de pré-tratamento da amostra para extração dos analitos e/ou remoção dos interferentes. A etapa de extração é a que mais consome tempo e introduz erros na análise. Os métodos mais comuns usados para extração de substâncias em amostra de urina ou plasma incluem extração líquido-líquido (LLE)⁷¹, extração em fase sólida (SPE)^{72,73} e microextração em fase sólida (SPME).⁷⁴ Para LLE, solventes não polares como, benzeno, clorofórmio, hexano e tolueno são usualmente usados para extração de OTs de baixa polaridade (por exemplo, OTs tetra e trissubstituídos). Para OTs de alta polaridade (por exemplo, OTs mono e disubstituídos), é necessário realizar complexação e acidificação.⁷⁵ Comparado com LLE, SPE é uma abordagem mais rápida e usa menos solvente, porém requer maior manipulação da amostra, o que pode ocasionar perdas dos analitos. Essas técnicas de pré-tratamento da amostra são intensas (gastam mais tempo e são tediosos). Novos métodos de extração e pré-concentração de compostos organoestanhos em amostra biológicas devem ser desenvolvidos.

1.2.

Medicamentos de uso veterinário

Os medicamentos fazem parte da vida humana e animal sendo essencial para salvar vidas, promover a saúde e prevenir epidemias e doenças. Para que esses objetivos sejam alcançados os medicamentos precisam ser utilizados na quantidade e intensidade correta para que não ocorra a falta do efeito desejado em decorrência da pequena dose utilizada ou intoxicações nos organismos devido ao uso de doses superiores à necessária.

A quantificação de fármacos é importante em vários tipos de amostras, como por exemplo, em amostras biológicas (sangue e urina)⁷⁶ para controle da dosagem ingerida e excretada pelo organismo humano ou animal, em medicamentos para controle da qualidade do produto final^{77,78}, no meio ambiente devido ao descarte incorreto e sua persistência e também em alimentos, por exemplo, em leite, devido ao uso descontrolado de medicamentos veterinários.^{79,80,81}

O monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente nos últimos anos vem ganhando grande interesse, por essas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e em águas naturais, em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .⁸² O que torna a situação mais grave é que após a administração, uma parte significativa dos fármacos é excretada no esgoto doméstico e devido a sua persistência no meio ambiente não são completamente removidos nas ETEs. Os fármacos são desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas, o tempo suficiente para servir a um propósito terapêutico. Dependendo do fármaco, 50% a 90% de uma dosagem podem ser excretados na forma inalterada, persistindo no meio ambiente⁸³. Alguns fármacos residuais merecem uma atenção especial, dentre eles estão os antibióticos, cujo uso desenfreado promove a contaminação dos recursos hídricos e criam resistência nos microorganismos.⁷⁹

Nos alimentos, a presença de resíduos de substâncias químicas é comum em todo o mundo e pode causar enfermidades. No leite, antibióticos são os resíduos químicos detectados com muita frequência no Brasil^{84,85} como em outros países.^{86,87} A presença de resíduos de antibióticos em leite pode causar vários efeitos indesejáveis, como seleção de cepas bacterianas resistentes, no ambiente e

no consumidor, hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos alérgicos a essas substâncias, desequilíbrio da flora intestinal, além de efeito teratogênico.⁸⁰ No Brasil, a Instrução Normativa nº 51⁸⁸ exige a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos em leite, que não devem ser superiores aos valores de LMRs estabelecidos.

A ANVISA criou um Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet⁸⁹, que teve como objetivo detectar os níveis de substâncias químicas em alimentos de origem animal, sujeitos à contaminação durante a produção. Para a escolha dos medicamentos antimicrobianos e antiparasitários para o programa, a agência estabeleceu critérios, como os conhecidos por deixar resíduos no produto final; os que oferecem risco potencial à saúde humana; aqueles com maior grau de utilização na medicina veterinária, aqueles com maior potencial de exposição do consumidor. Outro critério foi a disponibilidade de método analítico reconhecido internacionalmente para detectar a presença destes resíduos. Dentre os antimicrobianos selecionados no programa, estão dois aminoglicosídeos, a neomicina e a estreptomicina.

1.2.1.

Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeo é uma grande e diversificada classe de antibióticos que são caracterizados por um ou mais grupos amino-açúcares ligados a um componente de aminociclitol por ligações glicosídicas.⁹⁰ Esses antibióticos podem ser classificados de acordo com as substituições do ciclitol e as duas mais importantes subclasses são: (i) 4,5 disubstituídos eoxistreptamina, como por exemplo, a neomicina e (ii) 4,6 disubstituídos deoxistreptamina, como por exemplo, a gentamicina, canamicina e tobramicina.⁹¹ As estruturas de alguns importantes aminoglicosídeos são apresentadas na Figura 5.

Os aminoglicosídeos são produzidos naturalmente por algumas actinobactérias (Actinomycetes), particularmente do gênero *Streptomyces*. Estes organismos frequentemente produzem um número de antibióticos estruturalmente relacionados e o produto terapêutico pode conter uma mistura de compostos

ativos. A síntese de aminoglicosídeos é bem estabelecida, mas a produção através da fermentação ainda é a via mais econômica.⁹¹

Os aminoglicosídeos não são eficazes contra bactérias anaeróbias, mas eles são ativos contra uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tornando-os úteis em medicamentos humanos e veterinários. No entanto, o uso de aminoglicosídeos apresenta efeitos secundários adversos, tais como a ototoxicidade e nefrotoxicidade.⁹²

Em vários tipos de fruticulturas, tais como as de maçãs, a estreptomicina foi usada para controlar a infestação bacteriana. O uso de aminoglicosídeos pode oferecer risco devido a sua persistência em alimentos derivados de animais, como leite e carne. Sua estabilidade e alta solubilidade em água (na forma de sais) os tornam potenciais poluentes para as águas de rios e subterrâneas.⁹³

Preocupações devido aos efeitos adversos dos aminoglicosídeos na saúde humana, tais como reações alérgicas, e também a resistência de microorganismo a antibióticos levaram a União Européia a estabelecer os LMRs para diferentes aminoglicosídeos por razões de segurança de alimentos para consumo humano (regulamento (CEE) n. 2377/90 - 2000). Para águas ambientais não há valores específicos para aminoglicosídeos e para outros antibióticos, mas existe uma preocupação geral com o fato de, por exemplo, uma tonelada de gentamicina ser usada na Alemanha para medicina humana e isso não evocar nenhuma contrapartida de informação disponível sobre a sua ocorrência em águas residuais e em outros ambientes aquosos.^{94,95,96}

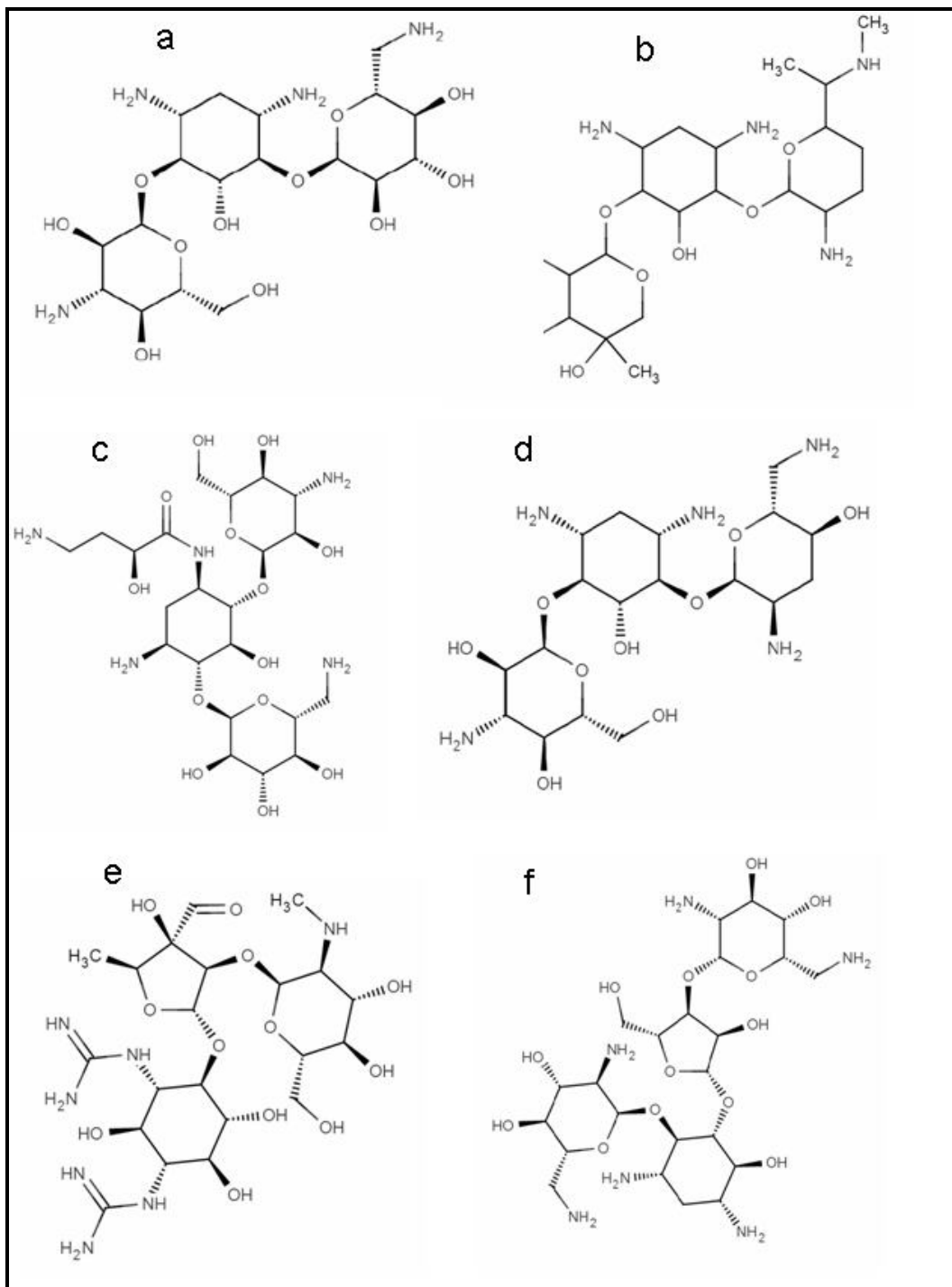


Figura 5: Estrutura dos aminoglicosídeos: (a) canamicina, (b) gentamicina, (c) amicacina, (d) tombramicina, (e) estreptomicina e (f) neomicina.

Devido à estreita janela terapêutica (diferença entre a eficácia e a dose tóxica) dos aminoglicosídeos, o controle cuidadoso da dosagem administrada se faz necessária para evitar efeitos adversos, tais como nefrotoxicidade⁹⁷ e ototoxicidade.^{98,99} Portanto, para uma terapia segura e eficaz, o controle do teor do princípio ativo em formulações farmacêuticas (soluções injetáveis, cremes e

pomadas) é importante, assim como sua determinação em alimentos ou em ambientes aquáticos.

1.2.1.1.

Métodos analíticos para determinação de aminoglicosídeos

Na literatura é possível encontrar vários métodos para determinação de diferentes antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, mas a falta de grupos cromóforos em sua estrutura impossibilita a detecção direta através da absorção de luz ou por meio da fluorescência. A European Pharmacopeia (EP) e a United States Pharmacopeia (USP) exigem a comparação de espectros de infravermelho ou bandas cromatográficas entre um padrão de aminoglicosídeo e a preparação farmacêutica para a identificação dos antibióticos. A quantificação requer a utilização de ensaios microbianos que consomem muito tempo. Esse método não permite a detecção de impurezas desses antibióticos.¹⁰⁰

Canamicina total foi determinada em formulações farmacêuticas em concentrações abaixo de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) utilizando derivatização química. A reação com o reagente de acetilacetona-formaldeído em N, N'-dimetilformamida permitiu a formação de um derivado que absorve fortemente no visível (máximo a 410 nm). Medições de sinal foram baseadas na inclinação da curva de absorção em tempo de reação.¹⁰¹

A determinação de seis antibióticos aminoglicosídeos (canamicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, amicacina e trobamicina) foi realizada após reação de complexação com íons Eu^{3+} nos grupos amino e hidroxila dos aminoglicosídeos. A fluorescência do lantanídeo em 616 nm foi maior após a ligação com aminoglicosídeos, e não afetando a fluorescência do Eu^{3+} em 592 nm. A relação entre esses dois sinais de fluorescência, corrigidos da resposta em função do Eu^{3+} livre, permitiu a detecção de pelo menos $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de canamicina¹⁰². O efeito inibidor da canamicina na reação de lucigenina com peróxido de hidrogênio em solução foi vantajoso, apesar de não ser seletivo para outros aminoglicosídeos. Tal abordagem foi utilizada em um sistema de injeção de fluxo, permitindo uma capacidade de detectar a canamicina em concentrações da ordem de até $10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ em produtos farmacêuticos.¹⁰³

A separação de vários aminoglicosídeos e também a separação da canamicina e seus isômeros, canamicina B, C e D, em diversas amostras (fármacos, vacinas contra a varicela, matérias-primas e meios de cultura de bactérias) foram obtidos por HPLC de fase reversa. Outras fases estacionárias também foram utilizadas, C18 e resina de troca catiônica. A detecção foi realizada por derivação química pré ou pós-coluna com fluoresceína¹⁰⁴, cloroformato de 9-fluorenilmetilo¹⁰⁵ e fenilisocianato¹⁰⁶, a fim de permitir a absorção fotométrica ou detecção por fluorescência com LOD na ordem de ng. Alternativamente, a detecção foi feita por espalhamento de luz (LOD de $2,3 \mu\text{g mL}^{-1}$)¹⁰⁷.

A determinação de canamicina usando nanodispositivos também já foi realizada. A banda de absorção (ressonância plasmônica de superfície) de nanopartículas de ouro foi induzida na região do vermelho na presença de canamicina. Este fenômeno foi utilizado para desenvolver um método para a determinação de canamicina que produziu um LOD de $2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ na análise da urina humana fortificada¹⁰⁸.

A técnica de eletroforese capilar já foi utilizada para a determinação de aminoglicosídeos, geralmente após processo de derivatização química. No trabalho desenvolvido por Flurer¹⁰⁹, a detecção direta dos aminoglicosídeos foi realizada por absorção no UV em 195 nm, após formação de complexo com borato. Segundo o autor, a formação de um complexo de carga negativa entre os aminoglicosídeos e o borato ocorre devido à ligação com o grupo hidroxil. Este trabalho foi baseado nos estudos realizados por Hoffstetter-Khun e colaboradores¹¹⁰ para detecção direta de carboidratos com borato. Para alguns aminoglicosídeos, elevadas concentrações de tampão foram utilizadas. Para determinação de tobramicina foi usado 185 mmol L^{-1} de borato e para amicacina a concentração foi de 175 mmol L^{-1} . A separação de todos os aminoglicosídeos não ocorreu em uma mesma condição e o método não foi aplicado em amostras complexas.

Kaale e colaboradores^{111,112} desenvolveram dois métodos para determinação de canamicina após derivatização prévia com ácido o-ftalaldeído e mercaptoacético para permitir a detecção fotométrica com absorção em 335 nm usando eletroforese capilar (CE). No primeiro trabalho¹¹¹ um planejamento experimental foi aplicado para encontrar as condições do eletrólito de corrida para a separação de um grupo de canamicinas (A, B, C e D). Melhores resultados para

a separação foram obtidos utilizando a eletroforese capilar por zona (CZE) com 30 mM tampão borato em pH 10 contendo 16% v/v de metanol e temperatura mantida constante em 20 °C. O LOQ do método calculado pela razão sinal/ruído (S/N = 10) foi 0,001 g L⁻¹ e o LOD (baseado na razão sinal-ruído, S/N, igual a 3) foi 0,003 g L⁻¹. O método foi aplicado em amostras comerciais de canamicina A. No outro trabalho desenvolvido pelo grupo, as condições do método anterior foram aplicadas em amostra de soro humano para determinação de canamicina A. Um procedimento de SPE com coluna de troca catiônica foi realizado para as amostra de soro de pacientes com tuberculose. Após a derivação previa do analito, foi aplicado um processo de concentração em capilar por empilhamento (*stacking*) do analito. O valor de LOD de 2,0 µg mL⁻¹ foi obtido antes do empilhamento e após o processo, o valor foi para 0,1 µg mL⁻¹.¹¹²

Gentamicina e seus multicomponentes (gentamicina C1, C1a, C2, C2a e C2b) foram determinados utilizando a técnica de CE com pré-derivação utilizando 1,2 dicarboxaldeido ftálico e ácido mercaptoacético. A detecção na região do UV foi realizada em 330 nm. Para a separação foi necessário adicionar ao eletrólito de trabalho β-ciclodextrina. As condições finais foram estabelecidas em 30 mM tetraborato de sódio, 7,5 mM β-ciclodextrina, 12,5 % (v/v) de metanol e o pH foi ajustado para 10.

1.3.

Objetivos

Entre as diversas técnicas cromatográficas a eletroforese capilar é uma técnica de separação de grande importância, pois compostos orgânicos e inorgânicos podem ser determinados. Diferentes aplicações são possíveis devido aos diversos modos de separação que podem ser utilizados, como por exemplo, a eletroforese capilar por zona (CZE) e a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC). Nos últimos anos o problema da baixa sensibilidade da técnica vem sendo contornado pela possibilidade de diferentes acoplamentos para a melhor detecção dos analitos, assim como o uso de estratégias analíticas de introdução e preparo de amostras.

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de novos métodos analíticos utilizando a eletroforese capilar para determinação seletiva de diferentes

analitos (organoestanhos, estrobilurinas e aminoglicosídeos). Diferentes estratégias para a detecção foram utilizadas neste trabalho.

A seguir, são descritos os objetivos específicos para cada método analítico.

1.3.1.

Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico utilizando a CE acoplada ao ICP-MS para determinar organoestanhos (MPT, DPT e TPT) em amostras biológicas:
 - i. Acoplar as técnicas com os cuidados necessários para a melhor eficiência do sistema CE-ICP-MS;
 - ii. Otimizar os parâmetros instrumentais e experimentais para a separação e determinação dos organoestanhos em CE-ICP-MS;
 - iii. Estudar a sensibilidade do método em termos da melhor condição para introdução dos analitos e verificar o melhor tratamento para as amostras;
 - iv. Aplicar o método em amostras biológicas (urina e/ou sangue);
 - v. Determinar os parâmetros analíticos de mérito do método desenvolvido.

- Desenvolver um método analítico utilizando a CE com abordagem de MEKC para determinar pesticidas da classe das estrobilurinas em amostras de sopas infantis industrializadas (papinhas para bebês):
 - i. Otimizar as condições instrumentais e experimentais para a separação e determinação dos pesticidas por MEKC dando continuidade ao trabalho desenvolvido no Mestrado;
 - ii. Estudar a melhor condição para realizar a pré-concentração on-line dos analitos utilizando capilar de caminho óptico estendido para aumentar a sensibilidade do método;
 - iii. Buscar a melhor condição de extração dos pesticidas usando o método QuEChERS nas amostras;

iv. Determinar os parâmetros analíticos de mérito do método desenvolvido.

➤ Estudos para desenvolver um método para determinar aminoglicosídeos com a técnica de CE com detecção de fotoluminescência induzida por laser (CE-LIF).

- i. Verificar as condições de fotoluminescência das nanopartículas de CdTe modificadas com TGA no eletroforese capilar;
- ii. Verificar as condições de interação entre as nanopartículas e os aminoglicosídeos dentro do capilar;
- iii. Otimizar as condições experimentais e instrumentais para obter melhor sinal de fotoluminescência após interação e estudar as condições para a determinação simultânea de vários aminoglicosídeos;
- iv. Estudar a possibilidade de aplicação do método para amostras reais, avaliando alguns parâmetros de mérito do método.

2 Eletroforese Capilar

O processo de eletroforese é definido como o movimento ou migração diferenciada de espécies neutras, iônicas ou ionizáveis pela atração ou repulsão em um campo elétrico. Esta técnica é baseada na aplicação de uma alta diferença de potencial para separar essas espécies dentro de um capilar geralmente de sílica fundida preenchido com uma solução eletrolítica (ou solução tampão).

Eletroforese foi introduzida como uma técnica de separação por Tiselius em 1937, quando este colocou uma mistura de proteínas entre soluções-tampão conectadas por um tubo onde se aplicou uma diferença de potencial. Tiselius percebeu que componentes da amostra migraram em uma direção definida e a uma taxa dependente da carga e da mobilidade dos componentes. Este trabalho rendeu a Tiselius o prêmio Nobel em 1948. Os tubos usados nessa época não dissipavam o calor gerado durante as análises e o uso de tubos capilares veio a solucionar os problemas encontrados por Tiselius relacionados com o efeito Joule. A geometria do capilar (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação de calor, minimizando a convecção e permitindo a aplicação de campos elétricos mais elevados. Como resultado, separações de alta eficiência podem ser conseguidas em tempos curtos e com pequena quantidade de amostra e solventes. Nessa abordagem, denominada de eletroforese capilar, a separação induzida pelo campo elétrico é conduzida em tubos com dimensões capilares (15 a 100 μm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento) preenchido com solução de eletrólito (que pode ser aquoso ou orgânico).^{113,114,115}

A simplicidade instrumental da eletroforese capilar fez aumentar a utilização e aplicação da técnica em química analítica. Hoje vários métodos podem ser encontrados na literatura com uma grande diversificação das aplicações. A CE pode ser considerada uma técnica alternativa e de suporte para HPLC.

2.1.

Instrumentação

A instrumentação da eletroforese capilar pode ser explicada e representada de uma maneira bastante simples (Figura 6). O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, tubo capilar (sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina) e um sistema de detecção apropriado. Para estabelecer o campo elétrico ao longo do capilar, uma fonte de corrente contínua regulável e de alta tensão é usada. A fonte, em geral, pode ser operada em voltagem constante e/ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0 e ± 50 kV e de corrente entre 0 e 200 μ A. Os dois eletrodos de platina fazem o contato entre a fonte de alta tensão e reservatórios que contém solução de um eletrólito de trabalho conveniente. Os capilares de sílica fundida são então preenchidos com a solução e servem como canal de migração dos analitos. As extremidades dos capilares são imersas nos reservatórios da solução para fechar o contato elétrico. Para minimizar os efeitos térmicos, o capilar é mantido à temperatura constante (o sistema deve, portanto ser termostaticado) para esse propósito.^{114,116} O controle do equipamento (diferença de potencial aplicada, temperatura, volume de injeção, sequência de soluções a serem injetadas, etc), aquisição e tratamentos dos dados são realizados através de uma interface com um computador.

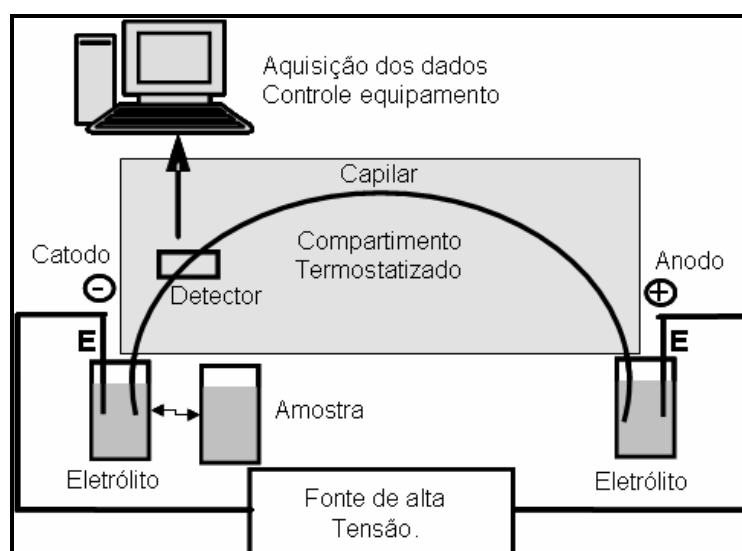


Figura 6: Esquema de um instrumento para eletroforese capilar. E: eletrodo (adaptado da ref. 116).

2.2.

Fundamentos teóricos

2.2.1.

Fluxo eletroosmótico

O movimento da solução eletrolítica dentro do capilar em consequência de um campo elétrico aplicado é denominado fluxo eletroosmótico (EOF, “electroosmotic flow”). EOF é um constituinte importante em eletroforese capilar e, para que ocorra, a parede do capilar precisa estar carregada.^{113,114,115} Em contato com uma solução eletrolítica, a superfície interna do capilar adquire carga, isto devido a dois fenômenos: ionização e adsorção. Em capilares de teflon, o EOF ocorre em função da adsorção dos íons eletricamente carregados da solução eletrolítica na parede interna do capilar.¹¹⁴

Entre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares, a sílica fundida, uma forma pura de dióxido de silício amorfo é a mais utilizada. Esse material confere aos capilares muitas propriedades interessantes, como por exemplo, dimensões precisas, alta condutividade térmica, maleabilidade, resistência ao ataque químico, alta transmitância óptica (190 a 900 nm) além da presença de vários grupos silanol (SiOH) que permitem a ocorrência de intenso EOF. Esses grupos SiOH, em contato com meio aquoso, são ionizados, tornando a superfície do capilar negativamente carregada (SiO⁻), ou possibilitando a adsorção de espécies iônicas. Em ambos os casos, o resultado é o mesmo: surge na camada de solução próxima à superfície do capilar, uma distribuição espacial heterogênea de carga, conhecida como *dupla camada elétrica*^{113,114}.

A dupla camada elétrica é dividida em duas regiões, uma região mais compacta, camada de Stern, formada por íons firmemente ligados à superfície do capilar (são atraídos por forças eletrostáticas e/ou de coesão), e outra região que contém íons que se difundem afastando da superfície e formando a camada difusa. A Figura 7 mostra um esquema da dupla camada elétrica.

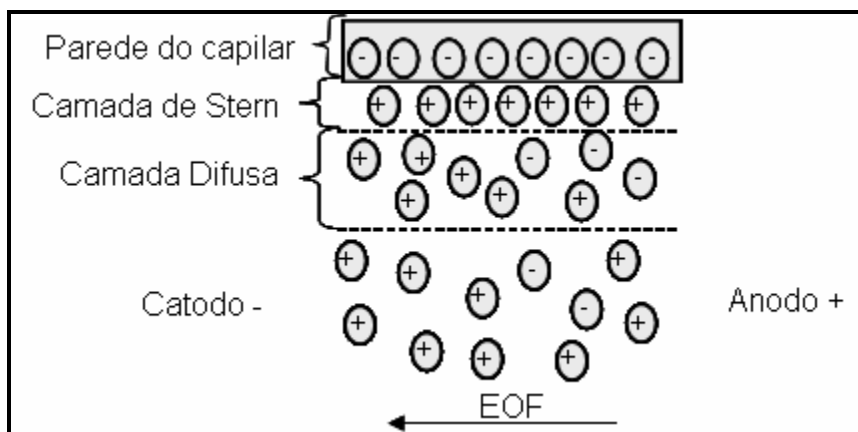


Figura 7: Esquema da dupla camada elétrica no capilar.

Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, causando um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. No caso da parede do capilar estar carregada negativamente (SiO^-), cátions presentes na camada difusa irão migrar para o catodo (eletrodo negativo). Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, esse é o fluxo eletroosmótico¹¹⁴.

2.2.2.

Mobilidade Eletroosmótica

A equação de Helmholtz-Smoluchowski prevê a dependência entre a velocidade linear máxima dos íons na solução (v_{eo} , em cm s^{-1}) e o campo elétrico (E , em V cm^{-1})¹¹⁴. A componente axial do campo é a diferença de potencial (V) aplicada nas extremidades do capilar dividida pelo comprimento total do capilar (L_{tot} , em cm)¹¹⁹.

$$tv_{eo} = - \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \right) E \quad \text{Equação 1}$$

Onde: ϵ_r é a permissividade da solução (usualmente tomada como a permissividade do solvente puro); ϵ_0 é a permissividade do vácuo; ζ é o potencial zeta (V) (gerado pelos contra-íons que se aproximam da dupla camada elétrica para manter o balanço de cargas) e η (N s m^{-2}) é a viscosidade da solução.

A velocidade eletroosmótica pode ser calculada seguindo a Equação 2, o comprimento efetivo da capilar (L_{ef} , cm) dividido pelo de tempo de migração eletroosmótico (t_{eo} , em s)¹¹⁹.

$$v_{eo} = \left(\frac{L_{ef}}{t_{eo}} \right) \quad \text{Equação 2}$$

A constante de proporcionalidade, que representa a mobilidade eletroosmótica (μ_{eo} , em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$), é dada por¹¹⁴:

$$\mu_{eo} = - \left(\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \right) \text{ ou } \mu_{eo} = - \left(\frac{V_{eo}}{E} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Na prática, pode-se determinar o valor da μ_{eo} através da injeção de um analito neutro, conhecendo as dimensões do capilar e a voltagem aplicada (Equação 3).

$$\mu_{eo} = \left(\frac{L_{ef} L_{tot}}{t_{eo} V} \right) \quad \text{Equação 4}$$

A magnitude do EOF muitas vezes precisa ser controlada. Em pH alto, por exemplo, o EOF pode ser muito rápido resultando em eluição do soluto antes de sua separação. Talvez o meio mais efetivo de controle do EOF seja a alteração das propriedades físico-químicas da solução eletrolítica: alterações de pH, da concentração e da força iônica, do tipo e concentração de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, assim como alteração na viscosidade do solvente, constante dielétrica e temperatura.¹¹⁴

A μ_{eo} pode ser otimizada a partir do controle, por exemplo, da força iônica (FI) e do pH da solução de eletrólito. A FI depende da concentração e da carga dos íons em solução (Equação 4).¹¹³

$$FI = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: C_i é a concentração dos íons do eletrólito em mol L^{-1} e Z_i é o número de cargas elementares do íon do eletrólito.

O ζ , definido pela Equação 6, é proporcional à densidade de carga na parede do capilar (espessura da dupla camada (δ)), o qual é dependente do pH. Conseqüentemente, a mobilidade do EOF varia de acordo com o pH do eletrólito. Em soluções de valores de pH alto (maior que nove) os grupos silanóis estão completamente desprotonados, e o EOF é significativamente grande, quando o

valor do pH está abaixo de quatro, a desprotonação dos silanóis é baixa e a mobilidade EOF é insignificante.^{113,114}

Quanto maior a concentração de íons, maior a FI, menor a dupla camada, menor o potencial zeta e, conseqüentemente, menor a μ_{eo} .

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e_a}{\epsilon_r} \quad \text{Equação 6}$$

Quando a v_{eo} é alta, o fluxo é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector. Assim, a análise simultânea de amostra contendo tanto solutos catiônicos, neutros e aniônicos é possível, muito embora não haja discriminação temporal entre diferentes solutos neutros. Além disso, as características de alta eficiência da técnica estão, em parte, vinculadas ao perfil radial de v_{eo} . O perfil linear implica que o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os solutos, independente da sua posição radial.

2.2.3.

Mobilidade Eletroforética

A separação por eletroforese é baseada na diferença das velocidades dos íons no campo elétrico estabelecido. A velocidade eletroforética de cada íon pode ser expressa por:

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad \text{Equação 7}$$

onde v_{ep} é a velocidade de migração do íon (cm s^{-1}), μ_{ep} é a mobilidade do íon ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) e E é a magnitude do campo elétrico (V cm^{-1}).

O íon na presença de um campo elétrico é inicialmente acelerado até que forças de atrito alcancem o valor da força elétrica, de forma a se atingir um estado estacionário, onde o íon continua sua trajetória em velocidade constante. A força elétrica ($F_{elétrica}$) é dada pelo produto que envolve o número de carga elementar do íon (z), a carga elementar de um elétron (e), e o campo elétrico:

$$|F_{elétrica}| = |z|eE \quad \text{Equação 8}$$

A força de atrito (F_{atrito}) pode ser aproximada pela Lei de Stokes, para íons de forma esférica, da seguinte forma:

$$F_{\text{atrito}} = 6\pi\eta r v_{ep} \quad \text{Equação 9}$$

onde η é a viscosidade do meio, r é o raio iônico efetivo da espécie química iônica e v_{ep} é a velocidade do íon.

O retardamento aparece porque a esfera iônica que envolve o íon de interesse possui carga oposta à do íon e, conseqüentemente, tende a migrar em direção oposta. Quando o íon atinge a velocidade final, a resultante de forças é nula, e as forças, elétrica e de atrito, se equivalem:

$$|z|eE = 6\pi\eta r v_{ep} \quad \text{Equação 10}$$

Para efeito de simplificação, a contribuição das forças de retardamento e relaxação ao movimento final do íon será ignorada. Assim, a mobilidade eletroforética pode ser aproximada pela combinação das Equações 1 e 7¹⁴:

$$\mu_{ep} = \frac{|z_{ep}|e}{6\pi\eta r} \quad \text{Equação 11}$$

O produto $|z|e$, tem valor fixo para todos os íons dissociados, como ácidos fortes ou íons pequenos, mas pode ser afetada por mudanças no pH no caso de ácidos ou bases fracas. O raio iônico pode ser afetado pelo contra-íon presente ou por algum agente complexante. Na equação acima, pode-se ver que diferenças na mobilidade eletroforética dos íons podem ser decorrentes de diferenças na razão carga/raio das espécies químicas

A μ_{ep} de um analito se soma a μ_{eo} e o que obtemos no eletroferograma é a mobilidade observada (μ_{obs}) (Equação 12). Na prática pode-se determinar o valor da μ_{obs} pela injeção de uma solução contendo o analito de interesse (Equação 13).

$$\mu_{obs} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \quad \text{Equação 12}$$

$$\mu_{obs} = \left(\frac{L_{ef} L_{tot}}{t_m V} \right) \quad \text{Equação 13}$$

Onde t_m é o tempo de migração do analito de interesse, que corresponde ao tempo que o analito levou para percorrer o caminho efetivo do capilar (L_{ef} , distância entre os pontos de injeção e a detecção).

A Figura mostra a separação de uma amostra contendo analitos neutros e íons de diferentes tamanhos e cargas sob EOF normal (em direção ao catodo). Cátions de maior carga e menor tamanho movem-se mais rápido, os compostos

neutros migram com velocidade do EOF, e os ânions, em função da magnitude das μ_{ep} e μ_{eo} , podem ser arrastados em direção ao detector pelo EOF.

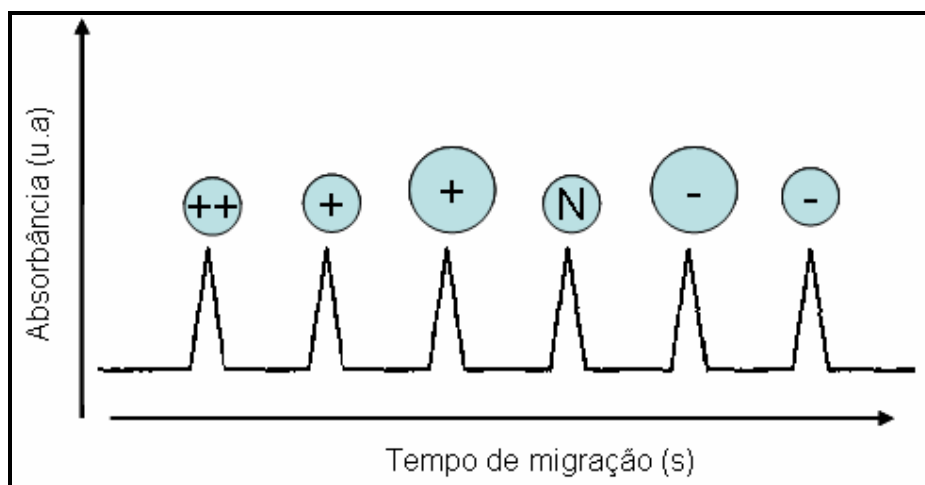


Figura 8: Representação esquemática de um eletroferograma de uma solução com analitos neutros e iônicos de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.

2.2.4.

Mobilidade Efetiva

A mobilidade efetiva (μ_{ef}) de um analito é a somatória das mobilidades eletroforéticas (μ_{epi}) de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos (ionizadas e não-ionizadas), multiplicadas pela fração molar do analito sob cada forma química (α_j):

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_{epi} \quad \text{Equação 14}$$

Experimentalmente pode-se calcular a μ_{ef} através da realização de uma análise para cada analito de interesse. Os dados necessários para o cálculo da μ_{eo} (Equação 4) e da μ_{obs} (Equação 13) são: tempo de migração do analito e do EOF, voltagem aplicada e dimensões do capilar. Posteriormente, a μ_{ep} é calculada pela Equação 12. Em seguida é necessário calcular o grau de dissociação (α) para cada analito. Após a determinação desses valores, pode se calcular a μ_{ef} de um analito (Equação 14), que é a definição clássica de Tiselius.¹¹⁴

Um gráfico de μ_{ef} versus pH pode ser construído depois dos cálculos de μ_{ef} , que é denominado curva de mobilidade efetiva. Estas curvas indicam o valor ideal de pH para que possa ocorrer a separação entre os analitos, ou seja, qual pH em que as diferenças entre μ_{ef} dos analitos são maximizados.^{114,117,118}

2.2.5.

Introdução de amostras

Em eletroforese, pequenos volumes de amostra são introduzidos no capilar para manter a alta eficiência na separação. O comprimento do volume de amostra dentro do capilar é um parâmetro crítico em relação ao volume injetado.¹¹⁴ O modo de injeção da amostra no capilar tem implicação direta em análise quantitativa. A reprodutibilidade da área do pico, ou altura, reflete a precisão da técnica de injeção. As amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos.

Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do compartimento do capilar por um período de tempo conhecido. A quantidade de amostra injetada depende da μ_{ep} do analito, das condutividades da amostra e do eletrólito, assim como do EOF. Componentes da amostra são discriminados em função de suas μ_{ep} . A quantidade de amostra introduzida pode ser determinada pela Equação 15:

$$Q_{inj} = \frac{V\pi r^2 C_a t (\mu_{ep} + \mu_{eo})}{L_{tot}} \quad \text{Equação 15}$$

Onde: V é a diferença de potencial voltagem aplicada, em V; C_a é a concentração do analito, em mol L⁻¹; t é o tempo em que a voltagem foi aplicada, em s; r é o raio interno do capilar, em μm ; μ_{ep} é a mobilidade eletroforética do soluto, em cm² V⁻¹ s⁻¹; μ_{eo} é a mobilidade do EOF, em cm² V⁻¹ s⁻¹; L_{tot} é o comprimento total do capilar, em cm.

Para realizar a injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão que pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é

elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonação.^{114,116} O volume introduzido irá depender do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade de solução eletrolítica e da diferença de pressão estabelecida. O volume (v_{inj}) em nL, por pressurização ou vácuo pode ser calculado pela Equação 16 e por gravidade pela Equação 17.

$$v_{inj} = \frac{\Delta P d_j^4 \pi t}{8 \eta L_{tot}} \quad \text{Equação 16}$$

Onde: ΔP é a diferença de pressão aplicada, em mbar; d_i é o diâmetro interno do capilar, em μm ; t é o tempo de pressão aplicada, em s; η é a viscosidade da solução de amostra, em N s m^{-2} ; L_{tot} é o comprimento total do capilar, em cm.

$$v_{inj} = \frac{2,84 \times 10^{-8} h t d_i^4}{L_{tot}} \quad \text{Equação 17}$$

Onde: h é a altura que o reservatório de amostra é elevado, em mm; t é o tempo em que o reservatório de amostra permanece elevado, em s; d_i é o diâmetro interno do capilar, em μm ; L_{tot} é o comprimento total do capilar, em cm.

2.3.

Métodos de Separação

Uma característica importante da eletroforese capilar é a variedade nos modos de separação que podem ser efetuados na coluna capilar, o que permite a separação de uma grande variedade de compostos carregados ou neutros. Entre os vários modos de separação destacam-se: (i) eletroforese capilar de zona (CZE, “capillary zone electrophoresis”) ou em solução livre (FSCE, free solution capillary electrophoresis”), (ii) cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, “micellar electrokinetic chromatography”) ou cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECC, “micelar electrokinetic capillary chromatography”), (iii) eletroforese capilar em gel (CGE, “capillary gel electrophoresis”), (iv) eletrocromatografia capilar (CEC, “capillary electrochromatography”)¹¹⁹. Neste trabalho será discutido a eletroforese capilar de zona e a cromatografia eletrocinética micelar.

2.3.1.

Eletoforese Capilar de Zona (CZE)

O mais versátil e simples dos modos de CE é a eletroforese capilar de zona, por essa razão é a técnica de separação mais usada com ampla faixa de aplicação. O mecanismo de separação envolvido em CZE permite a separação de uma mistura de cátions e ânions em uma mesma corrida, analitos neutros neste modo tem o mesmo tempo de migração e não podem ser resolvidos^{113,120}.

Em CZE, o capilar e os vials (frasco para solução), onde será aplicada a diferença de potencial, são preenchidos com eletrólitos (solução tampão) de mesma composição. A amostra é injetada geralmente no lado do anodo do capilar em pequena quantidade (banda de pequena espessura). Em condições normais o EOF segue do anodo para o catodo (Figura 9). Quando uma voltagem é aplicada, a amostra move através do capilar pela ação do EOF e analitos são separados em zonas com diferentes velocidades de migração, de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. Em condições onde o EOF é suficiente, todos os componentes da amostra irão migrar na mesma direção. A ordem de migração é determinada pela razão carga/raio dos analitos. Contudo, quando íons de carga oposta estão presentes, eles serão atraídos pelo lado de carga oposta do capilar, cátions pequenos altamente carregados migram mais rápidos na frente do EOF e ânions pequenos altamente carregados migram lentamente. Substâncias neutras migram na mesma velocidade do EOF e não é possível separá-las¹¹³.

Para que ocorra a separação em CZE é necessário maximizar as diferenças entre as μ_{ep} dos analitos e minimizar as causas de alargamento de bandas¹²⁰.

A resolução (R), o número de pratos (N) e o tempo de migração (t_m) em CZE são descritos pelas equações abaixo:

$$R_{s_i, i+1} = \frac{1}{4\sqrt{2}} (\mu_i - \mu_{i+1}) \left(\frac{V}{D(\mu_{média} + \mu_{osm})} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 18}$$

$$N = \frac{L_{ef}(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2DL_{tot}} \quad \text{Equação 19}$$

$$t_m = \frac{L_{ef}L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad \text{Equação 20}$$

Onde: μ_i e μ_{i+1} são as mobilidades observadas de dois analitos migrando em posições adjacentes, $\mu_{\text{média}}$ é a mobilidade média dos analitos, μ_{ep} é a mobilidade eletroforética dos analitos, μ_{eo} é a mobilidade do EOF, em $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$; D é a média dos coeficientes de difusão dos dois analitos; V é a diferença de potencial aplicada, em V; L_{ef} é o comprimento efetivo do capilar, em cm; L_{tot} é o comprimento total do capilar, em cm.

Os três parâmetros, R , N e t_m , determinam a eficiência da separação e a única causa de alargamento de banda considerada é a difusão. R verifica o quanto as substâncias de uma mistura estão separadas e N estima a dispersão que o analito sofre em função do tempo necessário para que ocorra a separação.

As equações acima indicam que o uso de voltagens elevadas implica em redução do tempo de análise e ganho de resolução e número de pratos. Em separações difíceis, um ajuste no EOF pode resultar em um ganho de resolução. Quando a μ_{eo} for aproximadamente igual, mas de sinal oposto à mobilidade dos analitos, um ganho de resolução é alcançado, mas ocorrerá perda de N e aumento do t_m (Equações 19 e 20).

A aplicação das equações 18 a 20 é difícil em função da necessidade do coeficiente de difusão do analito. Uma boa aproximação é o uso de equações clássicas para cromatografia (Equações 21 e 22).

$$R = \frac{2(t_{mi} - t_{mi+1})}{(w_i + w_{i+1})} \quad \text{Equação 21}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad \text{Equação 22}$$

Onde: t_m é o tempo de migração do analito, em s; w é a altura do pico, medida na base do pico, em s; t_{mi} e t_{mi+1} são os tempos de migração de dois solutos adjacentes, em s; w_i e w_{i+1} são as larguras dos picos de dois solutos adjacentes, medida na base do pico, em s.

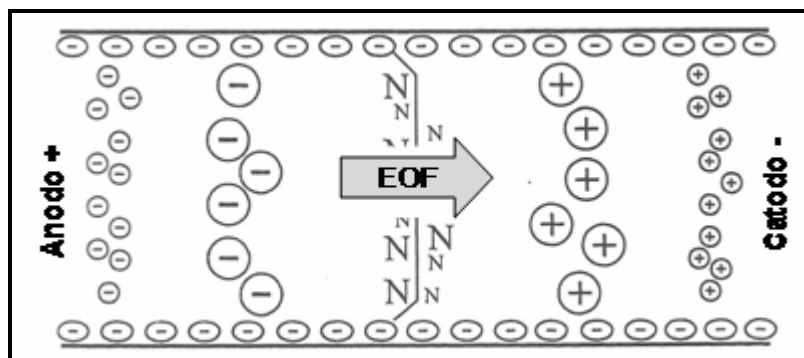


Figura 9: Esquema representativo da separação por CZE, N = analitos neutros (adaptado ref. 116).

2.3.1.1.

Eletrólito (Solução tampão)

A μ_{ep} (Equação 11) depende do pH do eletrólito para os analitos com caráter ácido-base. Neste caso, o termo mobilidade efetiva, μ_{ef} , o qual incorpora o produto das μ_{ep} das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado, é empregado. Assim o controle do pH é aconselhável e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação¹²⁰.

O EOF sofre variações devido a mudanças no pH, então, um tampão deve ter alta capacidade tamponante. Outras propriedades desejáveis para um sistema tampão incluem: baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise, e baixa mobilidade, para minimizar a geração de calor por efeito Joule. O formato da banda está vinculado ao tampão, pois tampões contendo íons com mobilidade semelhante à do soluto previnem distorções e minimizam o seu alargamento¹²⁰.

Os sistemas tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao pK_a , mais ou menos uma unidade. Em capilares de sílica fundida, o intervalo de pH adequado para trabalho varia entre 2 e 11, mas em geral este intervalo é limitado pela estabilidade do soluto. A concentração das soluções tampões usadas em CE varia tipicamente entre 5 e 200 mmol L⁻¹. A escolha da concentração deve ser feita considerando vários efeitos. Altas concentrações podem comprometer a separação pelo excesso de calor decorrente do efeito Joule. Baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar e,

portanto, ocasionar alargamento e distorção das bandas. Adicionalmente, em baixas concentrações, o fluxo eletrosmótico pode se tornar errático, o que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração e conseqüentemente prejudica a separação dos solutos¹²⁰.

2.3.1.2.

Aditivos

Em CZE o uso de eletrólito aditivado é bastante comum. Vários aditivos podem ser utilizados e em diferentes situações, como por exemplo, para alterar a mobilidade do soluto (metais de transição); modificar o EOF (glicóis, polímeros de celulose, sais inorgânicos, solventes orgânicos, tensoativos catiônicos); solubilizar solutos (glicóis, solventes orgânicos, uréia) e reduzir a interação de certos analitos com a parede interna do capilar, minimizando efeitos de adsorção (aminas, anfólitos, glicóis, sais inorgânicos, solvente orgânico). Outro aditivo muito utilizado são os agentes complexantes que auxiliam na separação de analitos neutros e metais (ciclodextrinas e éter coroa)¹²⁰.

2.3.2.

Cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC)

Os métodos eletroforéticos em CZE são limitados à separação de compostos que contém carga ou apresentam grande diferença em suas massas moleculares. MEKC é o único modo de CE que é capaz de separar, tanto os compostos neutros quanto os carregados, sendo introduzida em 1984 por Terabe e colaboradores¹²¹.

A cromatografia eletrocínética (EKC) pertence a uma família de técnicas de separação com eletromigração, que envolve fenômenos eletrocínéticos (eletroforese e eletrosmose) na separação de constituintes da amostra. Em EKC, o equilíbrio químico (distribuição, troca iônica, formação de complexo e partição) é componente importante do processo de separação. De acordo com Terabe e colaboradores,¹²² EKC é definida como uma técnica de separação com eletromigração em capilar, envolvendo uma fase denominada pseudo-estacionária responsável pela separação. A fase pseudo-estacionária é uma unidade (por exemplo, uma micela ou um polímero dissolvido) que interage com o soluto, não afetando sua velocidade de migração. Por recomendação da IUPAC, EKC é

definida como uma técnica de separação baseada na combinação de eletroforese e interações do analito com aditivos (por exemplo, surfactantes), os quais formam uma fase dispersa (secundária) que se move com velocidade diferente do analito. Para conseguir a separação dos analitos, essa fase secundária deve ser carregada. MEKC é um caso especial de EKC, na qual a fase secundária é uma fase micelar dispersa no capilar¹²¹.

Em MEKC, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando assim um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto as micelas representam a fase pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose. Solutos neutros com diferentes coeficientes de partição (P_{mw}) entre a fase aquosa (eletrólito) e a fase micelar podem ser separados¹²¹ (Figura 10). Em MEKC existe um limite de eluição, chamado janela de eluição, que é definido pelo tempo de eluição do EOF (t_{eo}) e o tempo de migração das micelas (t_{mc}). MEKC pode ser visto como híbrido da cromatografia líquida de fase reversa e CZE, com um processo de separação tendo interações hidrofóbicas e polares, mecanismo de partição e eletromigração. MEKC oferece uma combinação de fatores de CZE e cromatografia líquida, como a alta eficiência, curtos tempos de análise, pequeno volume de amostra e o consumo muito reduzido de solvente¹¹³.

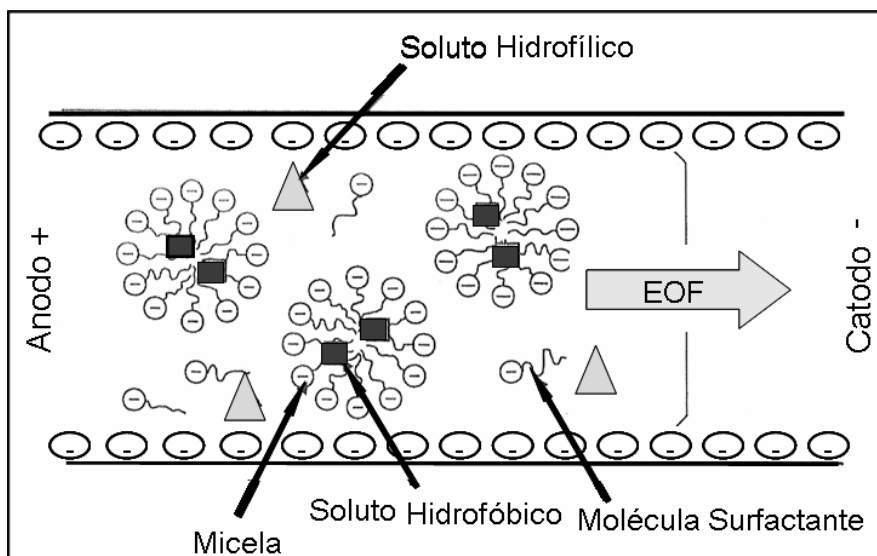


Figura 10: Esquema representativo da separação por MEKC usando micelas aniônicas (adaptado da ref.¹¹⁶).

2.3.2.1.

Micelas

Surfactantes são moléculas anfifílicas que contêm grupamentos com caráter hidrofóbico (cauda apolar) e hidrofílico (“cabeça” polar ou iônica). Eles podem ser reconhecidos pela parte hidrofílica, como surfactante aniônico, catiônico, neutro ou anfotérico; ou pelas características da parte orgânica (hidrofóbica). Os surfactantes têm, em geral, a propriedade de formar micelas quando estão em concentração superior a um valor crítico, denominada concentração micelar crítica (CMC). As micelas estão sempre em equilíbrio com os monômeros (moléculas de surfactantes) presentes em solução. O número de monômero e tamanho das micelas varia entre os tipos de surfactantes. O processo de formação de micelas por surfactantes em meio aquoso ocorre do fato da redução da interação hidrocarboneto-água ser energeticamente favorável. A CMC na qual a agregação ocorre reflete o fato de que interações hidrofóbicas entre a parte apolar das moléculas do surfactante é balanceada pela hidratação e pela repulsão eletrostática do grupo hidrofílico¹¹³.

Os surfactantes que apresentam altos valores de CMC são inadequados para MEKC, pois as micelas formadas coexistem com grandes quantidades de monômero livre, o que representa uma sobrecarga térmica (aumento de calor a ser dissipado pelo capilar)¹¹⁴.

O surfactante utilizado para formação de micelas nesse trabalho foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico. As micelas aniônicas têm mobilidade eletroforética em sentido contrário ao do EOF normal, com isso sua velocidade de migração é diferente da solução eletrolítica, o que favorece a interação analito-micela. Para o sucesso da separação é necessário que essa interação seja diferente para os diversos solutos¹¹⁴.

2.3.2.2.

Migração em MEKC

Como citado, micelas aniônicas migram em direção oposta ao EOF em um capilar de sílica. Tipicamente em capilares de sílica fundida e em pH maior que 6, a v_{eo} é maior que a velocidade eletroforética das micelas aniônicas. Como resultado, as micelas são carregadas para o catodo. Quando micelas catiônicas são

usadas, a parede do capilar é recoberta com surfactante positivamente carregado para inverter o EOF, e conseqüentemente, a polaridade dos eletrodos também deve ser invertida para permitir a eluição das micelas dentro da janela de eluição. Existem dois extremos que definem uma janela de eluição em MEKC. O extremo t_{eo} é marcado por analitos que não interagem com as micelas ($P_{mw} \sim 0$) e que passam todo o tempo de migração na fase aquosa, migrando com mobilidade eletrosmótica. O outro extremo t_{mc} é definido pela eluição de analitos que interagem fortemente com as micelas e ($P_{mw} \sim \infty$). Esses compostos são muito hidrofóbicos e seus tempos de migração coincidem com o tempo de migração das micelas (t_{mc}). A existência da janela de eluição limita a capacidade de pico em MEKC, já que todos os analitos neutros devem ser separados entre os tempos t_{eo} e t_{mc} . O tamanho da janela de eluição pode ser alterado pela adição de modificadores orgânicos, misturas de micelas ou pela modificação da parede do capilar¹¹³.

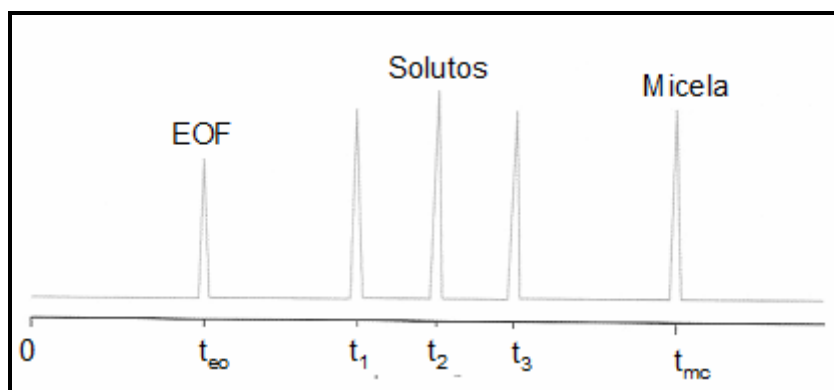


Figura 11: Esquema de um eletroferograma mostrando a janela de eluição em MEKC¹¹⁶.

As equações fundamentais da cromatografia não são estritamente aplicáveis à eletrocromatografia micelar, o fator de capacidade de um soluto (quantidade de um soluto presente na fase estacionária em relação à presente na fase móvel), k' , é expresso como:

$$k' = \frac{t_r - t_{eo}}{t_{eo} \left[1 - \left(\frac{t_r}{t_{mc}} \right) \right]} \quad \text{Equação 23}$$

Onde: t_r é o tempo de migração do analito, t_{eo} o tempo de migração do EOF e t_{mc} o tempo de migração das micelas¹²⁰.

Esta expressão é muito similar à equação para fator de retenção em cromatografia convencional, com a exceção do termo adicional $[1 - (t_r / t_{mc})]$ no denominador. Este termo indica a existência de uma janela de eluição, porque a fase “estacionária” em MEKC é também móvel. Se t_{mc} tender a infinito (micela estacionária), o termo extra no denominador é omitido e o fator de retenção é o mesmo da cromatografia convencional^{113,120}.

O cálculo do fator de capacidade de um determinado soluto depende do conhecimento de t_{eo} e t_{mc} . Para t_{eo} é necessário injetar um soluto neutro, que não seja retido pela micela. Metanol, acetona ou formamida, podem ser usados para esta finalidade. Já para a medida de t_{mc} , é necessário determinar o tempo de migração de um soluto permanentemente retido no interior da micela. Corantes solúveis em água, como o Sudan II, podem ser usado.

A janela de eluição em MEKC também altera a expressão para a resolução (Equação 24).

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left[\frac{1 - (t_{eo} / t_{mc})}{1 + (t_{eo} / t_{mc})k'_1} \right] \quad \text{Equação 24}$$

Onde N é o número de pratos teóricos, k'_1 e k'_2 são os fatores de retenção de dois analitos com eluição adjacentes e α é o fator de seletividade dado por k'_1/k'_2 ^{113,120}.

Novamente a Equação 24 difere da equação de resolução para cromatografia convencional apenas pela inclusão do último termo, o qual se refere à existência da janela de detecção. A migração da micela inserida no capilar causa redução do tamanho efetivo da coluna (capilar). Se t_{mc} tender ao infinito, o último termo da equação será igual à unidade e a expressão da resolução é simplificada para aquela definida para cromatografia convencional^{113,120}.

Em cromatografia, a resolução aumenta com o aumento do fator de retenção. Em MEKC, entretanto, a relação entre R_s e k' não é intuitiva, devido ao último termo da equação, que de fato diminui com o aumento de k' . A resolução passa por um máximo, para valores de k' entre 1 e 5. O valor ótimo depende do intervalo de eluição. Quando a velocidade de migração da micela e a velocidade eletroosmótica têm magnitudes aproximadas, mas direções opostas, o intervalo de eluição pode ser estendido e o valor ótimo de k' aumentado. No entanto, sob estas condições, a reprodutibilidade dos tempos de eluição pode ser

comprometida. Em geral, a redução dos valores de k' dos últimos componentes da mistura é necessária para melhorar a resolução. Um aumento de t_{mc} relativo a t_r é suficiente para diminuir k' . O tempo de eluição da fase micelar é determinado pela velocidade aparente da micela, v_M , que por sua vez, é a soma vetorial das velocidades eletroosmótica (v_{osm}) e eletroforética da micela (v_{eM}).

$$v_M = v_{osm} + v_{eM} \quad \text{Equação 25}$$

$$v_{osm} = -\frac{\epsilon\epsilon_0\zeta}{\eta} E \quad \text{Equação 26}$$

$$v_{eM} = \frac{2\epsilon\epsilon_0\zeta}{3\eta} f(ka)E \quad \text{Equação 27}$$

Onde ζ é o potencial zeta da superfície do capilar, ζ_0 é o potencial zeta da superfície micelar, $f(ka)$ é uma função do tamanho e forma da micela, ϵ_0 é a permitividade do vácuo, ϵ é a constante dielétrica, η é a viscosidade do meio, E é o campo elétrico¹²⁰.

Em condições de rotina (micela aniônica, $pH > 5$), a v_{osm} é maior que v_{eM} . Dessa forma, uma diminuição do potencial zeta do capilar irá reduzir tanto v_{osm} quanto v_{eM} . Isto produz o efeito desejado de aumento de t_{mc} relativo a t_r . Além disso, desde que o fator t_{eo}/t_{mc} diminui, o valor de resolução ótima aumenta, deslocando-se para valores maiores de k' . Estratégias para diminuição do potencial zeta do capilar e, conseqüentemente, o EOF, já foram citadas anteriormente e podem ser utilizadas, como o revestimento do capilar, alterações das propriedades físico-químicas da solução (pH , força iônica, viscosidade e constante dielétrica)¹²⁰.

O fator de retenção de um soluto é o produto do coeficiente de partição, K , e a razão entre as fases, β (razão entre os volumes da fase estacionária e fase móvel):

$$k' = \beta K \quad \text{Equação 28}$$

Em cromatografia líquida de fase reversa, a incorporação de solventes na fase móvel afeta os valores de k' , pois afeta o coeficiente de partição. Em MEKC, a situação é diferente, o solvente orgânico afeta não só K , mas também β . Solventes orgânicos alteram a CMC e, portanto, o volume micelar. Além disso, a adição de solventes orgânicos altera a viscosidade e a constante dielétrica da fase

móvel e, conseqüentemente, o potencial zeta do capilar, resultando na variação da velocidade eletrosmótica. Metanol, isopropanol e acetonitrila são alguns dos solventes (aditivos) utilizados para amplificar o intervalo de tempos de eluição. Em geral, a redução do fator de capacidade dos solutos que eluem por último é conseguida à custa de longos tempos de análise¹²⁰.

Em MEKC, a capacidade de picos (n) é dada pela seguinte expressão:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{mc}}{t_{eo}} \quad (\text{Equação 29})$$

Em geral, se nenhum procedimento é usado para estender o intervalo de eluição, um número de aproximadamente 100 solutos, assumindo $t_{eo}/t_{mc} = 0,3$ e $N = 10^5$, poderia ser separado por MEKC, esse número é pequeno em relação ao número de pratos considerado. Com outras técnicas que não têm a limitação da janela de eluição, esse número de solutos separados seria maior¹¹³.

Eficiência é a medida do alargamento de banda que ocorre durante a separação. Os termos definidos para cromatografia foram transferidos para métodos de separação em eletromigração capilar. A altura equivalente de um prato teórico (altura do prato) H corresponde à variância do pico (em unidades de comprimento) dividida pela distância de migração. O número de pratos N é a distância que foi migrada dividida pela altura do prato. Em EKC com parâmetros experimentais padrões, um número de pratos de 200.000 a 300.000 pode ser obtido¹²¹.

Em MEKC, a variância da zona do soluto resultante de difusão longitudinal é proporcional ao coeficiente de difusão do soluto e ao tempo de migração. O soluto tem a difusão na fase móvel e a difusão na fase micelar. Os solutos que apresentam altos valores de K ficam muito tempo no interior da micela, que por sua vez migra lentamente. Esses solutos levam mais tempo para eluir do capilar e as bandas são mais vulneráveis ao alargamento gerado por difusão. Outro fator que pode produzir bandas largas é a variação de tamanho das micelas com tempo, em decorrência do equilíbrio de troca entre o monômero e a micela. A mobilidade eletroforética da micela é determinada por fatores como tamanho e forma, os quais dependem do número de agregação. Surfactantes que geram micelas em um amplo intervalo de tamanhos e formas podem não ser adequados para MEKC. Solutos interagindo com micelas de diferentes tamanhos exibem um amplo intervalo de velocidades de migração e podem produzir bandas largas. Um

aumento da concentração do surfactante, assim como um aumento da temperatura, pode contribuir para acelerar o processo de troca entre micela e monômero, melhorando a eficiência da separação. Outro efeito relacionado com a resistência à transferência de massa entre as fases pseudo-estacionária e móvel também podem ocorrer em MEKC. Em geral, baixas voltagens e altos coeficientes de difusão do soluto minimizam estes efeitos. No entanto, devido à natureza das forças envolvidas, o processo de partição entre solutos polares ou iônicos e a micela pode apresentar uma cinética lenta, e causar o alargamento de bandas. Resistência da transferência de massa na fase móvel envolve dois processos distintos: difusão intermicelar e intracoluna. O efeito intermicelar ocorre porque a difusão do soluto entre as micelas é um processo lento. Mesmo em concentrações moderadas de surfactantes, a distância entre as micelas é extremamente pequena, dificultando a passagem do soluto. As micelas constituem uma fase secundária mais uniforme e homogeneamente dispersa (devido à repulsão de cargas entre as micelas) e têm dimensões menores que as partículas usadas nas colunas empacotadas. Devido à quase perfeita distribuição de micelas e sua natureza fluídica, diferenças de percurso na migração dos solutos são praticamente eliminadas, explicando-se assim a maior eficiência obtida nas separações por MEKC. A transferência de massa intracoluna é lenta e contribui para o alargamento das bandas somente se existir um gradiente de velocidade radial no capilar. Tais gradientes podem ser originados apenas por efeitos térmicos, já que a natureza do fluxo eletroosmótico, constância do perfil radial da velocidade, minimiza esta fonte de dispersão¹²⁰.

2.3.3.

Concentração dos analitos no capilar

A técnica de eletroforese capilar tem como principal desvantagem a baixa sensibilidade devido às dimensões da coluna de separação (capilar). Melhores sensibilidades podem ser obtidas alterando o sistema de detecção, com o uso de técnicas de alta sensibilidade (por exemplo, a fluorescência induzida por laser), instalação de cela de detecção em formato-Z ou o uso de capilares com caminho óptico estendido. A outra forma de aumentar a sensibilidade é através do uso de processos de pré-concentração da amostra no capilar (on-line)¹²³.

Diferentes procedimentos podem ser utilizados para pré-concentração on-line dos analitos, como por exemplo, os métodos de “*stacking*” e “*sweeping*”. Nos dois métodos, a zona do analito é concentrada em uma pequena região devido às mudanças realizadas na solução do eletrólito e amostra. Para o modo normal de “*stacking*” (NSM), os analitos preparados em uma matriz de baixa condutividade são injetados para dentro do capilar preenchido com eletrólito de alta condutividade. A diferença de potencial é então aplicada e, devido à diferença de condutividade, o campo elétrico será mais forte na região da amostra que no resto da capilar. Os íons inseridos na região de baixa condutividade experimentam alta força do campo elétrico e movem com alta velocidade. Uma vez que íons atingem a fronteira entre amostra e eletrólito eles experimentam uma menor força do campo elétrico (região do eletrólito) e migram lentamente, ocorrendo o “*stacking*” (empilhamento) dos analitos em uma estreita região. Para “*stacking*” de moléculas neutras em MEKC, quando uma voltagem positiva é aplicada, micelas carregadas negativamente presentes no eletrólito migram para o anodo. Elas entram na zona da amostra de menor condutividade e aumentam sua velocidade de migração gerando o *stacking*. Se os analitos interagem com as micelas, eles também serão pré-concentrados (empilhados)^{123,124,125}. Depois do processo de pré-concentração a separação ocorre normalmente.

No método “*sweeping*”, analitos são acumulados por uma fase pseudo-estacionária, como por exemplo, micelas carregadas que penetram ou enchem a região da amostra dentro do capilar durante a aplicação de uma alta-voltagem. A condição fundamental para “*sweeping*” é a matriz da amostra estar livre de fase pseudo-estacionária. A diferença entre condutividade da amostra e eletrólito de trabalho não tem influência neste processo de pré-concentração on-line. O processo de “*sweeping*” ocorre devido à partição ou interação dos analitos com a fase pseudo-estacionária. A pré-concentração não ocorre sem o processo de eletroforese que é responsável pelo movimento da fase pseudo-estacionária carregada para dentro da região da amostra^{126,127}.

Neste trabalho, testes para pré-concentração da amostra no capilar foram sempre realizados para melhorar a detecção dos analitos quando utilizado a detecção fotométrica.

2.3.4.

Detecção em CE

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores. Na eletroforese capilar estão disponíveis detectores que são, basicamente, a adaptação dos detectores utilizados nos equipamentos de cromatografia líquida para o formato capilar, e tempo de resposta rápido. Tais detectores podem ser de: absorção no UV-Vis, fluorescência, espectrometria de massas, condutividade, amperometria, radioatividade, índice de refração e Raman. A escolha do detector depende exclusivamente das propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração a ser contemplada¹¹³.

Quando os analitos não respondem ao tipo de detecção disponível, como por exemplo, absorção UV-Vis ou fluorescência, existe a possibilidade de detectá-los com o uso da detecção indireta ou pela derivação química (antes ou após a introdução no capilar). Na detecção indireta, muito utilizada para determinação de cátions e ânions, um cromóforo ou fluoróforo é adicionado ao eletrólito de corrida e a detecção e quantificação são realizadas pela queda de sinal. A detecção também pode ocorrer pela adição de agentes complexantes ao eletrólito de corrida^{128, 129}.

Neste trabalho diferentes detectores foram utilizados na determinação dos analitos de interesse e serão discutidos em maiores detalhes.

2.3.4.1.

Absorção no UV-Vis

Como em HPLC, a detecção espectrofotométrica de absorção na região do UV-Vis é a mais utilizada em CE. Com capilares de sílica fundida, a transparência entre 190 e 900 nm é alcançada. A alta eficiência observada em CE é decorrente, em parte, da detecção direta no capilar, pois a janela óptica é feita pela remoção do material que recobre o capilar. Desse modo, a detecção acontece no momento onde a separação das espécies ainda está ocorrendo, ao contrário da cromatografia líquida, onde a detecção é feita após o processo de separação que termina quando as espécies deixam a coluna cromatográfica e seguem para o detector. Como todos

os detectores ópticos, a largura da região de detecção deve ser relativamente pequena em relação à zona da amostra para manter a alta resolução. Isto é compatível com as dimensões do capilar. Os picos em CE são de 2 a 5 mm de largura, o tamanho da região de detecção deve ser no máximo um terço desse valor. O design do detector é crítico devido ao curto caminho óptico. O feixe óptico deve ser firmemente focado no capilar para obter máximo sinal e minimizar a luz dispersa que alcança o detector. Estes aspectos são importantes para ambas, sensibilidade e faixa linear de detecção¹¹⁵. No caso da sensibilidade, a dimensão do capilar impõe um fator limitante na lei de Beer-Lambert ($A = \epsilon bc$, onde “A” é absorvância, “ ϵ ” é a absorvidade molar da espécie absorvente, “b” é comprimento do caminho óptico que a luz percorre na amostra e “c” é a concentração de analito). No caso da CE, o parâmetro “b” é pequeno, impondo limites na detecção.

Para uma molécula ser detectada por absorção no UV-vis, ela precisa possuir grupos cromóforos (grupo funcional que absorve radiação no UV-vis do espectro eletromagnético). A detecção de um analito que não possui um cromóforo ou que absorve pouco nessa região pode ser feita após a derivatização da molécula (inclusão de grupos cromóforos na estrutura do analito), ou por método de detecção indireta (o cromóforo está presente no eletrólito de corrida). A lei de Beer-Lambert é beneficiada quando se trabalha com analitos com valores de ϵ da ordem de 10^4 a 10^5 L mol⁻¹ cm⁻¹. Adicionalmente, o pH, a composição do eletrólito de corrida e o grau de ionização do analito são também fatores importantes, pois estes podem ocasionar mudanças nos valores da absorvidade molar e deslocamento no comprimento de onda máximo. Limites de detecção na ordem de 10^{-5} – 10^{-6} mol L⁻¹ são típicos em CE com detecção fotométrica na região do UV-Vis¹¹³.

2.3.4.2.

Fluorescência

O segundo e mais comum método de detecção em CE é a fluorescência devido à alta sensibilidade que pode ser obtida. Quando uma molécula não apresenta características fluorescentes vários métodos podem ser utilizados para

procedimentos de derivatização ou conversão de analitos não fluorescentes em moléculas detectáveis¹¹³.

A luminescência estimulada pela absorção de radiação é denominada fotoluminescência, a qual se divide em fluorescência e fosforescência. O fenômeno luminescente é definido como a radiação emitida por espécies químicas (luminóforos) quando elas sofrem uma transição radiativa de um nível de energia excitado para outro nível de menor energia, isto é decorrente da interação entre a matéria com a radiação eletromagnética na região do visível e do ultravioleta. A diferença entre fluorescência e fosforescência se dá pelo tipo de transição eletrônica radiativa responsável pela desativação do estado excitado. A fluorescência ocorre quando moléculas excitadas no estado singlete retornam para o estado fundamental emitindo radiação^{130,131}.

Os estados excitados moleculares de onde se originam os fenômenos fotoluminescentes são classificados de acordo com a orientação de spin do elétron promovido. Quando a orientação do spin do elétron que é promovido para um orbital de maior energia é preservada, tem-se o estado excitado singlete. No estado excitado tripleto o spin do elétron promovido é invertido, como representado na Figura 12:.

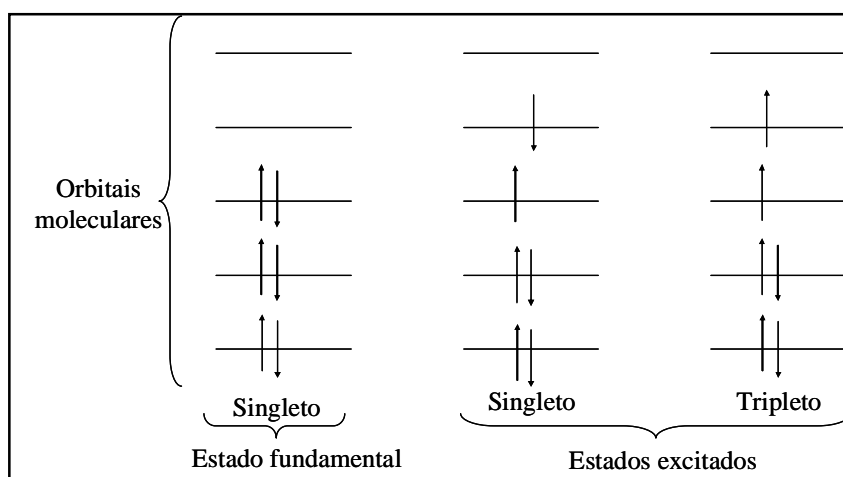


Figura 12: Diagrama esquemático de um arranjo de spin nos orbitais moleculares.

O sinal fluorescente é linearmente dependente da concentração para analitos abaixo de aproximadamente 10^{-4} mol L⁻¹. As principais características que determinam a capacidade fluorescente de uma molécula são absorvidade, eficiência quântica e fotoestabilidade. A primeira etapa de um experimento fluorescente é excitação das moléculas. Características importantes de fontes

fluorescentes incluem emissão de comprimentos de onda, intensidade e estabilidade.

A sensibilidade em CE pode ser resolvida usando métodos de detecção mais sensíveis. Fluorescência induzida por laser (LIF) é o mais sensível método de detecção em CE que pode ser dividido em detecção direta e indireta (ILIF). Na detecção LIF direta o analito precisa emitir um sinal fluorescente após excitação com laser. Caso contrário, precisa fazer uma derivatização antes da análise. Em ILIF, a substância fluorescente deve ser adicionada à solução do eletrólito de corrida. Quando os analitos não fluorescentes passam através do detector ocorre queda do sinal fluorescente. O método ILIF não requer derivatização dos analitos não fluorescentes, e já foi utilizado em diferentes aplicações, como por exemplo, para detectar ânions¹³² e cátions¹³³, aminoácidos¹³⁴ e ácidos graxos¹³⁵.

Recentemente uma nova abordagem utilizando nanopartículas vem sendo aplicada em CE para detecção LIF¹³⁶ e ILIF¹³⁷. Semicondutores nanocristais são adicionados ao eletrólito de corrida e após interações com diferentes analitos suas propriedades fluorescentes são alteradas proporcionando efeito de redução (*quenching*) ou aumento do sinal fluorescente. Algumas propriedades dos nanocristais serão discutidas a seguir.

2.3.4.3.

Semicondutores nanocristais

Os semicondutores nanocristais (“quantum dots”), e também chamados de nanopartículas, foram descobertos no final dos anos 1970 por Ekimov *et. al.*¹³⁸. Esses materiais possuem propriedades fotoluminescentes e variam em tamanho 1 a 20 nm, sendo que cada nanopartícula têm de 100 a 100.000 átomos. São aplicados em diversas áreas, como ciências da vida (química e sensores biológicos)¹³⁹, marcação e rotulagem biológica¹⁴⁰ e em alta qualidade de iluminação (LEDs)¹⁴¹.

As nanopartículas mais comuns consistem de elementos dos grupos entre II e VI, como por exemplo, sulfeto de cádmio (CdS)¹⁴², seleneto de cádmio (CdSe)¹⁴³, o telureto de cádmio (CdTe)¹⁴⁴, seleneto de zinco (ZnSe)¹⁴⁵, sulfeto de chumbo (PbS)¹⁴⁶, e sulfeto de mercúrio (HgS)¹⁴⁷. Alguns contêm elementos dos grupos III-V, como por exemplo, fosfeto de índio (InP)¹⁴⁸, arseneto de índio

(InAs)¹⁴⁹. Além disso, algumas nanopartículas foram sintetizadas com elemento único, como o silício, ou com elementos ternários com dois cátions ou ânions, como CdZnS, CdSSe, InNP¹⁵⁰.

Suas propriedades fotofísicas são devido a um fenômeno conhecido como confinamento quântico¹⁵¹. Em semicondutores macroscópicos, os níveis de energia são muito próximos, o que resulta em uma distribuição contínua de energia sendo assim não quantizados. A *band gap* é a região onde os elétrons são proibidos e separa a banda de valência (camada mais externa dos átomos de um material isolante ou semicondutor em que os elétrons estão muito fortemente ligados ao átomo para conduzir corrente elétrica) da banda de condução (orbitais mais externos dos átomos de um material condutor ou semicondutor onde os elétrons estão livres o suficiente para mover e conduzir a corrente elétrica).

Nos semicondutores macroscópicos a banda de valência está quase completa com elétrons e uma pequena porcentagem dos elétrons ocupa a banda de condução. Os elétrons da banda de valência precisam ganhar energia para atravessar o *band gap*. Devido ao fato dos semicondutores macroscópicos terem distribuição de níveis de energia contínuos a magnitude do *band gap* é fixa e qualquer transição óptica irá resultar em emissão de um simples comprimentos de onda.

Para semicondutores com estrutura em nanoescala, a situação muda totalmente. As dimensões físicas dos semicondutores nanocristais podem aproximar-se do raio *exciton-Bohr* (a separação espacial entre o elétron e o vacância (“buraco”)), portanto, a aproximação de Bohr pode ser usada para determinar essa distância (r) como na Equação 30¹⁵².

$$r = \frac{\epsilon h^2}{\pi m_r e^2} \quad \text{Equação 30}$$

Onde r é o raio da esfera (correspondente à separação do par “elétron – buraco”) ϵ é a constante dielétrica da partícula, h é a constante de Planck, m_r é a massa reduzida do par elétron-buraco e e é a carga do elétron. A vacância criada é, essencialmente, a ausência de um elétron criado que pode ser pensado como uma partícula com massa efetiva.

Em contraste, a maior parte dos semicondutores macroscópicos tem a partícula muito maior do que o seu raio exciton-Bohr resultando na extensão do confinamento natural. Os semicondutores nanocristais são um excelente exemplo do modelo quântico de "partícula na caixa"¹⁵³, devido às suas dimensões físicas da ordem do raio *exciton-Bohr*. Esta teoria ilustra a dependência do tamanho da caixa no cálculo das energias da partícula. Quando a partícula se aproxima do tamanho do raio exciton-Bohr elas deixam de se comportar como um semicondutor macroscópico, e os níveis de energia não podem ser considerados como contínuos, mas sim como discretos (quantizados diferentemente entre os níveis de energia). Assim as transições ópticas observadas têm comprimentos de onda que dependem do tamanho das partículas.

Devido à estrutura da banda de energia dos semicondutores e da escala nanométrica, os nanocristais exibem distintas propriedades fotoluminescentes, como ilustrado no esquema da Figura 13. Semicondutores nanocristais apresentam níveis de energia discretos em ambas as camadas de valência (VB) e camada de condução (CB), e um número limitado de átomos em cada partícula. Quando ocorre uma excitação com energia (E_{ex}) maior que a energia da *band gap* (E_g) os elétrons "saltam" para a camada de condução formando, por pouco tempo, um par de elétron-"buraco" (chamado de excitônico ou *exciton* em inglês). Então os elétrons e "buracos" (representados na Figura 13 por círculos vazios e cheios) recombinam rapidamente e fótons são emitidos com energia específica correspondendo ao *band gap*, que é a chamada de banda de emissão. Como parte da energia emitida pode ter radiação menor que a energia de excitação, devido ao deslocamento de Stokes (ΔE), a energia de emissão (E_{em0}) é usualmente menor que a energia de excitação. Quando diferentes níveis de energia existem no *band gap*, fótons com diferentes energias (E_{em1} , E_{em2} , E_{em3} , E_{em4}) podem ser emitidos. Essa energia é usualmente menor do que a energia de emissão do *band gap* (E_{em0}).

Os semicondutores nanocristais diferenciam dos semicondutores macroscópicos quando a frequência de emissão mostra dependência com a magnitude do *band gap*. Assim, a frequência da luz emitida (fotoluminescência) pode ser alterada por mudanças nos tamanhos dos nanocristais.

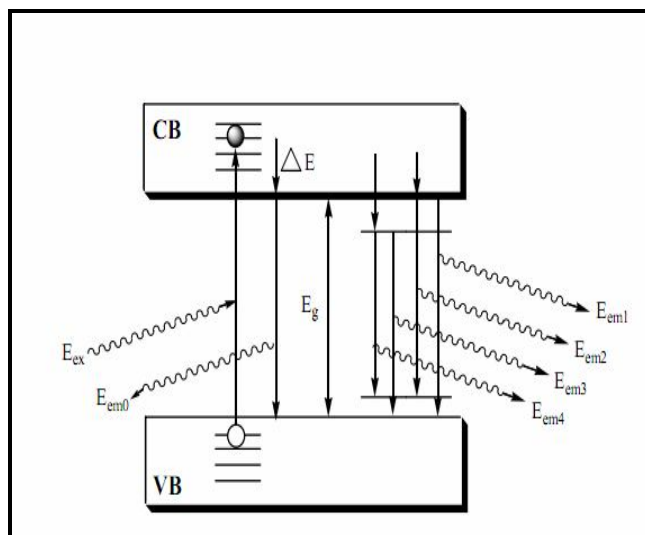


Figura 13: Esquema da excitação e emissão dos nanocristais com camadas de energia típico da estrutura de semicondutores. V_B é a camada de valência, C_B é a camada de condução, ΔE é o deslocamento de Stokes, E_g é a energia do *band gap*, E_{ex} é a energia de excitação e $E_{em\ 0-4}$ são as energias de emissão.

A superfície química dos nanocristais é fortemente dependente do tamanho porque a razão superfície-volume aumenta com a redução do tamanho das nanopartículas. Alta razão superfície-volume significa que as características estruturais, ópticas e eletrônicas são fortemente influenciadas pelas suas propriedades superficiais. Essa razão é grande em nanopartículas devido ao seu pequeno tamanho, mas pode ocorrer degradação por influência da temperatura, irradiação UV e força iônica do meio. A flexibilidade dos nanocristais em termos das interações físico-químicas é maior devido à possibilidade de interações das sondas fotoluminescentes inorgânicas com ligantes orgânicos que fornece propriedades peculiares para muitas aplicações.

Estabilizadores orgânicos são frequentemente utilizados para formação de uma camada na superfície da partícula que, não somente estabilizam os nanocristais em solução, mas também passivam (“preenchem”) a superfície, diminuindo os “defeitos” que possam existir. Defeitos na superfície das partículas, como por exemplo, as vacâncias, impurezas ou adsorventes, causam a formação de “armadilhas” na qual o foton excitado pode cair ou flutuar, afetando as propriedades fotoluminescentes dos semicondutores nanocristais. Esses estabilizadores melhoram o rendimento quântico luminescente. Alguns desses estabilizadores orgânicos são moléculas contendo grupos tiol¹⁵⁴, camada de

silica¹⁵⁵, surfactantes e oligômeros¹⁵⁶, encapsulação em micelas¹⁵⁷ e o uso de polímeros são também utilizados¹⁵⁸.

Devido às grandes diferenças estruturais entre os nanocristais e as moléculas orgânicas estabilizadores, uma passivação (preenchimento) perfeita não pode ser alcançada pela remoção de ligações pendentes na superfície. Um método ideal de passivação é utilizar uma camada inorgânica de outro material semicondutor (por exemplo, o ZnS) em torno do núcleo dos nanocristais proporcionando uma proteção mais densa. Esta passivação com uma fina camada de outro semicondutor não altera significativamente as características de absorção e emissão dos nanocristais, mas aumenta o rendimento quântico de luminescência em até 70%. Exemplo desses sistemas são CdSe/ZnS, CdSe/CdS, e ZnSe/ZnS¹⁵⁹. Como a energia do *band gap* da camada externa é maior do que a do núcleo, o material superficial não absorve a energia emitida do núcleo. A presença de uma camada externa ajuda a eliminar a emissão de banda larga.

Uma característica única e marcante das nanopartículas é o seu espectro de emissão depender do seu tamanho¹⁶⁰. Ao alterar o tamanho e a composição das nanopartículas, suas características fotoluminescentes (comprimento de onda de emissão e tempo de vida) são alteradas. Os comprimentos de onda podem ser levados da região do ultravioleta até a região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético. Quando o tamanho da partícula é reduzido, o “band gap” aumenta resultando em emissões em comprimentos de onda menores (maior energia e frequência). Nanopartículas CdS pode ser sintetizadas para emitir entre 350 nm e 500 nm, enquanto que com os limites de emissão para nanopartículas de CdSe fica entre 450 (partículas com tamanho de 1,8 nm) e 655 nm (partículas com tamanho de 7,5 nm), já a faixa de emissão para nanopartículas de CdTe é entre 510 (partículas com tamanho de 2,1 nm) e 675 nm (partícula com tamanho de 5,1 nm)¹⁶¹. Outras nanopartículas são sintetizadas tendo como base o Pb para estender a região até o infravermelho próximo (até 2000 nm)¹⁶². A faixa na qual o *band gap* e os comprimentos de onda de fotoluminescência podem ser alterados depende do material das nanopartículas. A banda de emissão das nanopartículas é mais estreita e simétrica que os corantes orgânicos convencionais. Outra propriedade das nanopartículas é a larga banda de absorção na região do ultravioleta que promove versatilidade no processo de fotoexcitação e assim qualquer comprimento de onda dentro da faixa pode ser selecionado.

Nanopartículas com superfície passivada têm excelente estabilidade fotoquímica e térmica quando comparadas com solventes orgânicos. A camada superficial inorgânica adicional protege o núcleo contra a foto-oxidação por longo período de tempo¹⁶².

Com os diferentes tipos de nanopartículas fotoluminescentes disponíveis, várias aplicações para detecções sensíveis foram desenvolvidas^{163,164,165}. Na última década nanopartículas solúveis em água ganhou grande atenção devido aos seus estados eletrônicos discretos que são muito sensíveis às alterações superfícies induzidas pela presença de espécies química¹⁶⁶. Os fenômenos de superfície são muito importantes em estudos de nanopartículas. A presença de diferentes moléculas próximas da superfície das nanopartículas pode alterar as suas propriedades luminescentes. A supressão (*quenching*) ou o aumento da fotoluminescência pode ser observado após a interação entre analitos e nanopartículas e essas alterações podem ser utilizadas para novas abordagens em detecções químicas fluorescentes.

O aumento fotoluminescência de um luminóforo (nesse caso, as nanopartículas) é um processo menos explorado apesar de ser mais interessante para fins analíticos quando comparado à redução de sinal, pois é mais seletivo e não é limitado ao sinal de fundo (efeito filtro). O aumento da fotoluminescência de nanopartículas é atribuído à passivação de buracos ou defeitos em sua superfície. O mecanismo exato dos efeitos de redução ou aumento de sinal dessas nanopartículas ainda não é conhecido exatamente.

Através da escolha cuidadosa dos semicondutores nanocristais e da otimização das condições experimentais, o efeito de supressão ou o aumento de fotoluminescência pode ser utilizado em química analítica para aplicações mais sensíveis para vários analitos.

Os aminoglicosídeos, quando presentes em solução aquosa contendo nanopartículas de TGA-CdTe, proporcionaram um aumento da fotoluminescência dessas nanopartículas. Esse aumento de sinal, nesse trabalho, foi avaliado na eletroforese capilar, a fim de encontrar uma condição ideal para uma detecção sensível de aminoglicosídeos usando a fotoluminescência induzida por laser.

2.3.4.4.

Eletoforese capilar acoplada ao ICP-MS

A detecção utilizando a espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS, “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”) é considerada uma técnica bastante adequada para as análises elementares devido ao baixo limite de detecção, à capacidade de detecção multielementar e à capacidade de fornecer informações sobre isótopos. O emprego do ICP-MS acoplado à eletroforese capilar vem sendo aplicado para a especiação elementar. Nesse tipo de hibridização, temos uma técnica que apresenta uma alta capacidade de separação e outra que apresenta alta sensibilidade, assim analitos presentes em baixas concentrações possam ser detectados (na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$)¹⁶⁸.

O acoplamento CE-ICP-MS exige que os parâmetros operacionais de cada técnica devam estar muito bem estabelecidos para que bons resultados sejam obtidos, uma vez que o êxito desse acoplamento está estreitamente relacionado à interface cujo volume morto pode afetar a resolução da separação eletroforética. Os parâmetros adequados de cada técnica considerados individualmente não são, necessariamente, compatíveis entre ambas. Como exemplo, é possível citar a vazão normalmente utilizada em cada técnica, a qual, no caso do ICP-MS, é da ordem de mL min^{-1} , dependendo do tipo de nebulizador empregado, enquanto que em CE, é da ordem de nL min^{-1} . A interface, além de preservar a separação deve manter estável o contato elétrico entre a eletroforese capilar e o sistema de introdução da amostra do espectrômetro de massas¹⁶⁷.

A solução que sai da eletroforese é nebulizada e passa a um aerossol que é carregado ao espectrômetro de massas onde encontra o plasma (um gás parcialmente ionizado). Após processos de dessolvatação, dissociação, atomização e ionização, obtêm-se a produção de íons que são separados nos analisadores de massas e posteriormente detectados. O sistema de ionização por ICP é constituído de uma tocha de quartzo que consiste de três tubos concêntricos, por onde passa um gás (normalmente argônio) onde é formado o plasma.

As características mais importantes do ICP são as altas temperaturas, os longos tempos de residência, a alta densidade eletrônica e o ambiente relativamente inerte. O somatório dessas características permite uma total dessolvatação, uma vaporização completa do soluto e uma alta eficiência de

atomização/ionização. Assim, a alta eficiência na produção de íons tornou o ICP uma fonte de ionização efetiva para análise multielementar por espectrometria de massas^{168,169}.

Os íons produzidos no plasma são transmitidos ao analisador de massa por uma interface que consiste de dois cones metálicos (Pt ou Ni) com perfurações no centro e resistentes a alta temperatura. A interface tem a função de transportar os íons de forma eficiente e com integridade elétrica do plasma, que está à pressão atmosférica (760 Torr), até a região do analisador de espectrometria de massa, que está a cerca de 10^{-6} Torr. Os cones da interface são mantidos sob um vácuo de aproximadamente 2 Torr por uma bomba mecânica. Os íons gerados no plasma passam no primeiro cone, conhecido como cone de amostragem (orifício de 0,8 – 1,2 mm d.i.), e depois viajam uma curta distância para o segundo cone, *skimmer*, com um orifício muito menor (0,4 – 0,8 mm d.i.). Depois dos cones os íons são direcionados para o um dispositivo de focalização dos íons de interesse. Esse dispositivo fica entre o cone *skimmer* e o separador de massa, e são constituídos por um ou mais lentes controladas eletrostaticamente. Essas lentes são compostas de uma serie de placas metálicas ou cilindros que tem uma tensão controlada e, tem a função de transmitir os íons do ambiente hostil do plasma à pressão atmosférica, através dos cones, e orientá-los para o analisador de massa, o qual está sob vácuo elevado. Um papel secundário, mas muito importante do sistema de focalização de íons é parar as partículas, espécies neutras e os fótons que possam atingir o analisador de massas e detector. Estas espécies causam instabilidade de sinal e contribuem para o aumento dos ruídos de fundo, o que afeta o desempenho do sistema. Por exemplo, se fótons ou espécies neutras atingem o detector, o ruído de fundo irá aumentar e degradar a capacidade de detecção. Além disso, se as partículas da matriz penetrarem na região do espectrômetro de massas e se depositarem sobre as lentes ou entrarem no analisador de massas, isso levará à instabilidade de sinal e, em longo prazo, aumentará a frequência de limpeza e de manutenção de rotina. Os íons, após passarem pelas lentes, chegam até o dispositivo de separação de massa também chamado de analisador de massa. O analisador de massa é a região do ICP que separa os íons de acordo com a razão massa carga (m/z). Este processo de separação dos íons pode ser feito de diferentes maneiras, mas todos têm o objetivo de separar os íons de interesse de todos os outros componentes da matriz, solvente

e íons do argônio. O analisador de massa fica entre o sistema óptico de separação e o detector de íons sob um vácuo de aproximadamente 10^{-6} Torr, mantido por uma segunda bomba turbomolecular (Figura 14 A). Comercialmente os principais analisadores de massa disponíveis são: filtros de massas quadrupolo, tempo de voo e duplo foco setor magnético.

O filtro de massa quadrupolo é o mais comum e será discutido em maiores detalhes. Foi desenvolvido no início de 1980 e por ter sido o primeiro a ser comercializado, hoje tem alto rendimento, é usado na rotina e possibilita a análise elementar a níveis traços. Um quadrupolo consiste de quatro cilindros ou hastes metálicas de mesmo comprimento e diâmetro, feitos de cerâmica e recobertos com metal condutor. Um campo de corrente direta (dc) é ligado a um par dessas hastes e um campo de radio frequência (rf) ao par oposto, os íons selecionados com uma certa massa irão passar através das hastes para o detector, enquanto que os outros são ejetados para fora do quadrupolo. A Figura 14 (B) mostra o que acontece no quadrupolo. Os íons do analito junto com outros íons podem chegar à entrada das quatro hastes do quadrupolo, mas quando é aplicada certa voltagem fr-dc as cargas positivas e negativas das hastes vão orientar eletrostaticamente o íon do analito para o meio das quatro barras onde irá emergir e ser convertido em pulso elétrico para o detector. Os outros íons com diferentes m/z passarão através dos espaços entre as barras e serão ejetados.

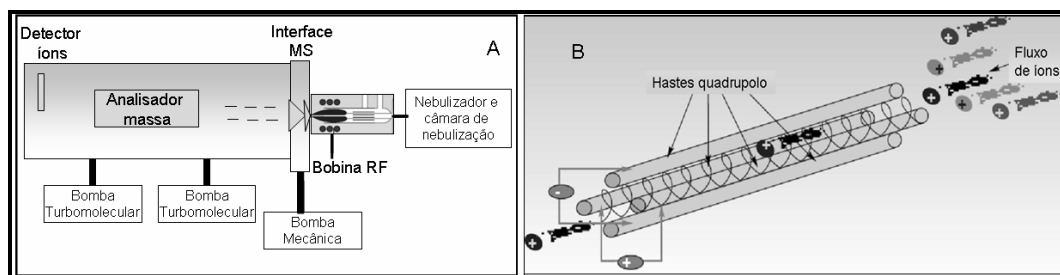


Figura 14: Esquema de um ICP-MS (A) e o filtro de massa quadrupolo (B).

O ICP apresenta energia suficiente para atomizar e ionizar de forma eficiente as amostras, entretanto, esse método permite apenas a determinação elementar e isotópica, sem considerar a forma original da espécie. No caso da especiação, isso é inconveniente, uma vez que cada espécie traz consigo a informação que define a bio-disponibilidade do elemento e, portanto, sua toxidez

e/ou essencialidade, além de permitir a compreensão dos mecanismos biológicos. Sendo assim, percebe-se a importância da especiação, a qual permite identificar e quantificar a forma química de um dado elemento, seja este metal ou não metal. Essa forma química pode referir-se ao estado de oxidação de uma espécie inorgânica, ou ainda, ao tipo e número de substituintes de compostos organometálicos^{167,169}.

O acoplamento CE-ICP-MS foi utilizado no método desenvolvido para determinação de organoestânios em amostras biológicas.

3 Materiais e Métodos

3.1.

Reagentes e Materiais

As soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (resistividade abaixo de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida de um ultrapurificador de água Milli-Q A10 Gradiente (Millipore EUA).

Os padrões dos pesticidas: dimoxistrobina 99,0%, picoxistrobina 99,9%, piraclostrobina 99,9%, azoxistrobina 99,9%, fluoxastrobina 99,7%, kresoxim-metil 96,6% e trifloxistrobina 99,5% foram adquiridos da Riedel-deHaen (Alemanha) e os padrões dos organoestanhos (tricloreto de monofenilestanho, dicloreto de difenilestanho e cloreto de trifenilestanho) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Os aminoglicosídeos com 98% de pureza (canamicina, tobramicina, gentamicina, amicacina, estreptomicina, neomicina), o cloreto de cádmio, o ácido tioglicólico e o telúrio em pó também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

Os solventes acetonitrila e metanol, ambos de grau HPLC, utilizados no preparo das soluções foram adquiridos da Tedia (Brasil). O ácido bórico, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido orto-fosfórico, hidróxido de sódio, acetato de sódio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio e tetraborato de sódio foram todos da Merck (Alemanha).

Capilares de sílica fundida para as análises por eletroforese capilar foram adquiridos da Agilent Technologies (EUA) e da Simplus Capillaries (EUA). Os capilares da Agilent já estavam prontos para uso. Já os capilares da Simplus Capillaries foram preparados pelo operador com o corte do capilar no tamanho ideal e remoção do revestimento de poliimida na janela de detecção e nas extremidades do capilar que ficam em contato com as soluções do eletrólito de corrida que fecham o circuito do sistema. *Vials* de polipropileno (1 mL) e de

vidro, alinhadores, cassetes (compartimento que acopla o capilar ao equipamento) foram adquiridos da Agilent Technologies (EUA).

As soluções utilizadas em eletroforese capilar e em cromatografia em fase líquida foram previamente filtradas com filtros de membrana de PTFE de porosidade 0,45 μm e diâmetro igual a 17 mm da National Scientific (EUA).

Colunas cromatográficas C-18 com 50 e 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro (Zorbax Eclipse XDB – C18) com partículas de 2 e 5 μm foram adquiridas da Agilent Technologies e utilizadas como fase estacionária para os experimentos em cromatografia líquida.

Micropipetas automáticas de volumes reguláveis de 1 a 10 μL , 10 a 100 μL e de 100 a 1000 μL e balões volumétricos (2, 5, 10, 25 e 50 mL) foram utilizados no preparo das soluções.

3.2.

Equipamentos

3.2.1.

Eletroforese Capilar

Os experimentos com as estrobilurinas foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar comercial Hewlett – Packard (HP) CE – Agilent. O equipamento de eletroforese capilar utilizado para os experimentos com os organoestanhos foi de mesmo modelo, mas o acoplamento foi realizado no laboratório LASPECTRO do departamento de química da PUC-RIO. Ambos os equipamentos eram equipados com detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos (operação na faixa de 190-600 nm); controlador de temperatura do tipo Peltier; sistema automático de introdução de amostra e programa de aquisição e tratamento de dados (Chemstation) desenvolvido pela Agilent.

O acoplamento do equipamento de eletroforese capilar ao detector de fluorescência da Picometrics (França) para os estudos com nanopartículas de TGA-CdTe foi realizado em nosso laboratório (LEEA).

3.2.2.

ICP-MS e acessório para o acoplamento com CE

O ICP-MS utilizado no acoplamento com o eletroforese capilar foi um espectrômetro de massa com cela de reação modelo ELAN DRC II da PerkinElmer (USA). O separador de massa desse equipamento é do tipo quadrupolo. Os dados obtidos no programa do espectrômetro foram tratados no programa Origin 6.0, para medidas das áreas.

Para o acoplamento com o equipamento CE, foi utilizado um nebulizador de fluxo paralelo do tipo Mira Mist CE, pois é ideal para trabalhar com vazões extremamente baixas. Esse nebulizador possui um canal interno de diâmetro suficiente para passar o capilar até a ponta do nebulizador, e não permite o retorno de líquido para o interior do capilar. Devido ao diâmetro muito maior do canal de amostra, este nebulizador é muito robusto frente a problemas de entupimento. Além do mais, o próprio capilar pode ser utilizado para remover entupimentos, caso eles ocorram.

Como o nebulizador utilizado não é auto-aspirante, a solução de complementação (make-up) foi transportada até o nebulizador por uma bomba peristáltica de baixa vazão controlada por um microprocessador apropriado (Ismatec). Essa bomba permite uma aspiração sem pulsação da solução de complementação ficando o sinal mais estável.

A Figura 15 apresenta o acoplamento CE-ICP-MS utilizado nesse trabalho com a interface Mira Mist CE acoplada a uma câmara ciclônica de nebulização.

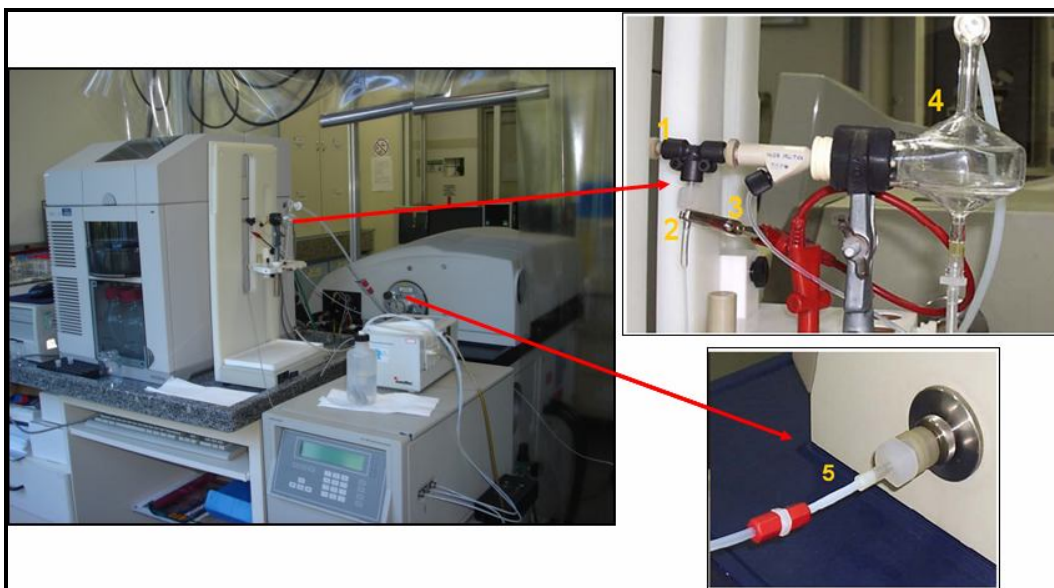


Figura 15: Acoplamento CE-ICP-MS. (1) Entrada do capilar no nebulizador, (2) Eletrodo, (3) Entrada de argônio, (4) Câmara de nebulização, (5) Entrada para o equipamento ICP-MS.

3.2.3.

Equipamentos Auxiliares

No processo de extração foi utilizado uma centrífuga modelo BE 4000 Brushless (Bio-Eng, Rio de Janeiro) e um agitador vortex utilizado para homogeneizar as amostras. As pesagens foram feitas em uma balança analítica modelo AUW220D da Shimadzu (Japão) calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro). Para auxiliar na dissolução de sólidos, quando necessário, foi utilizado um banho ultrassônico (modelo USB124, de potência 40 W, proveniente da CTA do Brasil). A degaseificação de solventes para o UPLC foi realizada em um banho ultrassônico modelo USC 1800 (Unique, São Paulo, Brasil). As medições de pH foram realizadas em um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3 (Tecnopon, São Paulo, Brasil). O eletrodo utilizado foi do tipo de membrana de vidro, selado e conjugado com eletrodo de referência de Ag/AgCl. O equipamento foi calibrado diariamente com soluções tampão de pH 4,00 a 7,00, fornecidas pela Merck.

Cromatógrafo à líquido de alta eficiência de resolução rápida – RRLC série 1200 da Agilent equipado com detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência foi também empregado.

Quando necessário medições de fotoluminescência foram feitas em um espectrômetro de fotoluminescência modelo LS-55 da PerkinElmer. As soluções foram transferidas para cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. Os espectros foram adquiridos usando o programa FLWinlab fornecido pelo fabricante do equipamento. Os comprimentos de onda para excitação e emissão, das nanopartículas foi 410 e 518 nm, respectivamente.

3.3.

Determinação de organoestanhos

3.3.1.

Procedimentos para CZE em CE-ICP-MS

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o método de eletroforese capilar por zona (CZE) onde as separações ocorrem utilizando apenas a solução tampão com a possibilidade de adição de aditivos orgânicos.

Previamente às injeções das soluções dos analitos, o capilar de sílica fundida foi condicionado. Para capilares novos o procedimento realizado seguiu as seguintes etapas: (i) solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, por 20 min; (ii) água ultrapurificada por 10 min e (iii) solução de eletrólito, por 10 min. No início de cada dia de trabalho o condicionamento foi realizado por menores tempos seguindo as seguintes etapas: (i) água ultrapurificada, por 10 min; (ii) solução de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, por 10 min, (iii) água ultrapurificada por 5 min e (iv) solução de eletrólito por 10 min.

Antes de iniciar as injeções, o sistema foi estabilizado através da nebulização de água ultrapurificada por 15 min e, em seguida nebulização da solução de complementação (“make-up”), por mais 20 min, contendo o elemento Cs para controlar a estabilização do sinal da linha base. Para nebulização dessa solução foi utilizada uma bomba com capacidade de operar em baixa vazão ($40 \mu\text{L min}^{-1}$).

Um condicionamento mais simples foi feito entre cada uma das corridas ao longo do dia de trabalho. Esse condicionamento foi fundamental para garantir a reprodução dos resultados e pode ser resumido da seguinte maneira: introdução de (i) água ultrapurificada (1 min) e (ii) eletrólito de corrida por 2 min. No final de

cada dia, foi realizado um procedimento de limpeza do capilar, com a passagem, em sequência, de água ultrapurificada (30 min).

O capilar utilizado foi de 60 cm de comprimento total e 75 μm d.i. (sem janela de detecção), a temperatura foi mantida constante em 45 °C, a voltagem aplicada foi de +30 kV e tempo de injeção foi de 30 s.

3.3.2.

Soluções para CE-ICP-MS

Soluções estoque dos organoestanhos foram preparadas em metanol e conservadas em geladeira. Para obter maior eficiência e sensibilidade as soluções de trabalhos dos analitos foram preparadas em meio contendo metanol: tampão acetato de sódio 5 mmol L^{-1} e 1 mol L^{-1} de ácido acético 50% v/v em pH 2,81.

O eletrólito de corrida utilizado foi tampão acetato 5 mmol L^{-1} (pH 2,81) preparado diariamente. Para o acoplamento CE-ICP-MS foi utilizado uma solução de complementação (“make-up”) contendo: NH_4NO_3 5 mmol L^{-1} , Cs^+ 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 10% de metanol v/v, em tampão acetado 5 mmol L^{-1} (pH 2,81). Essa solução foi utilizada de acordo com recomendação do fabricante do nebulizador tipo Mira Mist CE. A função dessa solução é fechar o circuito elétrico e providenciar um volume suficiente de líquido para possibilitar a nebulização da solução que sai do capilar.

3.3.3.

Preparação das amostras analisadas por CE-ICP-MS

O método foi aplicado em duas amostras biológicas, urina e sangue. As amostras de urina foram coletadas de indivíduos saudáveis, livres de contaminação por organoestanhos e armazenadas em refrigerador (4 °C). A adição da concentração desejada dos organoestanhos foi realizada no dia da análise.

As amostras de urina foram centrifugadas (10 mL de cada amostra de urina por 20 min a 30000 rpm) e 1 mL do sobrenadante foi retirado e transferido para balão volumétrico de 10 mL. O balão foi avolumado com uma solução contendo

metanol: tampão acetato de sódio 5 mmol L⁻¹ 50% v/v e pH 2,81. A solução foi então filtrada com filtros de PTFE de 0,45 µm antes de ser introduzida no capilar.

As amostras de sangue foram coletadas de indivíduos saudáveis, livres de contaminação por organoestanhos, em laboratório especializado em tubos contendo anticoagulante heparina. A adição de organoestanho foi realizada antes da centrifugação para obtenção do plasma. Parte da amostra coletada foi centrifugada por 15 min a 2500 rpm para obtenção do plasma. As amostras foram então congeladas e reservadas para análise. As amostras de sangue sem passar pelo processo de centrifugação também foram utilizadas, sendo denominadas de sangue total. As diluições das amostras de sangue ou plasma foram realizadas com tampão acetato 5 mmol L⁻¹ em pH 2,81.

3.4.

Determinação de estrobilurinas

3.4.1.

Procedimentos para cromatografia eletrocinética micelar capilar (MEKC)

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o método MEKC, que utiliza fase pseudo-estacionária carregada (micelas de surfactante, no caso desse trabalho) para a separação e identificação de compostos neutros. O SDS foi utilizado como surfactante para formação de micelas carregadas negativamente.

Previamente às injeções das soluções dos analitos, o capilar de sílica fundida foi condicionado. Para capilares novos, o procedimento realizado seguiu as seguintes etapas: (i) solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ por 30 min; (ii) água ultrapurificada por 20 min e (iii) solução de eletrólito por 10 min. No início de cada dia de trabalho o condicionamento foi realizado por menores tempos seguindo as seguintes etapas: (i) água ultrapura por 5 min; (ii) solução de água: acetonitrila 50% v/v por 5 min; água ultrapura por mais 5 min; solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ (15 min), seguida da passagem de água ultrapura (5 min) e solução de eletrólito (5 min). Um condicionamento mais simples foi feito entre cada uma das corridas ao longo do dia de trabalho. Esse condicionamento foi fundamental para que se garantisse a reprodução de resultados e pode ser resumido da seguinte maneira: passagem de (i) água ultrapura (1 min); (ii)

água:acetonitrila 50% v/v (0,50 min); (iii) água ultrapura (1 min); (iv) solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (1 min) e (iv) eletrólito de corrida (2 min). No final de cada dia, foi realizado um procedimento de limpeza do capilar, com a passagem, em sequência, de água ultrapura (20 min), água:acetonitrila 50% v/v (10 min), água ultrapura (5 min).

O capilar utilizado foi de sílica fundida com 60 cm de comprimento total (52,5 cm até a janela de detecção) e diâmetro interno de 50 ou 75 µm.

Os eletroferogramas dos pesticidas foram obtidos com detecção fotométrica ajustada em 210 e 270 nm. A voltagem positiva, aplicada durante a corrida, foi de 30 kV e a temperatura mantida constante em 25 °C. As amostras foram introduzidas no capilar pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 45 segundos.

3.4.2.

Soluções para os experimentos com MEKC

As soluções-estoque dos pesticidas foram preparadas em acetonitrila (1 x 10⁻³ mol L⁻¹) e mantidas sob refrigeração de até 4 °C. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente com diluições das soluções estoque dos pesticidas em solução contendo 45 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio e 20% v/v de ACN.

O eletrólito de corrida foi preparado diariamente pela diluição da solução estoque de tetraborato de sódio (0,1 mol L⁻¹) para concentração final de 5,1 mmol L⁻¹, solução estoque de SDS (0,5 mol L⁻¹) para concentração final de 51 mmol L⁻¹ e modificador orgânico 24 % v/v em volume de ACN. O pH dessa solução de eletrólito foi ajustada para o valor de 9,0 pela adição de solução aquosa de ácido bórico 0,4 mol L⁻¹. Durante o ajuste de pH, a solução foi mantida em constante agitação e o valor de pH monitorado com o pHmetro.

Para validação do método proposto, foram realizados experimentos em cromatografia líquida com adaptações ao método desenvolvido por Campillo e colaboradores²⁸. As soluções estoques dos pesticidas (1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹) preparada em acetonitrila foram diluídas em solução contendo 45 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio e 20% v/v de acetonitrila, filtradas e injetadas no cromatógrafo. A coluna cromatográfica utilizada foi de fase reversa C-18 (Zorbax

Eclipse XDB – C18) de 150 x 4,6 mm com partículas de 5 µm de diâmetro. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água com eluição por gradiente, seguindo o programa: (i) 0 a 0,5 min foi mantida a proporção 33:67% de água:acetonitrila; (ii) 0,5 a 1,5 min alteração de 33% para 45% de água, (iii) condição foi mantida até 10 min; (iv) entre 10 e 11 min retornou para 33% de água. O tempo total de análise foi de 16 minutos. A vazão utilizada foi mantida em 1,0 mL min⁻¹. Os pesticidas foram determinados por absorção no comprimento de onda de 210 nm. O sinal fluorescente do pesticida piraclostrobina foi também monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação e emissão fixos em 270 e 440 nm, respectivamente.

3.4.3.

Preparo das amostras analisadas por MEKC

Na determinação dos pesticidas em amostras de alimentos, um procedimento de extração usando o método QuEChERS foi aplicado e otimizado.

As amostras analisadas neste trabalho foram papinhas prontas para bebês compostas por diferentes tipos de frutas ou legumes, adquiridas em mercados da cidade. O procedimento utilizado seguiu o fluxograma da Figura 16. Logo após pesar 10 g de amostra água ultrapurificada foi adicionada até o peso atingir 15 g, ou seja, adicionou 5 g de água ultrapura.

Para as medições direta no eletroforese capilar, 200 µL do sobrenadante (para todas as amostras) foi transferido para balão volumétrico de 1 mL e após a adição de 800 µL de tetraborato de sódio (0,1 mol L⁻¹) o volume foi ajustado com água ultrapura. A solução foi então filtrada e analisada. Para concentração *off-line* da amostra todo o sobrenadante obtido no final é transferido para outro tubo e o volume retomado para 1 mL com 45 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio: ACN 80:20%.

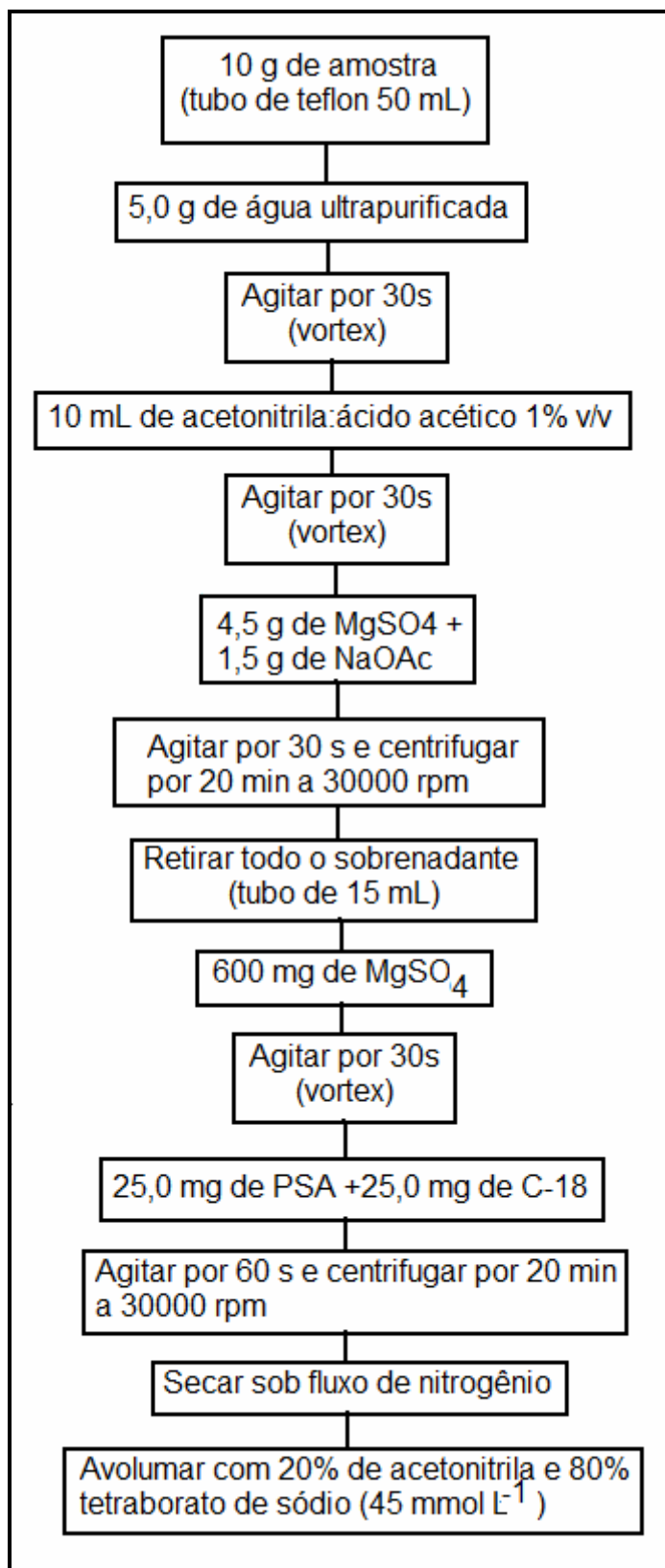


Figura 16: Fluxograma do procedimento utilizado para extração dos pesticidas pelo método QuEChERS.

3.5.

Determinação de aminoglicosídeos

3.5.1.

Nanopartículas TGA-CdTe

As nanopartículas CdTe modificadas com ácido tioglicólico (TGA) foram sintetizada e caracterizadas pelo grupo de trabalho seguindo um método já descrito na literatura¹⁷⁰. O procedimento foi realizado em um balão de fundo redondo de 100 mL com três saídas, foi adicionado 3,5 mmol de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ e 0,40 mmol de TGA em 50 mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para aproximadamente 10,5 pela adição de pequenos volumes de $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida uma purga com nitrogênio foi realizada durante 10 min, após esse tempo 2 mL de uma solução aquosa de NaHTe foi adicionada sob agitação e proteção com nitrogênio no sistema de reação. A solução foi aquecida a aproximadamente 90 °C durante 15 a 20 min. A solução resultante foi armazenada refrigerada, a aproximadamente 4°C, para uso posterior, e chamada de solução estoque de nanopartículas.

3.5.2.

Procedimentos para CE-LIF

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o método CZE para estudo do comportamento das nanopartículas antes e após interação com os aminoglicosídeos.

A detecção por fotoluminescência induzida por laser foi possível após adaptação do capilar em cassete apropriado, com janela de detecção devidamente preparada e ajustado ao detector de LIF.

Previamente às injeções das soluções dos analitos, o capilar de sílica fundida foi condicionado. Para capilares novos o procedimento realizado seguiu as seguintes etapas: (i) solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ por 30 min; (ii) água ultrapurificada por 20 min e (iii) solução de eletrólito por 10 min. No início de cada dia de trabalho o condicionamento foi realizado por menores tempos seguindo as seguintes etapas: (i) água ultrapurificada por 5 min; (ii) solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ por 15 min, (iii) seguida da passagem de água

ultrapura por 20 min para total remoção do hidróxido de sódio e (iv) solução de eletrólito por 15 min. Um condicionamento mais simples foi feito entre cada uma das corridas ao longo do dia de trabalho. Esse condicionamento foi fundamental para que se garantisse a reprodução de resultados e pode ser resumido da seguinte maneira: passagem de (i) água ultrapura (1 min) e (ii) eletrólito de corrida (1 min). No final de cada dia, foi realizado um procedimento de limpeza do capilar, com a passagem de apenas água ultrapurificada por 30 min.

O capilar utilizado foi de sílica fundida com 60 cm de comprimento total (52,5 cm até a janela de detecção) e diâmetro interno de 75 μm .

Os picos de fotoluminescência do sistema aminoglicosídeos/nanopartículas de TGA-CdTe foram obtidos após excitação utilizando um laser capaz de emitir em comprimento de onda de 410 nm. Com o uso de uma interface, os dados, foram coletados pelo software do equipamento de eletroforese capilar (Chemstation versão 5.1).

A voltagem positiva, aplicada durante a corrida, foi de 30 kV e a temperatura mantida constante em 20 °C. As soluções das nanopartículas e analitos foram introduzidas no capilar pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar pelo tempo de 20 s.

3.5.3.

Soluções para os experimentos com CE-LIF

As soluções-estoque dos aminoglicosídeos foram preparadas em água ultrapurificada ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e mantidas sob refrigeração de até 4 °C. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente com diluições das soluções estoque dos antibióticos.

As soluções de trabalho das nanopartículas foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque das nanopartículas livres em concentração desejada em meio tamponado (tampão borato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em pH 8,0).

O eletrólito de corrida foi preparado diariamente. Foi utilizando tampão tetraborato 10 mmol L^{-1} em pH 8,0. O pH dessa solução de eletrólito medido e se necessário ajustado para o valor desejado com ácido bórico $0,4 \text{ mol L}^{-1}$.

3.6.

Validação

Todo método desenvolvido em um laboratório precisa passar pelos procedimentos de validação para que seja demonstrado que os resultados analíticos são confiáveis e pode ser aplicado conforme desejado. Tanto para um método existente, que foi modificado para atender aos requisitos específicos, ou para um método novo que foi desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as análises pretendidas. Validar um método é investigar se a finalidade analítica está sendo atingida, se está obtendo resultados analíticos com um nível aceitável de confiabilidade e de incerteza. Segundo a ABNT a validação é a comprovação, através de evidências, de que o método atende aos requisitos para uma aplicação ou uso específico.^{171,172}

3.7.

Parâmetros analíticos de mérito (PAM)

A orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos elaborada pelo INMETRO sugere que, quando aplicável, as seguintes características de desempenho sejam investigadas: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, limite de detecção e quantificação, tendência/recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), robustez e incerteza de medição. Os PAM dos métodos desenvolvidos nesse trabalho foram avaliados em termos da resposta linear, detectabilidade (limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (testes de recuperação) e cálculos das incertezas.¹⁷²

3.7.1.

Resposta Linear

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração dos analitos (ou de outra propriedade) na qual o método pode ser aplicado. A

quantificação exige que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

A resposta linear pode ser obtida por padronização interna (uso de um padrão interno) ou externa e representada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad \text{Equação 31}$$

Onde “y” é a variável de resposta; “x” é a concentração ou massa do analito, “a” é a inclinação ou sensibilidade da curva analítica; “b” é a intersecção com o eixo y, quando $x = 0$, e b é o erro aleatório.

A resposta linear de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito (curva analítica) e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada usando o método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e quando a variância é homogênea ao longo dos pontos amostrados – homocedasticidade.

A ausência de valores discrepantes pode ser feita pelo teste de Grubbs. O comportamento linear foi avaliado pelos valores de coeficientes de correlação linear (r) e de determinação (R^2). Os resíduos foram calculados em cada caso para verificar a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta para confirmar a escolha pelo comportamento linear e homocedasticidade dos pontos das curvas analíticas.

A adequação do modelo linear em cada método foi avaliada pelos testes F e t de Student, assim como pelos valores de p.

A adequação do modelo linear pode ser avaliada através do teste F de *Snedecor–Fisher*. Este teste é baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática da regressão (MQ_{reg}) é dividida pela média quadrática do resíduo (MQ_{res}), para seus respectivos graus de liberdade, conforme mostrado na

$$F = MQ_{reg} / MQ_{res} \quad \text{Equação 32.}$$

$$F = MQ_{reg} / MQ_{res} \quad \text{Equação 32}$$

O resultado encontrado é comparado com o da tabela F, considerando seus graus de liberdade (gl). Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias ($F_{calc.} > F_{critico}$) rejeita a hipótese nula de não existência de relação linear, ou seja, se aceita a equação da regressão linear.

O modelo linear também pode ser avaliado por meio do teste *t* de Student, que trata como hipótese nula (H_0) a suposição de que a área do pico e a concentração de analito não se relacionam linearmente. Em um nível de significância de 5%, o valor calculado de *t* comprovaria ou rejeitaria esta hipótese.

3.7.2.

Limites de detecção e quantificação

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, sendo representada pela inclinação das curvas analíticas. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são critérios de avaliação de detectabilidade. O LOD é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Existem vários critérios para a definição do LOD, em métodos instrumentais a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o sinal-ruído da linha de base, conforme demonstrado na Equação 33 ou ainda por parâmetros da curva analítica (Equação 34).

$$LOD = x + 3s_b \quad \text{Equação 33}$$

$$LOD = 3 \times \left(\frac{s_b}{a} \right) \quad \text{Equação 34}$$

onde “x” é a média dos valores da área dos brancos ou da menor concentração dos picos dos analitos que podem ser diferenciados do sinal de fundo; “s_b” é o desvio padrão “a” é a inclinação da curva analítica.

O procedimento de avaliação do LOQ é semelhante à do LOD, podendo ser estimado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco ou da menor concentração dos picos dos analitos que podem ser

diferenciados do sinal de fundo mais 5, 6 ou 10 vezes o desvio padrão (Equação 35) ou ainda por meio de parâmetros da curva analítica, conforme (Equação 36).

$$LOQ = x + 10s_b \quad \text{Equação 35}$$

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{s_b}{a} \right) \quad \text{Equação 36}$$

O critério utilizado para calcular o LOD e LOQ foi através de medições realizadas com uma solução contendo a menor concentração dos analitos que poderia ser distinguida do sinal de fundo.

3.7.3.

Precisão

Normalmente determinada por circunstâncias específicas de medição. As três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. A precisão é um critério importante, pois faz parte a estimativa da incerteza da medição.

3.7.3.1.

Repetibilidade

Repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade (mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo)¹⁷².

A repetibilidade para os analitos foi calculada pelo desvio padrão relativo (RSD), indicado na Equação 37, para o tempo de migração e para as respectivas áreas obtidas em cada análise. Foram realizadas 7 medições pela introdução, nas condições estabelecidas, de uma solução contendo os analitos de interesse.

$$RSD(\%) = \left(\frac{s_r}{M_{\text{medição}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 37}$$

onde “s_r” é a estimativa do desvio padrão “M_{medição}” é a média das determinações.

3.7.3.2.

Precisão Intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório.

Nesse trabalho, a fonte de variação foi investigada por medidas realizadas em diferentes dias. Para calcular o desvio padrão entre os respectivos dias foi aplicada a análise de variância (ANOVA). O teste F baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática dos valores obtidos em dias diferentes (MQ_{entre}) é dividida pela média quadrática dos valores obtidos em um mesmo dia (MQ_{dentro}), foi utilizado para dizer se existe diferença significativa entre as médias das áreas. O resultado encontrado é comparado com o da tabela F, considerando seus graus de liberdade (gl). Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias ($F_{\text{calc.}} < F_{\text{critico}}$) indica que não há diferença significativa entre as médias.

3.7.4.

Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado obtido por um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. Nesse trabalho a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação com amostras fortificadas com os analitos.

A recuperação é definida como a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. As medições de recuperação são as mais comuns devido à dificuldade em se obter CRM (Material de Referência Certificado), que para certas aplicações nem existem, e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (branco), em um determinado número de ensaios. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ ¹⁷³.

A exatidão dos métodos propostos foi estimada pelos valores de recuperação para os pesticidas estrobilurinas e organoestanhos em amostras após adição dos analitos.

3.8.

Incertezas

Devido à necessidade e à importância da emissão de resultados confiáveis, a busca pela qualidade se tornou um requisito fundamental em laboratórios. A norma NBR/ISSO/IEC 17025¹⁷¹, criada para atender os laboratórios de calibração, tem como objetivo garantir, com a sua implementação, a produção de dados e resultados tecnicamente confiáveis. Para acreditação pela NBR/ISSO/IEC 17025 a estimativa da incerteza de medição é um dos requisitos técnicos necessários.

Quando uma medição química é realizada, este resultado é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. A expressão completa de um resultado deve incluir a incerteza de medição. Segundo o guia EURACHEM/CITAC¹⁷⁴ a incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que podem ser obtidos em torno da média. Este parâmetro pode ser um desvio padrão ou a metade de um intervalo correspondente a um nível da confiança declarado. Para estabelecer a estimativa de incerteza de medição se faz necessário identificar as variáveis que contribuem para a incerteza, e quantificar seus valores. A incerteza de um resultado pode ser oriunda de diversas fontes, tais como: definição incompleta do mensurando, amostragem não representativa, homogeneidade da

amostra, estabilidade da solução, pesagem, efeitos de matriz e interferências, equipamentos volumétricos, tendências pessoais na leitura de instrumentos analógicos, entre outras.

A importância da expressão da incerteza pode ser exemplificada na utilização de dados analíticos na tomada de decisões. Ao compararmos o resultado de uma análise frente a um limite legal a decisão de aprovar ou rejeitar o resultado implica sempre em uma avaliação de risco, pois a decisão incorreta pode levar a grandes prejuízos. Assim, quanto melhor a incerteza da análise, menor será o risco de uma decisão errada, maior é a confiabilidade da medição.¹⁷⁵

Existem diferentes abordagens para estimar a incerteza de medição, duas são bastante comuns: a *top-down*, baseada em estudos interlaboratoriais ou estudos de validação e a *bottom-up* (métodos clássicos), preconizada pelo Guia para Expressão da Incerteza de Medição – GUM¹⁷⁸. A NBR/ISSO/IEC 17025, faz referências às duas abordagens, pois na seção sobre incerteza cita o conhecimento do método e os parâmetros de validação. Atualmente, mesmo na abordagem *bottom-up* estão sendo inseridos dados de validação.¹⁷⁶

A implementação do ISO GUM (Guia para a expressão da incerteza de medição)¹⁷⁷ parte da análise que o modelo matemático da medição (equação da medição propriamente dita) inclui todas as contribuições relevantes para o ensaio ou calibração. A incerteza global é então estimada pela lei da propagação da incerteza, seguindo a identificação e a quantificação da incerteza individual dos fatores de influência¹⁷⁸. Previamente, para se calcular a estimativa da incerteza de medição alguns procedimentos precisam ser seguidos:

- (i) Especificar o mensurando, definindo claramente o que está sendo medido.
- (ii) Identificar fontes de incerteza, podendo utilizar o diagrama de causa e efeito para indicar as fontes relevantes de incerteza.
- (iii) Quantificar a dimensão do componente de incerteza associado a cada fonte potencial de incerteza identificada.
- (iv) Calcular a incerteza combinada.

Alguns componentes de incerteza podem ser avaliados experimentalmente a partir da dispersão de medições repetidas (uso da estatística frequencista), conforme Equação 38.

$$u_{x_i} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Equação 38

onde “s” é desvio padrão calculado e “ \sqrt{n} ” é a raiz quadrada de n (número de replicatas)

Outros componentes da incerteza podem ser adquiridos a partir de informações existentes ou previamente obtidos, por exemplo, quando a estimativa de incerteza é originada de resultados e dados já existentes. Assumindo que cada grandeza de entrada (resultado) tem uma distribuição e um intervalo de confiança, a incerteza deve ser calculada com base nas distribuições de probabilidade (normal, retangular, triangular) correspondente a um nível de confiança declarado¹⁷⁹. A expressão que representa cada tipo de incerteza é apresentada na

Equação 39.

$$u(x_i) = c \quad c = u_{\text{certificado}} = \frac{U_{(\text{declarada})}}{k}$$

Equação 39

onde “c” é a estimativa do resultado, “ $U_{\text{declarada}}$ ” é a incerteza expandida que deve ser extraída do certificado e “k” é o coeficiente de abrangência, normalmente para um nível de 95% de confiança.

Cada incerteza de entrada pode ser formada por uma ou várias contribuições, que também são combinadas para se ter o valor de cada incerteza de entrada. No processo de combinação das incertezas assume-se a independência entre essas fontes de modo a se usar a forma mais simples da lei da propagação da incerteza (soma quadrática das contribuições) como indicado na Equação 40.

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)}$$

Equação 40

onde: “ $u(y)$ ” é o resultado da combinação de incertezas; “ $\partial y / \partial x_i$ ” é o coeficiente de sensibilidade de cada fonte (coeficientes estes utilizados para transformar grandezas de entrada em incertezas, uniformizando as unidades das grandezas de entrada de modo a permitir que estas possam ser combinadas ao final do processo) e os valores “ $u^2(x_i)$ ” são as variâncias associadas a cada uma das fontes.

Outra consideração importante está relacionada com o *Teorema Central do Limite*, que mostra que uma distribuição estatística proveniente da combinação de outras distribuições não necessariamente normais resultará numa distribuição que tende a ser normal. Como as grandezas de entrada e obviamente as incertezas de saída são combinações de distribuições, essa situação parece ser razoável para o modelo estudado nesse trabalho.

Uma vez identificadas as fontes de incerteza de entrada e consideradas as suas contribuições, pode-se estimar a incerteza padrão combinada (u_c). A incerteza padrão combinada é a raiz quadrada da soma quadrática das incertezas padrões relativas de todos os componentes que contribuem para a estimativa da incerteza de medição, Equação 41. Para se calcular as incertezas combinadas são necessárias os valores da incerteza padrão relativa de cada contribuição, que consiste na razão do valor obtido da incerteza padrão pelo valor variável.

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots} \quad \text{Equação 41}$$

onde $y(x_1, x_2, \dots)$ é uma função de vários parâmetros x_1, x_2, \dots

A incerteza expandida (U) é calculada a partir da multiplicação da incerteza padrão combinada (u_c) pelo fator de abrangência k (graus de liberdade efetivos), como mostrado na Equação 42.

$$U = K_{v,p} u_c \quad \text{Equação 42}$$

A incerteza expandida corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95% (na verdade 95,45%) para um “ k ” calculado igual a 2, por se tratar de caráter amostral. O fator “ k ” está diretamente relacionado com o grau de probabilidade de acerto do cálculo da incerteza. O valor do fator de abrangência k deve levar em conta, além do nível de confiança desejado, o número de graus de liberdade efetivos associados ao caso para o intervalo $y-U$ a $y+U$. O valor de k geralmente está entre 2 e 3, mas pode assumir diversos outros valores. É comum calcular o número de graus de liberdade efetivos (v_{eff}) através da Equação 43, de Welch- Satterthwaite:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}}$$

Equação 43

onde “ u_c ” é a incerteza combinada, “ u_i ” é a incerteza padronizada associada à i -ésima fonte de incerteza, “ v_i ” é o n° de graus de liberdade associado à i -ésima fonte de incerteza, “ N ” é o n° total de fontes de incertezas analisadas.

Da aplicação da Equação 43, resulta o número de graus de liberdade efetivo. O valor “ k ” para o nível de confiança de 95% pode então ser obtido de tabelas estatísticas.

O resultado da medição é, então, convenientemente expresso como (Equação 44):

$$Y = y \pm U \quad \text{Equação 44}$$

Este resultado significa que a melhor estimativa do valor atribuível ao mensurando Y é y , com $[y - U$ a $y + U]$ sendo o intervalo no qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos a Y .

As incertezas para os trabalhos com os OTs e as estrobilurinas foram calculadas considerando os componentes mais relevantes para os cálculos que estão expressos no diagrama de causa e efeito para as medições em CE.

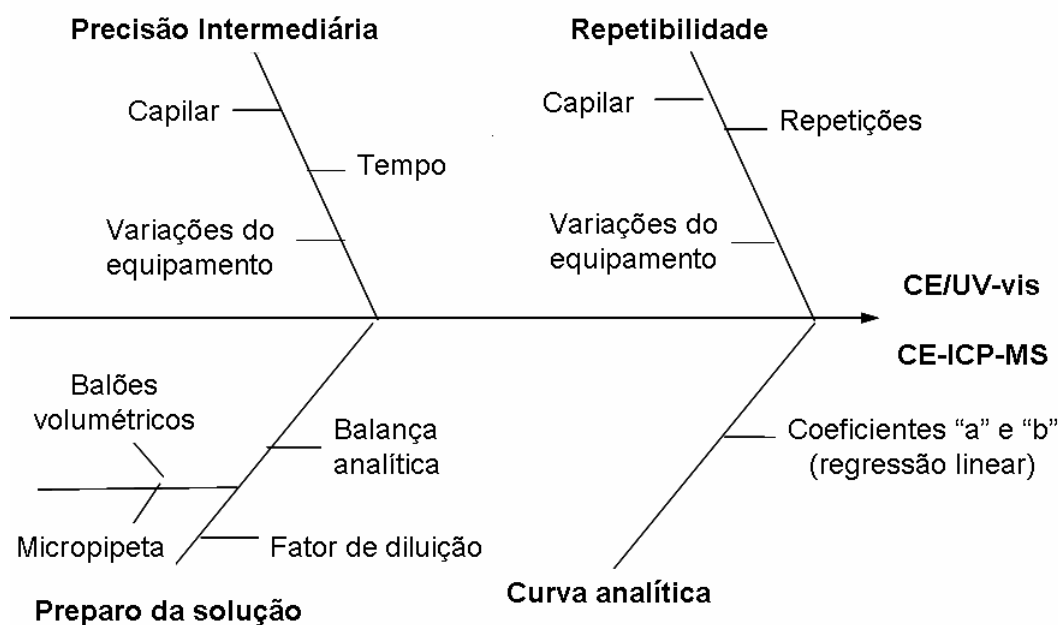


Figura 17: Diagrama de causa e efeito (*Ishikawa*) para a técnica CE.

As incertezas de entrada são agrupadas em quatro grupos: principais e estimadas para cada componente relevante: (i) Preparo de Soluções, (ii) Repetibilidade, (iii) Precisão intermediária e (iv) Curva analítica. Uma vez estimada a incerteza de cada componente, é possível calcular a incerteza combinada e expandida.

A incerteza associada à repetibilidade (u_{repe}) foi calculada pela estimativa do desvio padrão “ s_r ”, com dez repetições de uma mesma solução, sob as mesmas condições. E a incerteza associada à precisão intermediária foi calculada pela estimativa do desvio padrão da precisão intermediária “ $s_{p,i}$ ”, através de 10 substratos distintos de uma mesma solução em diferentes dias, sob as mesmas condições.

A estimativa da incerteza do componente curva foi calculada com base nos coeficientes da curva analítica, Equação 45.

$$u_{curva} = \sqrt{\left[(c_{i_a}^2 \times s^2 a) + (c_{i_b}^2 \times s^2 b) + (2 \times c_{i_a} \times c_{i_b} \times u_a \times u_b \times r) \right]}$$

Equação 45

onde: c_{i_a} é o coeficiente de sensibilidade igual a $\frac{y_{maior(u.a.)} - b}{a^2}$ (“ b ” intercepção da reta); c_{i_b} é o coeficiente de sensibilidade igual a $-1/a$ (“ a ” inclinação da reta); u_a é

a incerteza de “a” e é igual a $\sqrt{s^2 a}$ ($s^2 a = \frac{s^2 \times \sum C^2}{D}$); u_b é a incerteza de “b” e é igual a $\sqrt{s^2 b}$ ($s^2 b = \frac{n \times s^2}{D}$); D é o desvio padrão igual a $(n \times \sum C^2) - (\sum C)^2$; “C” é a concentração em mol L⁻¹ e “r” é a razão entre “a, b” e é igual a $\frac{\sum C}{\sqrt{(n \times \sum C^2)}}$.

Conforme descrito, os parâmetros balança analítica, micropipeta e balão volumétrico contribuem na estimativa da incerteza associada ao preparo de soluções. Sendo assim, a incerteza associada ao preparo de soluções (u_s) foi calculada conforme a Equação 46.

$$u_s = \sqrt{\left(\left(\frac{u_{mp1}}{k} \right)^2 + \left(\frac{u_{mp2}}{k} \right)^2 + \left(\frac{u_{bv}}{k} \right)^2 \right) \times (u_{fd})^2 + \left(\frac{u_{bal}}{k} \right)^2}$$

Equação 46

onde: “ u_{mp1} ” é a incerteza da micropipeta utilizada,, “ u_{bv} ” é a incerteza do balão volumétrico, “ u_{fd} ” é a incerteza do fator de diluição, “ u_{bal} ” é a incerteza da balança e, k é o fator de abrangência de cada componente. A razão entre o valor da incerteza expandida expressa no certificado “U” e o fator de abrangência “k” será a incerteza combinada (u_{comb}).

Com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza foram calculadas a incerteza combinada e incerteza expandida, conforme cálculo apresentado na Equação 47 e 48, respectivamente, para o

$$u_c = \sqrt{(u_{repe}^2 + u_{pi}^2 + u_s^2 + u_{curva}^2)}$$

Equação 47

$$U = u_c \times K$$

Equação 48

Resultados e Discussões

4

Estudo para determinação dos organoestanhos por CE-ICP-MS

Os compostos organoestanhos para os quais o método analítico hifenado de CE-ICP-MS foi desenvolvido foram três fenilestanhos: monofenilestanho (MPT), difenilestanho (DPT) e trifenilestanho (TPT). Vários estudos foram realizados para obter uma condição adequada para a separação eletroforética desses analitos previamente à introdução no ICP-MS. Como citado, em CE vários parâmetros são críticos para a obtenção da separação de espécies químicas pela migração diferenciada no capilar. O ajuste do pH da solução eletrolítica é o mais importante, pois dependendo do pH os analitos podem estar presentes em solução na forma de cátions, ânions ou na forma neutra o que, por sua vez, permite se definir as condições para se obter migração diferencial no capilar.

Dados da literatura indicam que os fenilestanhos estão carregados positivamente (são cátions) em soluções ácidas^{66, 67} por esse motivo o modo de separação por CE mais óbvio é o por zona, isto é, na abordagem de CZE na qual a separação os analitos ocorre principalmente devido à diferença em suas velocidades eletroforéticas que é função da razão carga/raio do íon.

4.1.

Otimização das condições de separação eletroforética

Para se realizar a otimização das condições de separação dos três fenilestanhos, os testes iniciais foram realizados em CE com detecção por fotometria de absorção no UV (detecção em 210 nm). A partir dessas condições, um ajuste foi feito para se alcançar condição adequada a ser utilizada no acoplamento do CE com o ICP-MS.

No trabalho de Guo Lei e colaboradores⁶⁷ a separação entre os analitos DPT e TPT (MPT, não foi incluído) foi obtida com tampão acetato 10 mmol L⁻¹ após adição de diferentes concentrações de ácido acético (0,1 a 1 mol L⁻¹). No trabalho de Jones and Riddick, a separação entre esses três OTs foi obtida, com baixa

resolução, com eletrólito contendo acetato de sódio, ácido acético e surfactante CABR em pH 2,60.⁶⁶

No presente trabalho, os primeiros testes foram realizados para verificar o melhor valor do pH (na faixa ácida) da solução eletrolítica para a separação dos fenilestanhos, tomando como base os dois trabalhos citados que utilizaram separação de OTs por CE para posterior detecção por fotometria de absorção. O valor do pK_a desses analitos é próximo de 5,20 (valor reportado para o TPT) e em solução ácida esses analitos vão estar protonados¹⁸⁰.

As soluções-estoque dos OTs para os estudos no CE com detecção por fotometria de absorção foram preparadas na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (aproximadamente 119 mg L^{-1} de estanho, de cada padrão individual das espécies) usando metanol para depois serem dissolvidas em diferentes meios: (i) água ultrapura, (ii) metanol: tampão acetato (10 mmol L^{-1} e pH 2,81) 50/50% v/v e (iii) tampão acetato (10 mmol L^{-1} e pH 2,81) antes de introduzi-las no capilar. A presença de metanol foi avaliada por se ter reportado a melhora a eficiência dos picos referentes ao DPT e ao TPT⁶⁷ em meio com este solvente. Os eletroferogramas da Figura 18 mostram que, nessas condições, o tempo de migração dos analitos sofre pequenas variações. Dois picos, indicados como pico 1 e pico 2 aparecem, sendo que o pico 2, em 19,2 min, tem ótima simetria e aparenta ser de apenas um analito. Em contraste, o pico 1, que tem tempo de migração entre 12 e 13 min, parece desdobrar em dois picos não resolvidos quando a solução de injeção contém o tampão (eletroferogramas b e c da Figura 18). Vale salientar que a altura do pico 2 é significativamente maior quando preparado com metanol e tampão acetato (eletroferograma b da Figura 18). Aparentemente, os picos do MPT e DPT, que deveriam ter mobilidades maiores (menores razões carga/raio do íon) que a do trifenilestanho e por isso tempos de migração menores, não se separaram.

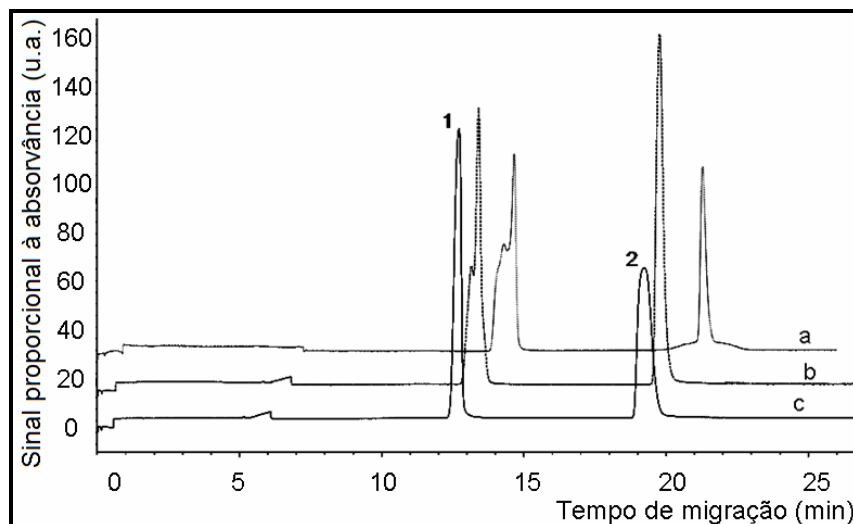


Figura 18: Análise de uma solução padrão contendo MPT, DPT e TPT (na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por CZE. Variações no preparo das soluções dos analitos: (a) água ultrapurificada, (b) metanol: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 2,81 50:50% v/v e (c) acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 2,81. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , pH 2,81. Capilar $60 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$ d.i., 25 kV , 25°C , injeção de 15 s a 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm .

Como pelo menos dois dos três analitos não se separou e desde que, a princípio, o desdobramento do pico 1 poderia indicar a presença de dois analitos na mesma zona, experimentos com cada um dos analitos, preparados separadamente, foi realizado de modo a identificá-los. Esses experimentos foram realizados com injeção dos analitos preparados em metanol: tampão acetato (10 mmol L^{-1}) 50/50% v/v por este ter propiciado melhor eficiência para o pico 2.

Na Figura 19 é mostrado que o pico com menor tempo de migração é referente ao TPT ($13,8 \text{ min}$) e que o desdobramento desse pico na Figura 18 era provavelmente decorrente da especiação deste na zona de composição ainda não otimizada. Já os picos do MPT e DPT, aparecem num tempo de migração maior ($20,5 \text{ min}$) e, isoladamente, são bem definidos e simétricos. É interessante observar que a absorvância medida para os três analitos aumenta proporcionalmente com o número de grupos fenil na estrutura. Isso ocorre, pois os grupos cromóforos estão isolados e não na forma de anéis conjugados onde ocorreria a deslocalização das nuvens eletrônicas e amplificação de capacidade de absorção acima da proporção presente de grupos fenil. Em tal caso, ocorreria também o deslocamento batocrômico da absorvância máxima dos compostos.

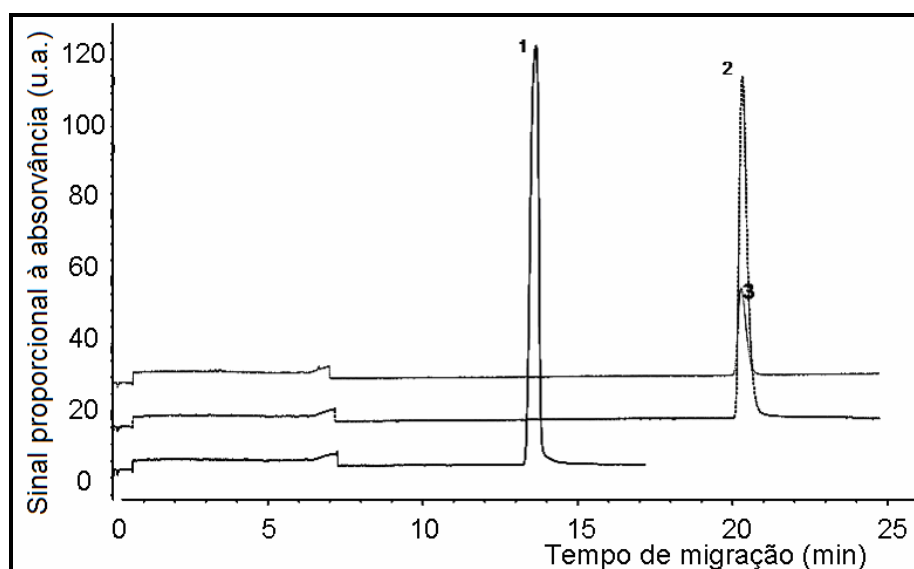


Figura 19: Análise de soluções-padrão dos OTs ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por CZE. (1) TPT, (2) DPT, (3) MPT. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 10 mmol L^{-1} e 1 mol L^{-1} , pH 2,81. Capilar $60 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$ d.i., 25 kV , 25°C , tempo de injeção de 15 s a 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm .

Uma aparente contradição ocorre na ordem de migração desses analitos, com o TPT (que possui maior raio iônico e menor mobilidade relativa) aparecendo com tempo de migração menor. Duas hipóteses podem explicar isso. Primeiro, por terem cargas positivas em solução ácida, os fenilestanhos têm tendência a aderir à parede do capilar e em solução não muito ácida, pode ocorrer alargamentos dos picos. Para explicar essa ordem de migração podemos sugerir que o MPT e DPT acabariam tendo menor velocidade de migração (tempos de migração maiores) devido ao fato de terem menor impedimento espacial e assim maior facilidade de adsorção à parede do capilar, o que os retarda em relação à migração do TPT. Esse problema de adsorção no capilar é comum nos trabalhos desenvolvidos para determinação de OTs.^{46, 66, 67} Essa mesma ordem de migração para DPT e TPT foi observada nos trabalhos citados e tomados como referência.^{66,67} A presença de ácido acético no eletrólito de trabalho é importante para diminuir a adsorção dos analitos a parede do capilar⁶⁷. Em meios com valores de pH extremamente ácidos ocorre menor hidrólise dos grupos silanois da parede do capilar com a redução da capacidade de adsorção dos analitos. A outra hipótese e mais plausível é que tanto o DPT quanto o MPT estejam na forma neutra em solução, sendo carregados apenas pela ação do EOF, o que faz com que o tempo de

aparecimento do pico do TPT (com carga positiva), seja menor e que não haja separação entre o DPT e o MPT.

Na Figura 20 são apresentados os eletroferogramas obtidos no estudo no qual se variou o valor do pH do eletrólito de corrida. O valor do pH foi alterado por adição de diferentes concentrações de ácido acético ao eletrólito contendo 10 mmol L⁻¹ de acetato de sódio. O ácido acético tem efeito no tempo de migração dos analitos. Com o aumento da concentração de ácido acético no eletrólito (0,25 a 1,0 mol L⁻¹) o tempo de migração dos analitos aumentou, pois ocorreu a diminuição na velocidade do EOF. A separação entre os picos referentes ao TPT e ao pico duplo de MPT e DPT foi maior com a redução do pH, mas não ocorreu a separação do MPT e do DPT. A altura do pico 2 (MPT e DPT) aumentou com a concentração de ácido acético no eletrólito até 1 mol L⁻¹. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. O eletrólito preparado com 1 mol L⁻¹ de ácido acético (pH 2,81) foi selecionado para os demais testes, pois o pico 2 apresentou maior altura e eficiência.

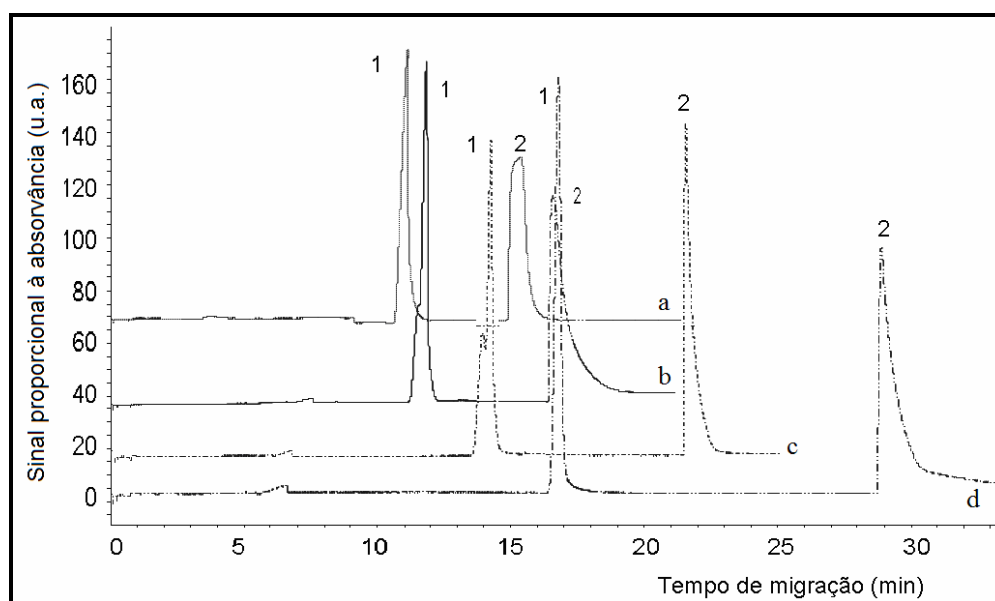


Figura 20: Análise de soluções padrão dos organoestanhos (1×10^{-4} mol L⁻¹) pelo método CZE. (1) TPT e (2) MPT e DPT Eletrólito de trabalho: acetato de sódio (10 mmol L^{-1}) com adições de diferentes concentrações de ácido acético: (a) 0,25 (pH: 3,31); (b) 0,5 (pH: 3,07), (c) 1,0 (pH: 2,81) e (d) 1,5 mol L⁻¹ (pH 2,60). Capilar 60 cm x 75 μm d.i., 25 kV, 25 °C, tempo de injeção de 15 s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm.

Tabela 1: Resultados após variação do pH (concentração de ácido acético no eletrólito).

| Analitos | Tempo (min) | Altura | Eficiência (N) | Resolução |
|----------|-------------|--------|----------------|-----------|
| pH 3,31 | | | | |
| TPT | 11,1 | 104 | 27403 | 11 |
| DPT | 15,3 | 62 | 16518 | |
| pH 3,07 | | | | |
| TPT | 11,8 | 129 | 26371 | 14 |
| DPT | 16,6 | 103 | 27650 | |
| pH 2,81 | | | | |
| TPT | 14,2 | 119 | 30037 | 22 |
| DPT | 21,5 | 126 | 59582 | |
| pH 2,60 | | | | |
| TPT | 15,7 | 118 | 65826 | 31 |
| DPT | 26,6 | 78 | 51507 | |

A presença de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila como modificadores químicos) na composição do eletrólito de trabalho também foi avaliada. Duas proporções de solvente orgânico, 10 e 25%, foram testadas. Na Figura 21 se observa que nenhum ganho de resolução entre os picos do MPT e do DPT foi obtido. Adicionalmente, houve um aumento nos tempos de migração e a simetria dos picos se degradou o que definitivamente contribuiu para a decisão de não se adicionar solventes orgânicos ao sistema.

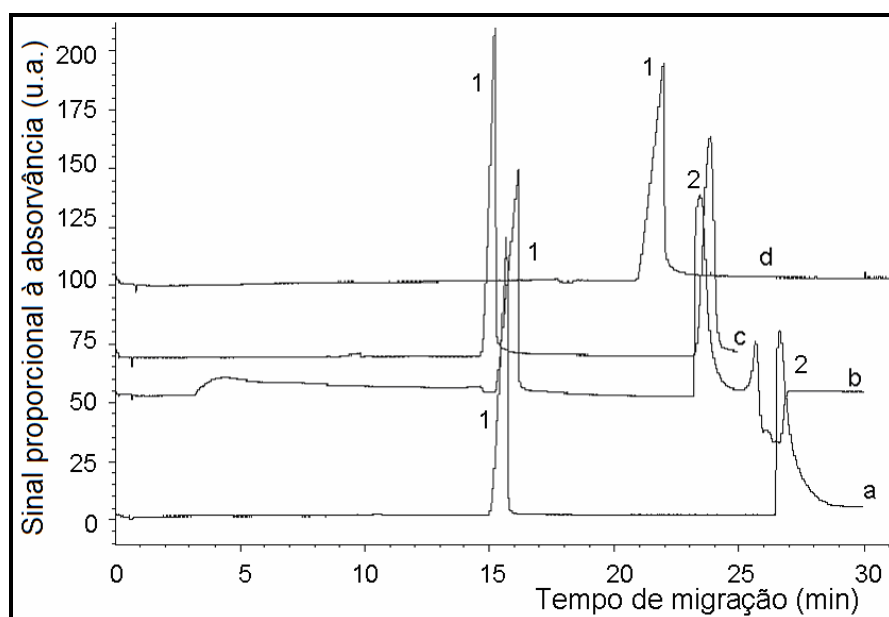


Figura 21: Estudo para avaliação da adição de solvente orgânico ao eletrólito de trabalho: (a) 10% v/v de acetonitrila, (b) 25% v/v de acetonitrila, (c) 10% de metanol, (d) 25% de metanol. (1) TPT e (2) MPT e DPT. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 10 mmol L⁻¹ e ácido acético 1 mol L⁻¹). Capilar 60 cm x 75 μm d.i., 25 kV, 25°C, tempo de injeção de 15s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm.

A adição de surfactantes no eletrólito de trabalho é um procedimento alternativo para diminuir a adsorção dos analitos carregados na parede do capilar.⁴⁶ Surfactantes catiônicos, como o CTAB, quando adicionado ao eletrólito de trabalho em concentrações abaixo da CMC, recobrem a superfície do capilar reduzindo a interação entre capilar e os analitos carregados em solução. Sendo assim, experimentos foram realizados com adição de diferentes concentrações de CTAB (abaixo da CMC que é de 0,92 mmol L⁻¹) no eletrólito de corrida na tentativa de melhorar o formato dos picos, em especial do MPT e DPT e auxiliar no processo de separação destes dois organoestanhos.

A utilização da abordagem por CZE não permitiu a separação dos picos do MPT e do DPT. Assim, estudos foram realizados usando a abordagem de eletrocromatografia capilar micelar (MEKC) para verificar a possibilidade da separação desses picos mediada pela interação diferenciada destes com uma fase pseudoestacionária. No entanto, vale lembrar que o uso de concentrações muito elevadas de surfactantes na solução não é favorável quando a detecção se dá pela

técnica de ICP-MS, pois o aumento da carga orgânica pode levar a altos valores de sinal de fundo, contaminação do espectrômetro e formação de depósitos de carbono na tocha e nos cones de amostragem, o que contribui com a deterioração destes. No entanto, nesta etapa do trabalho, os testes foram realizados usando detecção por fotometria no UV, o que permitiu se trabalhar em condições experimentais que independiam dos efeitos no sistema ICP-MS. Os testes de separação foram realizados com diferentes tipos de surfactantes. Surfactante aniônico (SDS – 20 mmol L⁻¹, tampão borato, pH 8,0), catiônico (CTAB – 5 mmol L⁻¹, tampão borato, pH 8,0), neutro (Triton X-100 – 10 mmol L⁻¹, tampão borato, pH 8,0) e anfótero (CHAPS – 25 mmol L⁻¹, acetato de sódio e ácido acético, pH 2,81) foram testados em concentrações maiores que os característicos de suas CMC.

Na Figura 22 são mostrados os eletroferogramas obtidos na presença de CTAB e de onde se conclui que a adição do surfactante não ajudou na separação dos analitos. Mesmo em concentração muito baixa de CTAB (0,005 mmol L⁻¹), um aumento no tempo de migração dos OTs foi observado. O aumento do tempo de migração pode ser explicado pela mudança de direção do EOF com o capilar recoberto pelo surfactante (Figura 22). A interação entre os analitos e a parede do capilar não foi alterada, nenhum ganho de sinal foi observado nem melhora na eficiência dos picos.

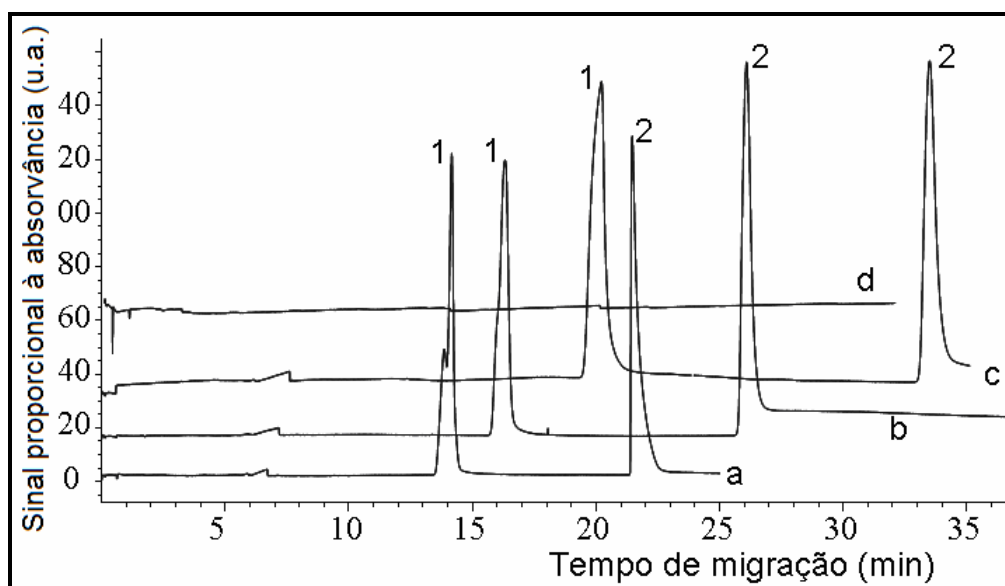


Figura 22: Análise solução padrão dos organoestanhos ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por CZE. Variação da concentração de CTAB no eletrólito de trabalho: (a) sem CTAB, (b) adição de $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$, (c) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e (d) $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$. Eletrólito de trabalho acetato de sódio 10 mmol L^{-1} , 1 mmol L^{-1} . Capilar $60 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m d.i.}$, 25 kV , $25 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de injeção de 15 s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm .

Na presença de SDS os picos dos OTs não forma observados. Com a utilização do surfactante CHAPS, que é um surfactante anfótero, não ocorreu a separação dos picos do MPT e DPT (como mostrado na Figura 23), nem mesmo com a adição de metanol como modificador químico (Figura 23 c). Assim, nas condições específicas de MEKC, o MPT continuou a migrar juntamente com o DPT e com tempo de migração maior que o TPT.

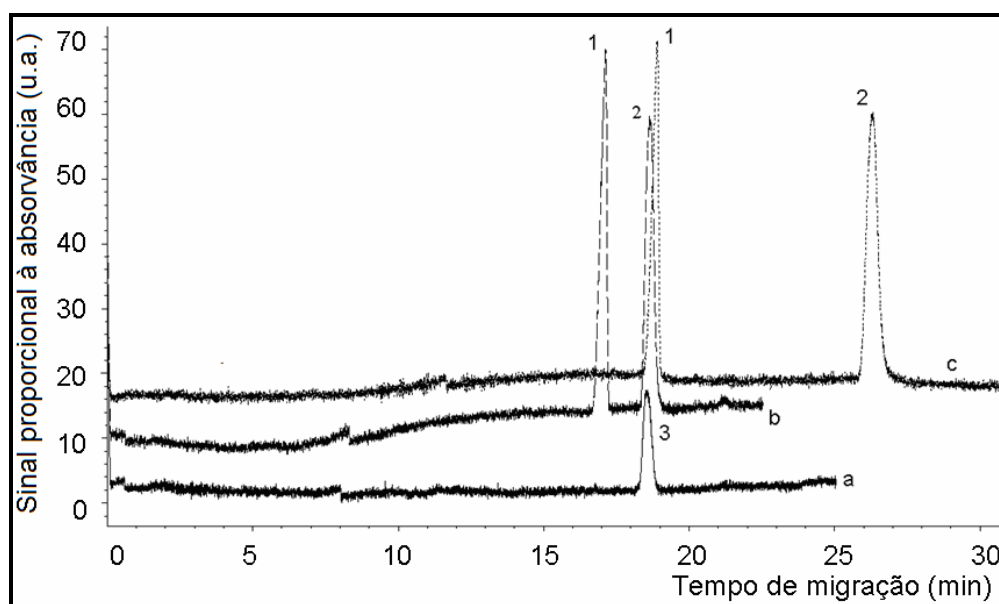


Figura 23: Eletroferogramas obtidos para os organoestanhos com o uso de 15 mmol L⁻¹ do surfactante CHAPS com eletrólito: acetato de sódio 10 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ pH = 2,81; (a) solução com apenas MPT (3) e (b) solução com (1) TPT, (2) MPT e DPT, (3) MPT (c) solução com os três analitos e eletrólito acrescido de 10% de MeOH. Capilar 60 cm x 75 μm d.i., 25 kV, 25 °C, tempo de injeção de 15 s com 50 mbar de pressão. Detecção em 210 nm.

Como o esforço para alcançar a separação dos picos do MPT e DPT por eletroforese, seja por CZE ou por MEKC, não foi atingida, decidiu-se por continuar o trabalho apenas com o TPT e DPT no modo CZE. Nessa abordagem com amostras reais, de fato se determinaria conjuntamente as concentrações do MPT e do DPT, já que ambos contribuiriam com quantidades equivalentes de Sn quando da detecção por ICP-MS. Embora não ideal, essa abordagem permitiria a determinação das espécies feniladas de estanho, o TPT em um pico e os outros dois contribuindo na intensidade do outro pico. A detecção de ambos, o DPT e o MPT é seletiva em relação às outras espécies que são levados junto com o EOF já que a detecção é feita pela quantificação do Sn.

4.2.

Ajuste final de condições para separação do trifenilestanho e do difenilestanho por CZE

Um ajuste final das condições experimentais e instrumentais para a separação do TPT e DPT por CZE foi realizado, buscando apenas a redução dos tempos de aparecimento dos picos, já que a separação entre eles permite resolução de linha base e, dentro das condições de contorno estabelecidas, não haveria risco da sobreposição desses picos. A redução do tempo total de análise é importante para métodos desenvolvidos em CE-ICP-MS, porque com tempo de corrida muito alto fica inviável a utilização do ICP-MS pelo alto custo da operação.

Os efeitos da diferença de potencial aplicada (Figura 24), da concentração do tampão (Figura 25) e da temperatura (Figura 26) foram avaliados.

O ajuste da diferença de potencia, positiva, aplicada de 25 kV para 30 kV reduziu o tempo de análise em aproximadamente 6 min (Figura 24). Verificou-se que os menores tempos para o aparecimento dos dois picos (15 min) são mantidos com concentrações mais baixas do tampão (5 e 10 mmol L⁻¹), sendo que em concentrações maiores (20 mmol L⁻¹), o tempo de migração da zona mais lenta é aumentada em 50% (em torno de 20 min) como pode ser visto na Figura 25. Deste modo, a menor concentração (5 mmol L⁻¹) foi selecionada para uso com o sistema acoplado ao ICP-MS de modo a se reduzir a carga orgânica da solução nebulizada no plasma.

Os estudos com a temperatura indicaram que os analitos foram estáveis na faixa estudada (25 a 45 °C). Para a temperatura maior, o tempo para a espécie mais lenta, e que determina o tempo total da separação, foi reduzido em aproximadamente 2 min em relação ao observado com 25 °C (Figura 23) sendo assim favorável a análise com uso da detecção por ICP-MS.

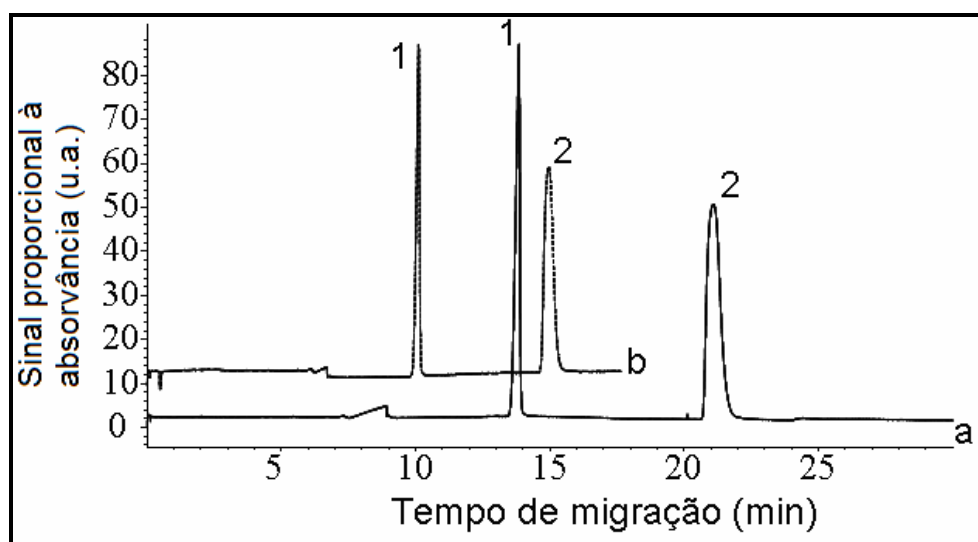


Figura 24: Efeito da variação da diferença de potencial aplicada na separação do difenilestanho e do trifenilestanho por CZE (a) 25 kV e (b) 30 kV. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1} , pH 2,81. Capilar $60 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 45°C , tempo de injeção de 15s com pressão de 50 mbar. Detecção em 210 nm. (1) TPT e (2) DPT.

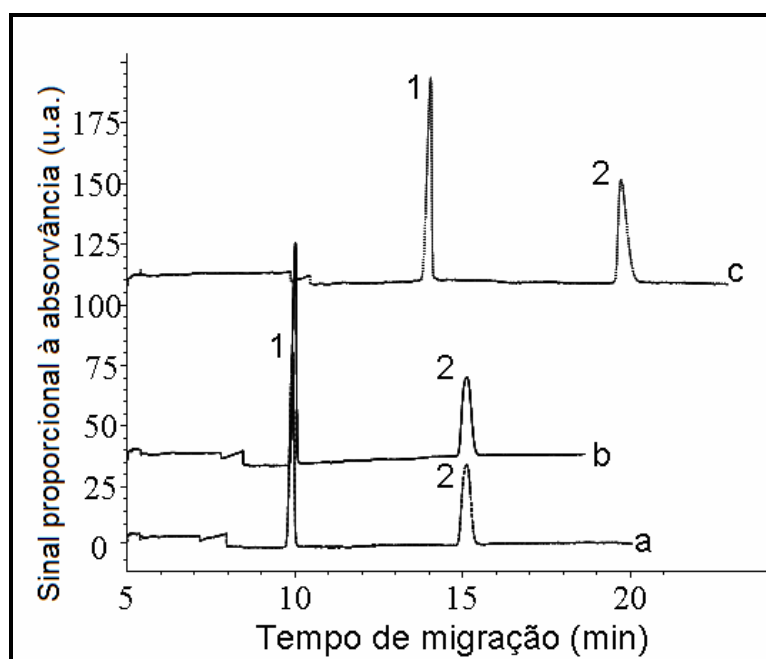


Figura 25: Variação da concentração do acetato de sódio no eletrólito de trabalho (a) 5 mmol L^{-1} , (b) 10 mmol L^{-1} e (c) 20 mmol L^{-1} com 1 mol L^{-1} , pH 2,81. (1) TPT e (2) DPT. Capilar $60 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., 25 kV, 25°C , tempo de injeção de 15s. Detecção em 210 nm. Pressão de 50 mbar aplicada após 10 minutos de corrida.

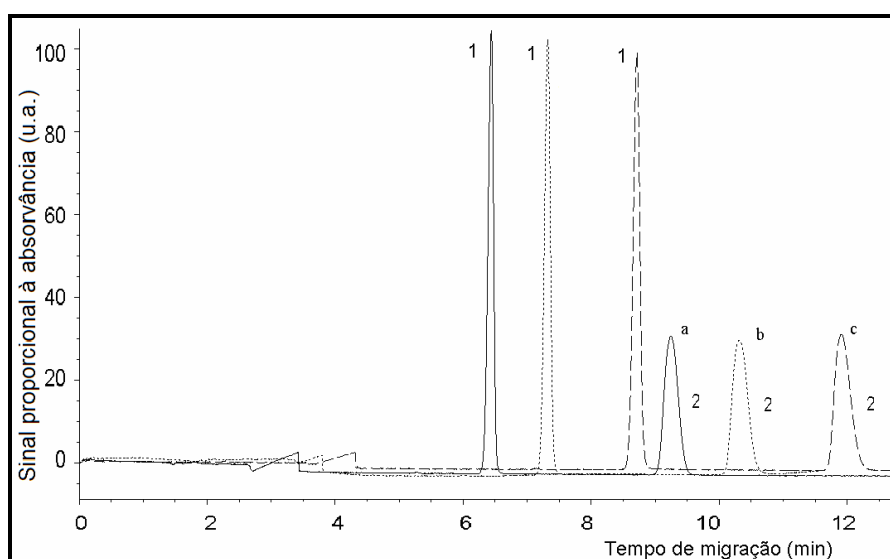


Figura 26: Efeito da variação da temperatura na separação do difenilestanho e do trifenilestanho por CZE, (a) 45 °C, (b) 35 °C e (c) 25 °C. Eletrólito de trabalho: acetato de sódio 5,0 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹, pH 2,81. Capilar 60 cm x 75 µm d.i., 25 kV, 25°C, tempo de injeção de 15 s. Detecção em 210 nm. . (1) TPT e (2) DPT.

Além dos três fatores ajustados na descrição acima, o tempo de injeção da amostra no capilar (a 50 mbar) foi testado em três níveis, 10, 30 e 50 s. O aumento do volume injetado tem óbvia consequência na intensidade da resposta analítica e logo na melhoria da sensibilidade do método. No entanto, o aumento do volume pode prejudicar a resolução entre os picos por causa do aumento da largura das zonas e pode afetar a simetria. Na Figura 27 fica evidente que existe um aumento relevante de sinal com 30 s de injeção e que possibilitou o aparecimento de picos bem simétricos. Embora a resolução entre picos não tenha sido afetada com a injeção por 50 s, a simetria é degradada e ocorre alargamento dos picos. Assim, o volume de injeção de 30 s foi estabelecido.

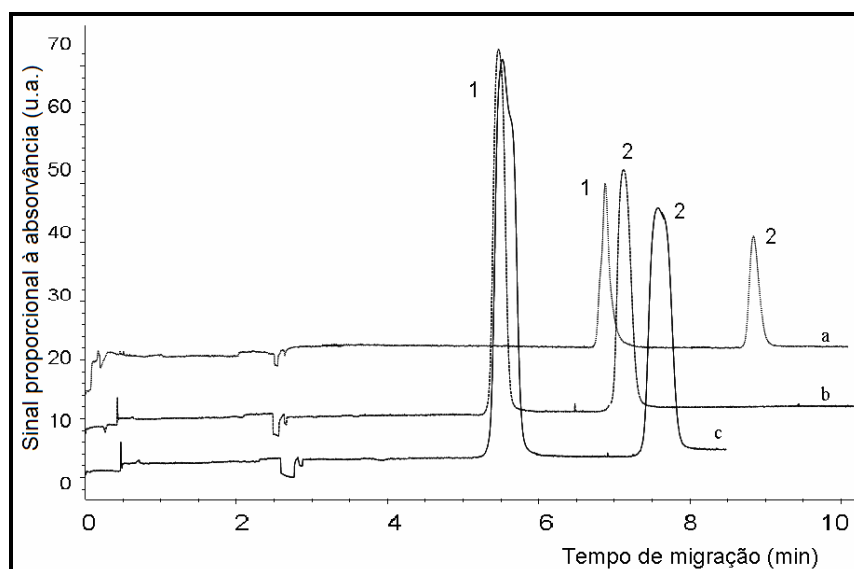


Figura 27: Efeito da variação do tempo de injeção (a) 10, (b) 30 e (c) 50s. Eletrólito de trabalho: tampão acetato ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 2,81). Capilar 60 cm x $75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i., $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 kV. Detecção em 210 nm. (1) TPT e (2) DPT.

As condições de separação obtidas no equipamento com detecção espectrofotométrica foram transferidas para o sistema acoplado ao ICP-MS. O uso do ICP-MS traz uma vantagem importante em termos de sensibilidade das determinações, já que a detecção por fotometria de absorção em 210 nm depende da absorvidade molar (de baixa e média magnitude, da ordem de $10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dos grupos fenila isolados na estrutura dos compostos organoestanhos. Além disso, a magnitude do caminho óptico em medições fotométricas no capilar contribui para a baixa capacidade de detecção dessa abordagem em relação à detecção por espectrometria de massa.

Diferentes interfaces podem ser utilizadas para o acoplamento entre o CE e o ICP-MS. A escolha para a realização do acoplamento neste trabalho se baseou na experiência prévia de Assis e colaboradores¹⁶⁷ que avaliou várias interfaces nos seus estudos para especiação de arsênio com CE-ICP-MS. A interface utilizada consistiu de um nebulizador de fluxo paralelo Mira Mist CE acoplado a uma câmara ciclônica de nebulização. Com esse sistema espera-se um compromisso entre volume total introduzido e a quantidade da névoa que efetivamente é introduzida no ICP. Como o princípio de introdução da solução do capilar no sistema não é auto-aspirante, uma solução de complementação foi transportada por uma bomba de HPLC de duplo pistão. A vazão dessa solução de

complementação foi mantida em $40 \mu\text{L min}^{-1}$, o que permitiu boa estabilidade do sinal do Cs^+ presente na solução de complementação. A solução de complementação tem a função de fechar o circuito elétrico e providenciar um volume suficiente de líquido para possibilitar a nebulização da solução que sai do capilar que é de apenas alguns nL min^{-1} . No entanto, o volume aspirado deste líquido deve ser o menor possível para que não haja grande diluição da amostra que sai do capilar, mas o suficiente para permitir o transporte do analito até o plasma. A presença do Cs^+ ($m/z = 133$) permitiu o monitoramento constante das condições de introdução da névoa de solução no ICP. A vazão do gás de nebulização foi ajustada diariamente e variou entre $1,0$ e $1,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Como já discutido, a solução de complementação deve ser conter eletrólitos que garantam boa estabilidade da corrente elétrica, gerada após a aplicação da diferença de potencial para separação eletroforética. Porém, ela também não deve causar impacto relevante na corrosão do sistema de introdução e nos cones de amostragem do ICP-MS. Além disso, os eletrólitos presentes nessa solução não devem causar interferências (espectrais e não-espectrais) no sinal analítico medido no ICP-MS. Para os trabalhos com os OTs, decidiu-se usar a solução de complementação recomendada pelo fabricante do nebulizador, que é uma solução aquosa de NH_4NO_3 , contendo Cs^+ ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e 10% de metanol, em volume, sendo o pH da solução ajustado com a adição de acetato de sódio e ácido acético para o mesmo valor da solução do tampão de separação (pH 2,81). A presença do álcool tem como objetivo diminuir a constante dielétrica da solução, favorecendo a formação de gotas menores e, com isso, aumentar a eficiência do transporte e da ionização das espécies no plasma.

Os primeiros testes com o sistema com o CE acoplado ao ICP-MS foram realizados para avaliar as condições de separação eletroforética por CZE definidas nos experimentos com a determinação fotométrica no UV.

A concentração do tampão do eletrólito de trabalho foi reavaliada juntamente com o ajuste da concentração dos eletrólitos da solução de complementação. Na Figura 28 observa-se que a resolução da separação entre os picos do DPT e do TPT foi mantida em todas as concentrações estudadas, porém verificou-se o aumento do tempo de migração das espécies de OTs com o aumento da concentração de eletrólito. Além disso, com concentrações maiores de eletrólitos, ocorreu degradação do pico 2 (o do DPT) em termos da simetria. O

sinal do Cs ficou constante durante o tempo de análise mostrando pequena flutuação do volume de solução nebulizada. O eletrólito de corrida foi mantido nas condições estabelecidas previamente (acetato de sódio $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e 1 mol L^{-1} , pH 2,81) e a solução de complementação selecionada continha NH_4NO_3 na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, além de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cs (pH ajustado para 2,81) e 10% de metanol. A composição da solução de preparo dos analitos foi reavaliada (Figura 29) para verificar o comportamento dos analitos por causa dos benefícios que o álcool pode trazer na melhoria do sinal analítico decorrente da melhoria da eficiência de nebulização. Foi verificado que os analitos podem estar tanto em solução eletrolítica contendo metanol quanto em eletrólito puro. Já a preparação com água apenas acarretou na queda do sinal de ^{120}Sn medido.

Na Tabela 2 estão listadas as condições escolhidas para a determinação de DPT e TPT utilizando CE-ICP-MS. Essas condições foram usadas para estabelecer os parâmetros de mérito do método.

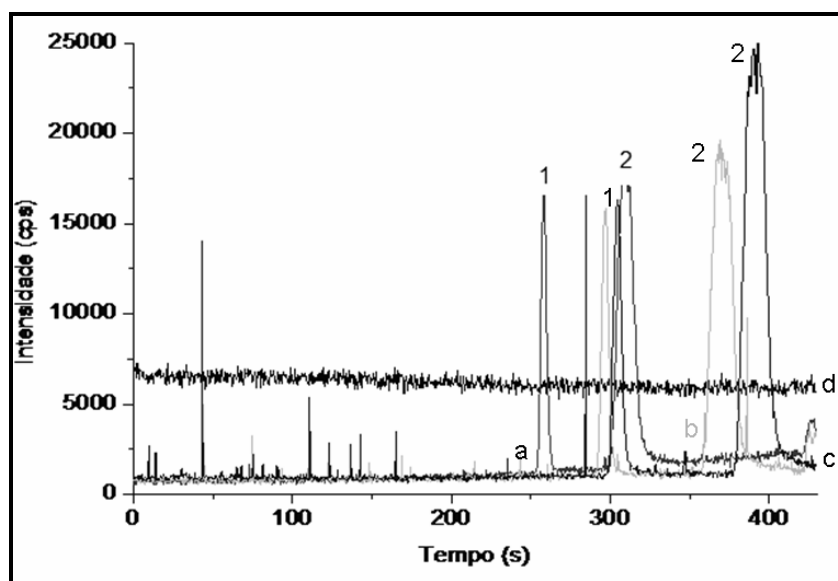


Figura 28: Efeito da variação de ambas, da concentração do acetato de sódio (pH 2,81) e do NH_4NO_3 presente na solução de complementação. (a) 5, (b) 10 e (c) 15 mmol L^{-1} . Solução contendo TPT (1) e DPT (2), sinal monitorado ^{120}Sn . (d) Sinal do ^{133}Cs . Capilar de 56 cm x $75 \mu\text{m}$ d.i, 30 kV, 45°C .

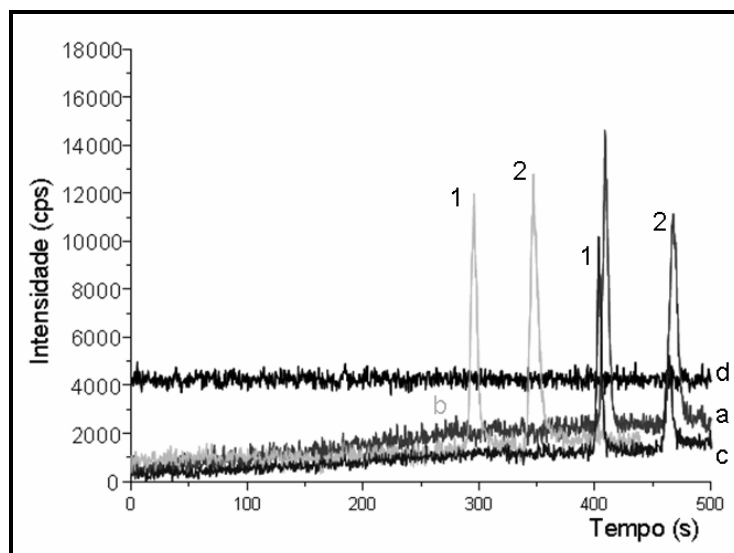


Figura 29: Estudo para avaliação da presença de metanol na solução de preparo dos analitos, (a) Metanol: acetato de sódio 5 mmol L⁻¹ (pH 2,81) 50/50% v/v; (b) Tampão acetato (0,5 mmol L⁻¹, pH 2,60); (c) 100% solução aquosa. Solução contendo TPT (1) e DPT (2) e o sinal monitorado foi o ¹²⁰Sn. Capilar de 56 cm x 75 µm d.i, 30 kV, 45 °C.

Tabela 2: Condições escolhidas para as análises por CE-ICP-MS.

| Parâmetros | Condição escolhida |
|-------------------------------|--|
| Diferença de Potencial | 30 kV |
| Temperatura | 45°C |
| Capilar | 60 cm comprimento total, 75 µm d.i. |
| Tempo introdução | 30 s |
| Solução analitos | MeOH:eletrólito 50% v/v |
| Eletrólito | 5 mmol L ⁻¹ , 1 molL ⁻¹ , pH 2,81. |
| Solução complementação | NH ₄ NO ₃ 5 mmol L ⁻¹ , Cs ⁺ 1 µg L ⁻¹ , 10% v/v metanol |
| Vazão bomba 1 (presistáltica) | 40 µL min ⁻¹ |
| Vazão bomba 2 (pistão) | 40 µL min ⁻¹ |
| Potência Plasma | 1200 W |
| Vazão Ar (plasma) | 15 L min ⁻¹ |
| Vazão Ar (auxiliar) | 1 L min ⁻¹ |
| Vazão Ar nebulização | Otimizado diariamente |
| Isótopo (m/z) | ¹²⁰ Sn e ¹¹⁸ Sn |

4.3.

Parâmetros de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito, linearidade da resposta analítica, capacidade de detecção (LOQ e LOD), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (testes de recuperação) do método desenvolvido foram calculados e estão apresentados a seguir.

4.3.1.

Resposta linear

As curvas analíticas foram feitas na faixa de concentração entre 0,42 a 17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,05 a 2,0 mg L^{-1} em termos de Sn) para cada analito (TPT e DPT). As medidas para cada nível de concentração foram realizadas em triplicata. Na Figura 30 são mostradas as curvas analíticas e os gráficos de resíduos para TPT (Figura 30A) e DPT (Figura 30B). Comportamento linear pode ser observado em ambas as curvas analíticas, após verificar a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, pelo teste de Grubbs¹⁸¹. Os valores de coeficientes de correlação (r), de determinação (R^2) foram superiores a 0.99 (Tabela 3). No caso dos gráficos de resíduos, o padrão de distribuição aponta a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta, confirmando a escolha pelo comportamento linear e homoscedástico.

A adequação do modelo linear pode ser avaliada através do teste F de *Snedecor–Fisher* (Equação 32). Os valores de F calculados foram iguais a 3638 e 2239, para TPT e DPT, respectivamente. Os valores foram comparados com os valores da tabela F, considerando seus graus de liberdade (gl). Como os valores calculados foram superiores ao valor crítico ($F_{\text{crítico}} = 4,494$), pode-se dizer que o modelo linear é estatisticamente válido. A Tabela 3 apresenta também os valores obtidos para t e p . O teste t de Student trata como hipótese nula (H_0) a suposição de que a área do pico e a concentração de analito não se relacionam linearmente. Em um nível de significância de 5%, o valor calculado de t comprovaria ou rejeitaria esta hipótese. Os valores de t calculados para ambos analitos são bastante superiores ao valor crítico ($t_{\text{crítico}} = 2,57$), sendo a hipótese nula rejeitada, resultando em um modelo

que relaciona linearmente intensidade de sinal e concentração. Os valores de p são menores do que o valor de α (significância) para o qual rejeitamos a hipótese nula para ambos os casos. Se $\alpha=0,05$, então, para um valor $p \geq 0,05$ não se rejeita H_0 , caso contrário, rejeita-se H_0 . No caso deste estudo, $p < 0,05$. Assim, temos que, ao nível de 5% de significância, rejeita-se H_0 , resultando em um modelo que relaciona linearmente a área do pico com a concentração do analito. A partir dos diversos testes estatísticos, pôde-se concluir que o método apresenta resposta linear para ambos OTs.

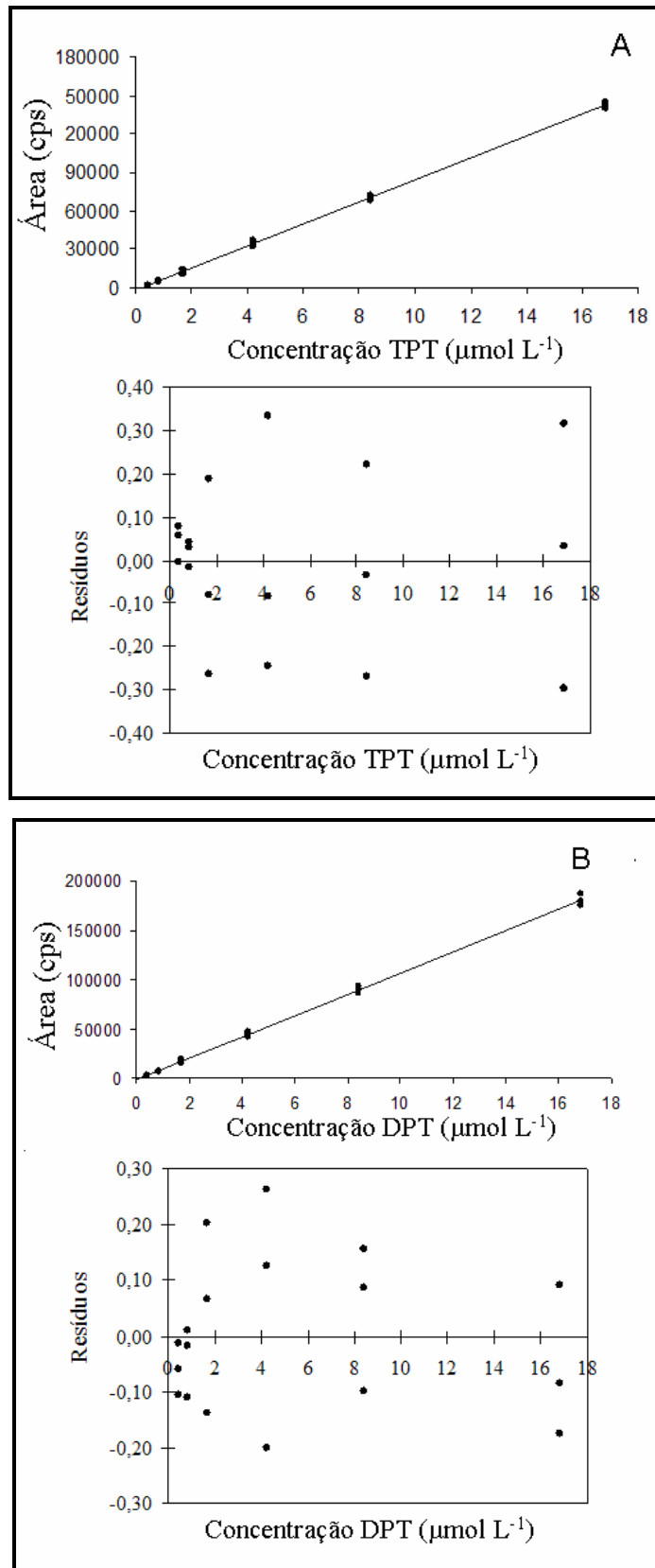


Figura 30: Curvas analíticas e gráficos de resíduos para o TPT (A) e DPT (B).

Tabela 3: Parâmetros das curvas analíticas.

| Parâmetros | Organoestanhos | |
|--|--------------------------|--------------------------|
| | Trifenilestanho | Difenilestanho |
| Coeficiente Angular (L μmol^{-1}) | 8624 \pm 142 | 11084 \pm 234 |
| Coeficiente Linear | - 2289 \pm 1130 | 2352 \pm 1850 |
| R ² | 0,996 | 0,993 |
| r | 0,998 | 0,996 |
| F _{cal} | 3638 | 2239 |
| t _{cal} | 60,3 | 47,3 |
| p | 2,65 x 10 ⁻²⁰ | 1,26 x 10 ⁻¹⁸ |

4.3.2.

Limite de detecção e de quantificação instrumental

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ), utilizados para a avaliação da capacidade de detecção, foram calculados utilizando os valores obtidos por medições de soluções preparadas contendo a menor concentração dos analitos que poderiam ser diferenciados do sinal de fundo. Os valores de s_b foram calculados após medição de sete soluções distintas. Os cálculos foram feitos conforme Equação 32, Equação 33, Equação 34 e Equação 35. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Limite de detecção e de quantificação de TPT e DPT.

| | Analitos | | | | | |
|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | Trifenilestanho | | Difenilestanho | | Sn | |
| | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | $\mu\text{g L}^{-1}$ | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | $\mu\text{g L}^{-1}$ | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | $\mu\text{g L}^{-1}$ |
| LOD ($x + 3s_b$) | 0,13 | 50 | 0,13 | 45 | 0,13 | 15 |
| LOD ($3s_b/a$) | 0,085 | 33 | 0,036 | 29 | --- | --- |
| LOQ ($x + 10 s_b$) | 0,42 | 162 | 0,42 | 144 | 0,42 | 50 |
| LOQ ($10s_b/a$) | 0,28 | 108 | 0,119 | 96 | ---- | ---- |

4.3.3.

Repetibilidade

A repetibilidade do tempo de migração para a TPT e DPT apresentou variações entre 4% e 6%, respectivamente (Tabela 5), sendo os maiores valores obtidos para o DPT. Para a área, as variações para o TPT foi de 3% para ambos os níveis de concentração avaliados. A variação da área para o DPT foi maior para o nível de maior concentração (3,7%). O DPT é mais atraído pela parede do capilar o que pode acarretar em maiores flutuações quanto ao tempo de migração e área dos picos. Esses valores podem ser considerados satisfatórios para a técnica CE-ICP-MS já que muitas variáveis estão envolvidas na hifenação.

Tabela 5: Valores da repetibilidade para o tempo de migração dos analitos e área.

| Analitos | Área (%) | | Tempo (%) | |
|----------|----------|---------|-----------|---------|
| | Nível 1 | Nível 2 | Nível 1 | Nível 2 |
| TPT | 2,8 | 3,5 | 4,2 | 4,0 |
| DPT | 2,0 | 3,7 | 6,2 | 5,8 |

Níveis de concentração: (1) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (2) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.4.

Precisão Intermediária

Os valores obtidos para a precisão intermediária (Tabela 6) mostraram que as maiores variações foram para o tempo de migração dos analitos. A variação entre 1,0 e 2,5% entre as áreas pode ser considerada satisfatória para a técnica CE-ICP-MS.

O teste F baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática dos valores obtidos em dias diferentes (MQ_{entre}) é dividida pela média quadrática dos valores obtidos em um mesmo dia (MQ_{dentro}), foi utilizado para dizer se existe diferença significativa entre as médias das áreas. O resultado encontrado é comparado com o da tabela F, considerando seus graus de liberdade (gl). Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias ($F_{\text{calc.}} < F_{\text{critico}}$) indica que não há diferença significativa entre as médias. O teste F foi aplicado para o TPT e DPT, nos dois níveis de concentração, para o tempo de migração e área dos picos (Tabela 6). Todos os valores de F_{cal} foram menores que o valor de F_{critico} (4,41), o maior valor de F_{cal} (3,95) foi para o tempo de migração do analito DPT no nível mais baixo de concentração. Por esses resultados poderia-se dizer que não existe diferença significativa, com nível de confiança de 95%, entre as médias das áreas e dos tempos de migração. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios para a técnica CE-ICP-MS.

Tabela 6: Valores da precisão intermediária e teste F para área e tempo de migração dos OTs.

| Nível | Área | | | | Tempo | | | |
|----------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|
| | 1 | | 2 | | 1 | | 2 | |
| Analitos | P.i (%) | F_{cal} | P.i (%) | F_{cal} | P.i (%) | F_{cal} | P.i (%) | F_{cal} |
| TPT | 1,0 | 0,13 | 2,2 | 0,39 | 6,0 | 1,49 | 5,5 | 1,55 |
| DPT | 1,7 | 0,16 | 2,5 | 0,35 | 6,5 | 3,95 | 6,0 | 0,98 |

P.i = precisão intermediária; Níveis: (1) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (2) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.5.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação em amostras de sangue e urina após fortificação dos OTs.

4.3.5.1.

Preparo das amostras de urina e sangue

Para os ensaios de recuperação, amostras em branco de urina foram fortificadas com os OTs de modo que a concentração final da solução ficasse próxima ao ponto médio das respectivas curvas analíticas. As amostras de urina foram coletadas de indivíduos saudáveis. Os testes iniciais com as amostras fortificadas foram realizados buscando analisar as amostras sem pré-tratamento com SPE.

Após coleta de 100 mL de urina, seis alíquotas de 10 mL foram transferidas para tubos de centrifuga de 15 mL e fortificadas com os OTs em diferentes valores de concentrações: Tubo (1) foi fortificado com $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, tubo (2) com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tubo (3) com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra. Os tubos foram então centrifugados por 20 min a 30.000 rpm. Alíquotas de 5, 2 e 1 mL foram retirados dos tubos 1, 2 e 3, respectivamente e transferido para balões volumétricos de 10 mL. A solução foi então diluída com uma solução contendo eletrólito de trabalho/metanol 50/50% v/v. A Figura 31 apresenta os eletroferogramas do teste de diluição e a Tabela 7 os resultados da recuperação dos analitos nas amostras analisadas. O menor valor de recuperação para o TPT (75%) foi obtido com amostra diluída apenas duas vezes (Figura 31 eletroferograma a), mas a recuperação melhora quando a amostra é diluída 5 ou 10 vezes. Já para o DPT as recuperações ficaram próximas a 75% em todos os casos. Para a amostra diluída 5 vezes (Figura 31 eletroferograma b) ocorreu um alargamento do pico do DPT, o que não foi observado nas demais diluições. Quando a amostra foi diluída 10 vezes a resposta em termos de alargamento de picos para o DPT e recuperação para TPT foi menor (Figura 31 eletroferograma c).

Uma diluição de 10 vezes foi selecionada como procedimento para análise de amostra de urina. Na Figura 32 estão os eletroferogramas de uma amostra de

urina fortificada, do branco da urina e de uma solução padrão, de modo a serem comparadas. Os tempos de migração dos analitos na amostra não sofreram variações significativas quando comparados aos obtidos na solução padrão dos analitos. As amostras com fator de diluição de 10 vezes foram então analisadas em 7 réplicas e as recuperações foram de $95 \pm 3\%$ para TPT e de $75 \pm 4\%$ para DPT.

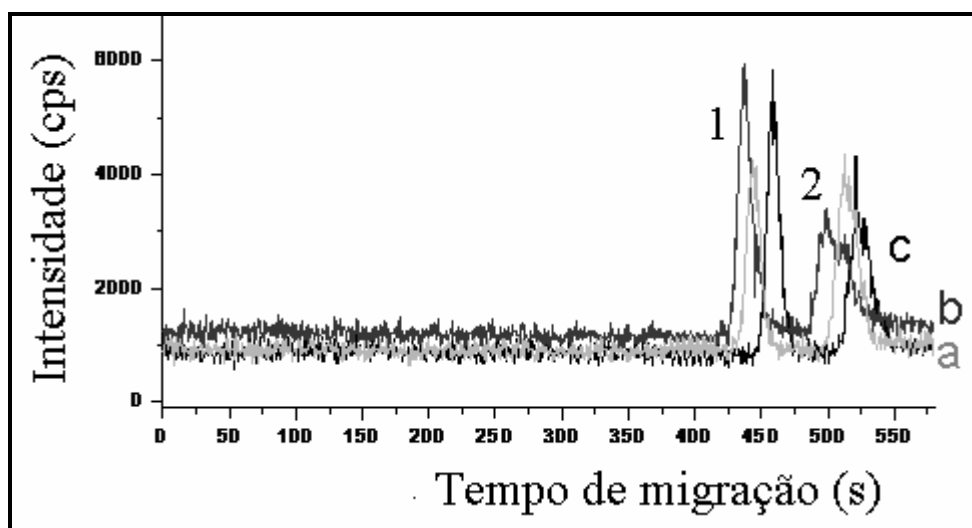


Figura 31: Teste de diluição da amostra de urina. (a) fator de diluição igual a dois; (b) fator de diluição igual a cinco e (c) fator de diluição igual a dez. Condições de análise conforme Tabela 2.

Tabela 7: Valores das recuperações das amostras de urina.

| Analitos | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|----------|-----------|-----------|-----------|
| TPT | 75% | 85% | 90% |
| DPT | 75% | 73% | 75% |

Amostra 1: fator de diluição 2; Amostra 2: fator de diluição 5; Amostra 3: fator de diluição 10.

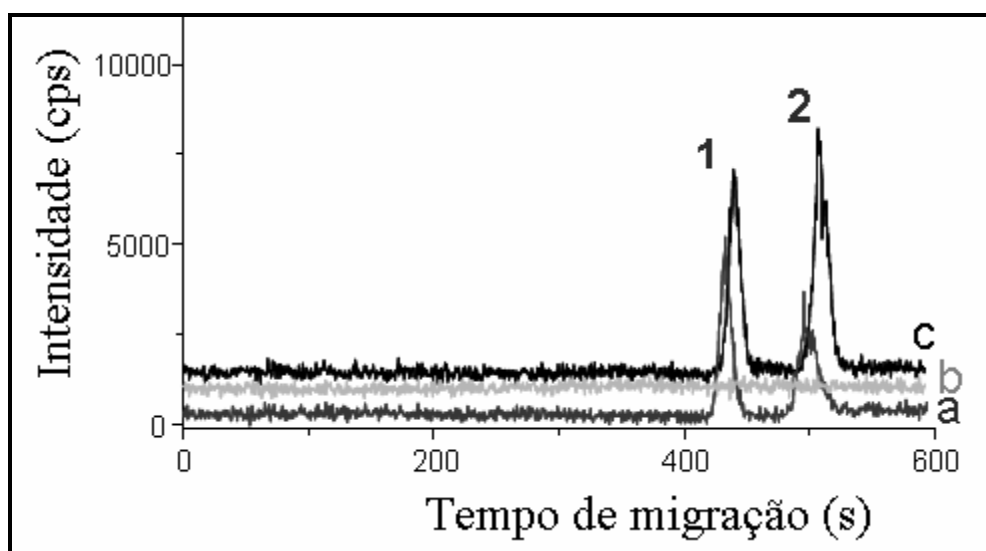


Figura 32: Análise de uma amostra de urina, (a) amostra enriquecida com os OTs, (c) branco da amostra, (c) solução padrão contendo (1) TPT e (2) DPT. Condições de análise conforme Tabela 2.

A SPE com cartuchos C-18 foi avaliada como tratamento para as amostras de urina com os testes iniciais realizados com o sistema CE com detecção fotométrica no UV (CE-UV).⁶⁷

As etapas do procedimento aplicado para limpeza e pré-concentração dos analitos nas amostras de urina foram: (i) 50 mL de amostra foram coletados e fortificados com $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TPT e DPT; (ii) centrifugação por 20 min a 30.000 rpm; (iii) o sobrenadante foi passado pelo cartucho C-18 previamente condicionado com 3 mL de MeOH e 5 mL de água; (iv) limpeza com 5 mL com água: metanol 90/10% v/v, seguido de 10 mL de água; (v) os analitos foram eluidos com 10 mL de metanol; (vi) a solução resultante foi levada à secura sob fluxo de nitrogênio e o resíduo retomado em 1 mL com metanol:eletrólito 50/50% v/v. Esse procedimento foi adaptado do trabalho de Pobozy e colaboradores que aplicou a SPE para amostras ambientais na determinação de TPT⁶⁰.

As recuperações nas amostras para TPT e DPT foram melhores após o procedimento com SPE. Os valores obtidos foram de $95 \pm 4\%$ para TPT e de $91 \pm 5\%$ para DPT nas análises realizadas por CE-ICP-MS. Os eletroferogramas da Figura 33 mostram os resultados do procedimento de SPE para uma amostra de urina.

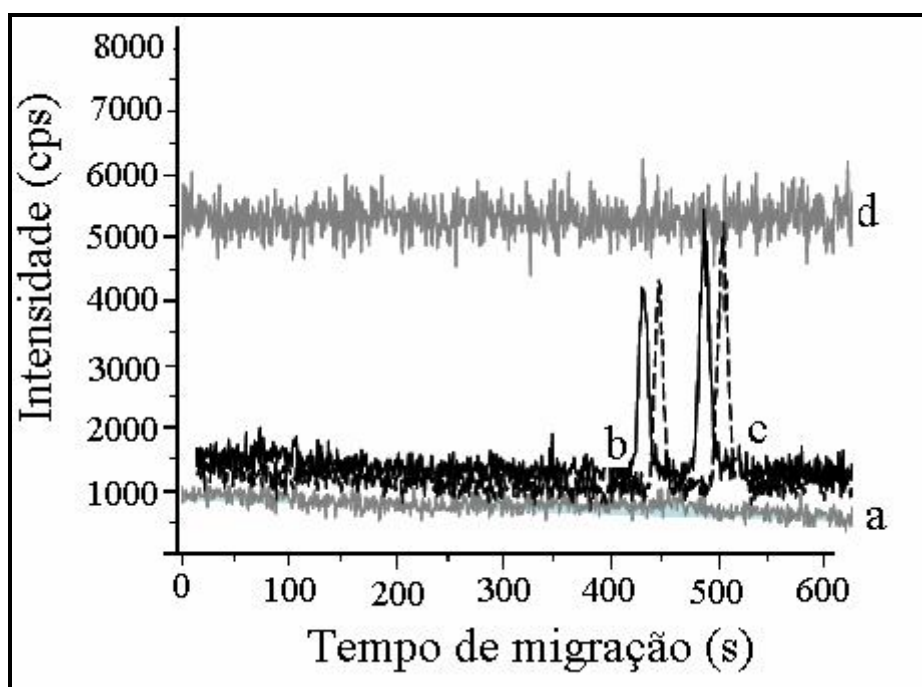


Figura 33: Análise de uma amostra de urina após procedimento com SPE, (a) branco da amostra (b) solução padrão contendo (1) TPT e (2) DPT, (c) amostra enriquecida com os OTs após procedimento de extração, (d) sinal do Cs^+ . Condições de análise conforme Tabela 2.

Para avaliar o grau de proximidade entre os resultados, as análises nas amostra de urina foram efetuadas em replicatas autênticas (com seis soluções independentes de amostra), utilizando o método em desenvolvimento e o método de comparação (CE-UV) nas mesmas amostras enriquecida inicialmente com $0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada OTs. Após o procedimento de limpeza e pré-concentração a solução final ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada OTs) pode ser analisada pelos dois tipos de detecção.

A comparação entre os métodos CE-ICP-MS e CE-UV foi feita aplicando-se o teste de hipótese, com comparação de médias. Curvas analíticas foram realizadas em ambos os métodos. Os resultados obtidos mostraram que não existe diferença significativa para o nível de 95% de confiança ($t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tabelado}} = 2,228$) para as amostras analisadas pelos os dois métodos. Os valores dos parâmetros calculados estão na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros calculados para a comparação entre os métodos.

| Analitos | Parâmetros | |
|----------|-----------------------|-----------|
| | S_p | t_{cal} |
| TPT | $6,82 \times 10^{-8}$ | 0,153 |
| DPT | $7,75 \times 10^{-7}$ | 0,187 |

S_p = desvio padrão agrupado; graus de liberdade (g.l) = 10.

As amostras de sangue foram coletadas de indivíduos saudáveis, livres de contaminação por organoestanhos, em laboratório especializado em tubos contendo anticoagulante heparina. A adição de organoestanho foi realizada antes da centrifugação para obtenção do plasma. Parte da amostra coletada foi centrifugada por 15 min a 2500 rpm e reservado para análise. As amostras de sangue sem passar pelo processo de centrifugação também foram analisadas. Para as análises das amostras de plasma ou sangue total (sem centrifugação) o metanol não pode estar presente na solução de diluição, pois ocorre a precipitação de proteínas, assim as amostras foram diluídas apenas com eletrólito de trabalho.

Na Figura 34, se observa que uma diluição de dez vezes do sangue total e do plasma não é suficiente para permitir a determinação de TPT. Assim, novos testes foram realizados e com uma diluição maior (50 vezes). As interferências nas amostras diminuíram para o TPT em relação à amostra diluída apenas 10 vezes (na Figura 35 são mostrados os eletroferogramas dessa análise). Os valores de recuperação para o TPT e DPT foram iguais a 92% e 90% nas amostras de plasma. Para as amostra de sangue total, a recuperação do TPT foi melhor em relação os valores obtidos para o DPT, mas as interferências são maiores em relação às amostras de plasma. As recuperações nas amostras de sangue total foram iguais a 85% e 73%, para DPT e TPT, respectivamente. Assim as análises de OTs devem ser realizadas no plasma sanguíneo. Não foram realizados outro tipo de tratamento nessas amostras.

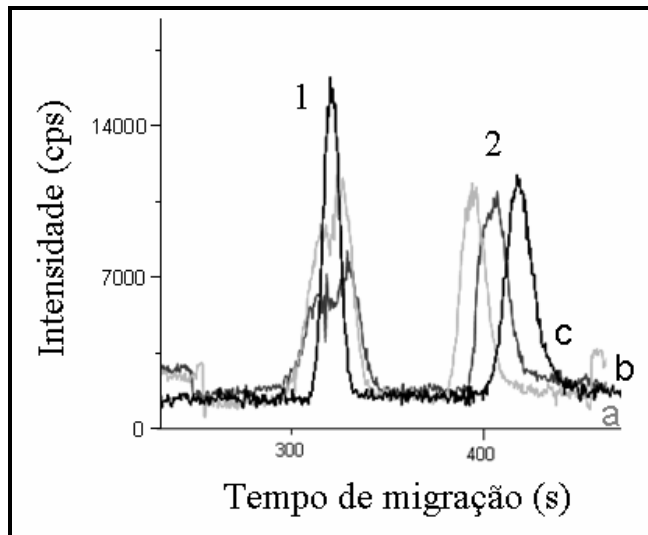


Figura 34: Amostra de sangue e plasma após diluição 10 vezes com a solução eletrolítica. (a) plasma, (b) sangue e (c) solução padrão. (1) TPT e (2) DPT.

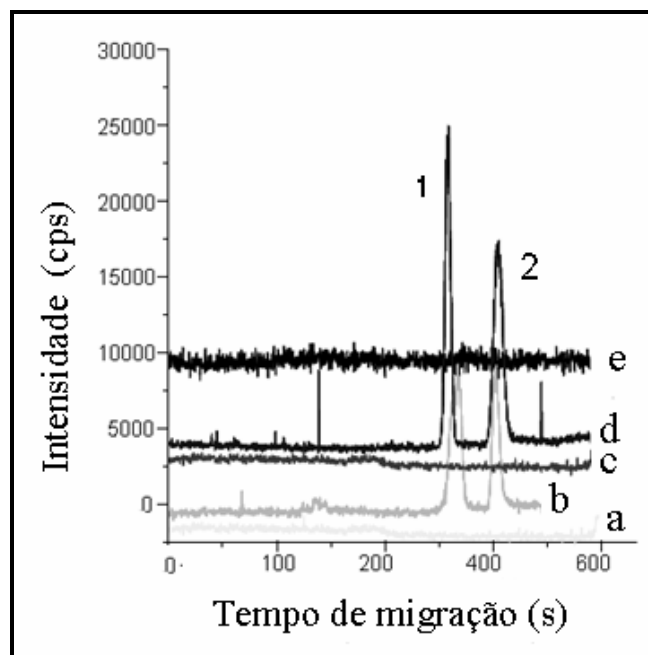


Figura 35: Eletroferogramas das amostras de plasma e sangue total diluídos 50 vezes com solução eletrolítica. (a) branco plasma, (b) amostra de plasma enriquecida com os OTs, (c) branco do sangue, (d) amostra de sangue enriquecida com os OTs. (e) sinal do $^{133}\text{Cs}^+$.

4.4.

Incertezas

As incertezas para o método desenvolvido com os OTs foram calculadas considerando os componentes mais relevantes para os cálculos que estão expressos no diagrama de causa e efeito para as medições em CE-ICP-MS (Figura 17).

Com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza, foram calculadas a incerteza combinada e a incerteza expandida, conforme cálculo apresentado nas Equação 47 e Equação 49, respectivamente. A Tabela 9 apresenta um resumo das incertezas calculadas para os dois níveis de concentração dos analitos TPT e DPT.

Tabela 9: Valores das incertezas calculadas para os dois níveis de concentração estudados para os dois analitos.

| | TPT | | DPT | |
|---|---|---------|---|---------|
| | Nível 1 | Nível 2 | Nível 1 | Nível 2 |
| Fontes de incertezas | Incertezas ($\mu\text{ mol L}^{-1}$) | | Incertezas ($\mu\text{ mol L}^{-1}$) | |
| Preparo soluções | 0,12 | 0,10 | 0,12 | 0,10 |
| Repetibilidade | 0,029 | 0,29 | 0,021 | 0,32 |
| Precisão Intermediária | 0,010 | 0,17 | 0,010 | 0,19 |
| Curva analítica | 0,10 | 0,10 | 0,14 | 0,14 |
| Incerteza combinada | 0,16 | 0,36 | 0,18 | 0,41 |
| Incerteza expandida ($U_{k=2,01; 95\%}$) | 0,32 | 0,72 | 0,36 | 0,82 |

Níveis: (1) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (2) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Uma vez identificada e calculada a incerteza de cada componente, é possível verificar quais destes componentes são mais relevantes para o processo. O gráfico de barra, Figura 36, apresenta a contribuição de cada componente de incerteza para os níveis avaliados para cada analito. Considerando os valores de concentração, a maior fonte de incerteza foi o preparo das soluções (11%) e a curva analítica (10 e 14%) para o nível de menor concentração de ambos analitos.

As soluções foram preparadas por ajuste de volume e para o nível de menor concentração as contribuições da incerteza da micropipeta e do fator de diluição foram mais expressivas neste caso. A incerteza combinada para o menor valor de concentração do TPT foi de 16% e 18% para o DPT, apesar dos valores serem maiores que 10%, pode-se considerá-los adequados para as medidas nesse nível de concentração utilizando a técnica de CE-ICP-MS. Utilizando preparo de soluções por ajuste de massa essa incerteza poderá ser reduzida.

Para o nível de maior concentração a maior fonte de incerteza foi a repetibilidade, 3,5 e 3,7% para TPT e DPT, respectivamente. A incerteza do preparo das soluções nesse caso não foi expressiva, pois a incerteza do fator de diluição foi menor em relação ao nível 1. A incerteza combinada para o nível de maior consideração foi de 4 e 5%, para TPT e DPT, respectivamente, sendo adequadas para as medidas realizadas em CE-ICP-MS.

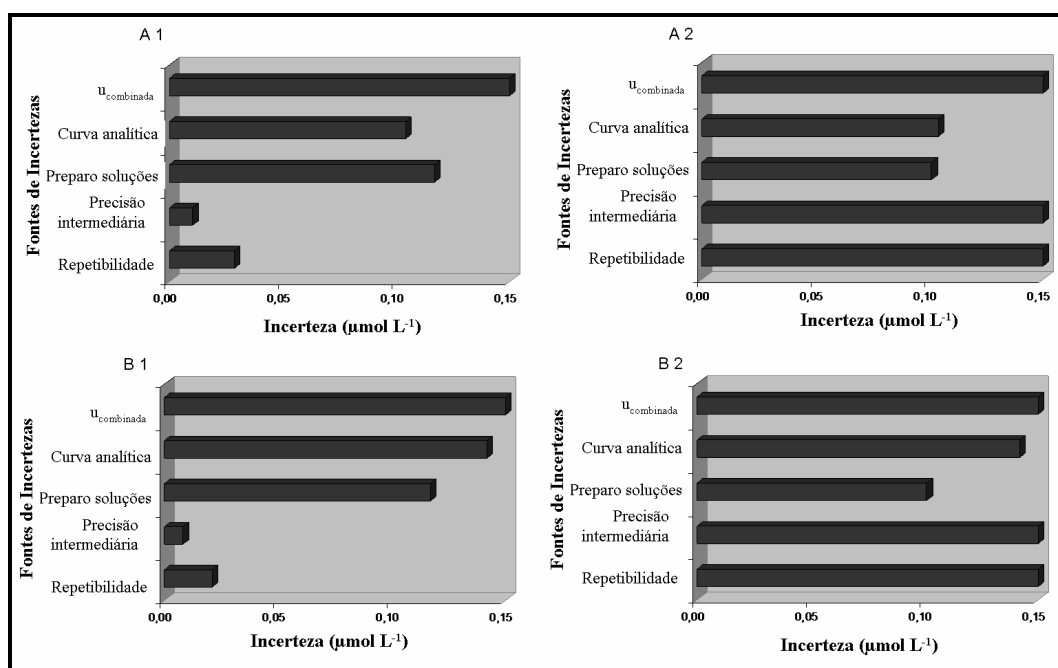


Figura 36: Gráfico de barras com as incertezas de cada componente nos níveis estudados. (A1) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (A2) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para TPT. (B1) $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (B2) $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para DPT.

O método para determinação de OTs por CE-ICP-MS foi desenvolvido e validado com aplicações em amostras biológicas.

5

Determinação de estrobilurinas por MEKC com detecção por fotometria de absorção molecular

O método desenvolvido teve como objetivo separar e determinar, por eletrocromatografia capilar micelar (MEKC), sete pesticidas da classe das estrobilurinas: azoxistrobina (Azo), picoxistrobina (Pico), piraclostrobina (Pira), fluoxastrobina, (Fluo), kresoxim-metil (Kreso), trifloxistrobina (Tri) e dimoxistrobina (Dimo). As estruturas dos analitos em questão apresentam poucos pontos para protonação/desprotonação tendendo a permanecerem neutros em solução aquosa, assim, a abordagem MEKC foi utilizada para promover a separação por migração diferencial no capilar. No trabalho realizado com duas estrobilurinas³⁶ (picoxistrobina e piraclostrobina) constatou-se que a separação no meio micelar só ocorreu na presença de modificador orgânico (acetonitrila - ACN) no eletrólito de trabalho. As informações obtidas no trabalho com a picoxistrobina e piraclostrobina serviram de baliza para o desenvolvimento do método para as sete estrobilurinas apresentado nesse capítulo.

5.1.

Ajuste da condição de separação das estrobilurinas: planejamento experimental

O desenvolvimento de métodos por MEKC com detecção por fotometria de absorção exige o ajuste de vários parâmetros experimentais e instrumentais de modo a se obter a separação, o formato e a intensidade adequados para os picos de diferentes analitos. Tal ajuste se torna muito mais crítico quando se tem um número elevado de analitos pertencentes à mesma classe, isto é, que apresentam similaridades estruturais e propriedades físicas e químicas muito próximas. Dos fatores ou variáveis mais críticos que afetam a qualidade do resultado analítico em termos do tempo de migração, resolução, altura, largura e áreas dos picos podem-se destacar: (i) composição, concentração e pH do eletrólito de trabalho; (ii) tipo e

concentração do surfactante usado para a fase pseudo-estacionária, (iii) tipo de concentração de solventes orgânicos usados como modificadores químicos; (iv) parâmetros relacionados ao capilar como o revestimento, o diâmetro interno e o comprimento; (v) parâmetros instrumentais, como a temperatura do sistema, a diferença de potencial aplicada e o tempo de injeção da amostra e (vi) a escolha do comprimento de onda para a detecção absorciométrica. Além desses, o procedimento de condicionamento e de limpeza do capilar é crítico no sucesso da separação e na obtenção de resultado repetitivos.

A fim de se conhecer o comportamento das variáveis que têm maior influência na separação das sete estrobilurinas envolvidas nesse trabalho, foi feito um estudo univariado para alguns dos parâmetros experimentais. O tempo total de análise, representado pelo tempo de migração do último pico, e a resolução entre os picos foram as respostas avaliadas na escolha das condições experimentais. A detecção foi realizada em 210 nm que foi o comprimento de onda de compromisso. O espectro de absorção das sete estrobilurinas é indicado na Figura 37. A princípio, os eletroferogramas foram obtidos em diferentes comprimentos de onda no detector de arranjo de fotodiodos, porém em 210 nm todos apresentam a maior absorvância. Até próximo a 250 nm todos os analitos absorvem luz UV, sendo que alguns apresentam um máximo bem definido de absorção em torno desse comprimento de onda. No caso da Pira, um máximo de absorção aparece próximo a 270 nm. Importante salientar que o espectro do branco não apresenta absorvância relevante em 210 nm.

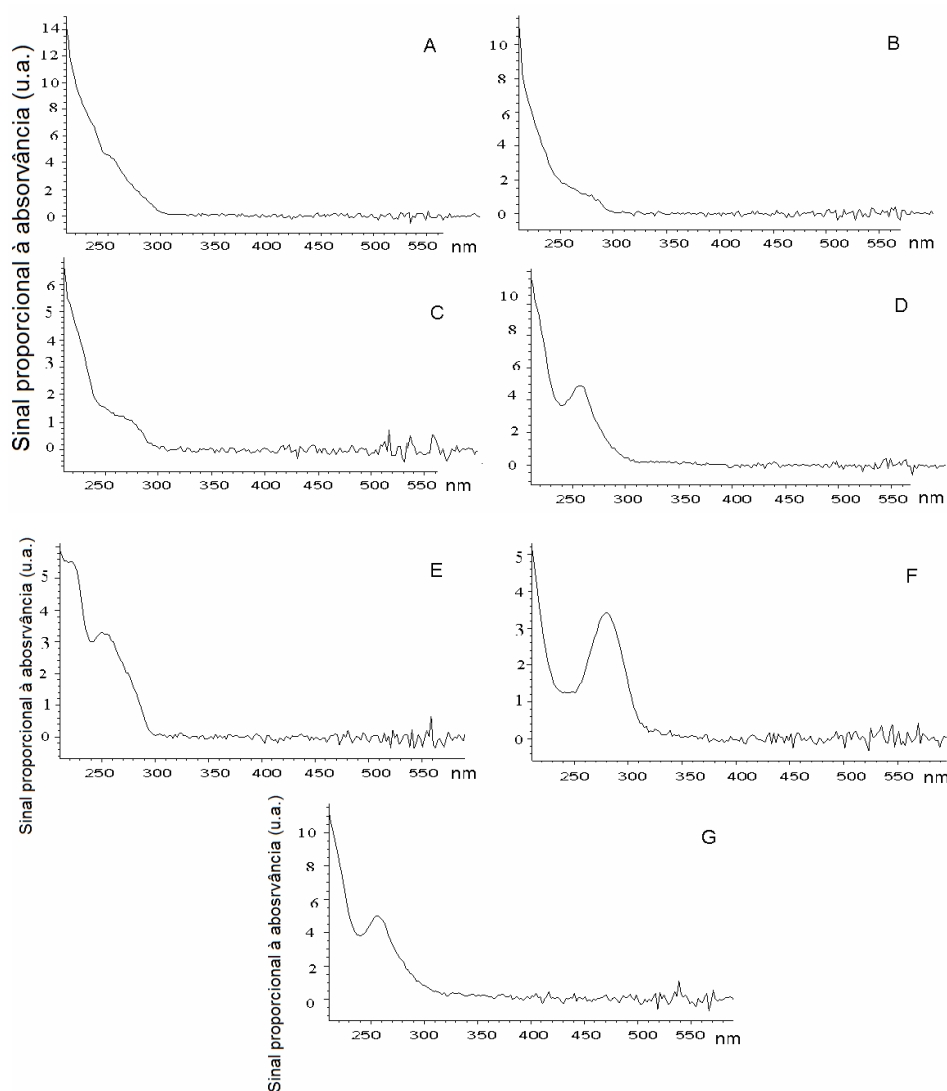


Figura 37: Espectros de absorção dos pesticidas (A) Azo, (B) Dimo, (C) Kreso, (D) Fluo, (E) Pico, (F) Pira e (G) Tri, obtidos no eletrólito de corrida.

Tomando como base a condição experimental estabelecida no trabalho realizado na separação da picoxistrobina e da piraclostrobina (Tabela 10), um ajuste de condições mais críticas (quantidade do modificador químico e a concentração do tampão) foi realizado com as sete estrobilurinas. Os eletroferogramas da Figura 38 apresentam o efeito produzido pela variação do percentual de acetonitrila (ACN) entre 15 e 20%. Porcentagens menores de ACN não foram avaliadas nesse momento porque os resultados reportados no desenvolvimento do método para Pico e Pira indicaram que somente com o valor de 15% de ACN foi possível realizar a injeção de um volume maior de amostra (75s) sem comprometer a resolução entre os picos desses dois analitos.

Com o aumento da porcentagem de ACN no eletrólito de trabalho a resolução entre todos os pares de picos foi menor. Maiores proporções de ACN também provocaram uma leve diminuição no tempo de migração dos analitos. Na presença de 15% de ACN, a altura do último pico (7) foi menor (ver Figura 38). Alguns dos outros analitos (1, 5 e 6) também apresentaram um perfil de pico com maior altura e redução das larguras dos picos (ganho de eficiência) com o aumento da porcentagem de ACN no eletrólito. Assim, como situação de compromisso entre perfil e separação dos picos, foi escolhida a porcentagem de 17% de ACN para a realização do próximo teste.

Tabela 10: Condições iniciais utilizadas no desenvolvimento do método.

| Parâmetros | Condições |
|--|--|
| Tampão | borato 80 mmol L ⁻¹ |
| Surfactante | SDS, 30 mmol L ⁻¹ |
| pH | 8,60 |
| Capilar | 60 cm comprimento total e 75 µm d.i |
| Temperatura | 25 °C |
| Diferença de potencial | + 25 kV |
| Tempo e pressão de introdução solução | 15 s, 50 mbar |

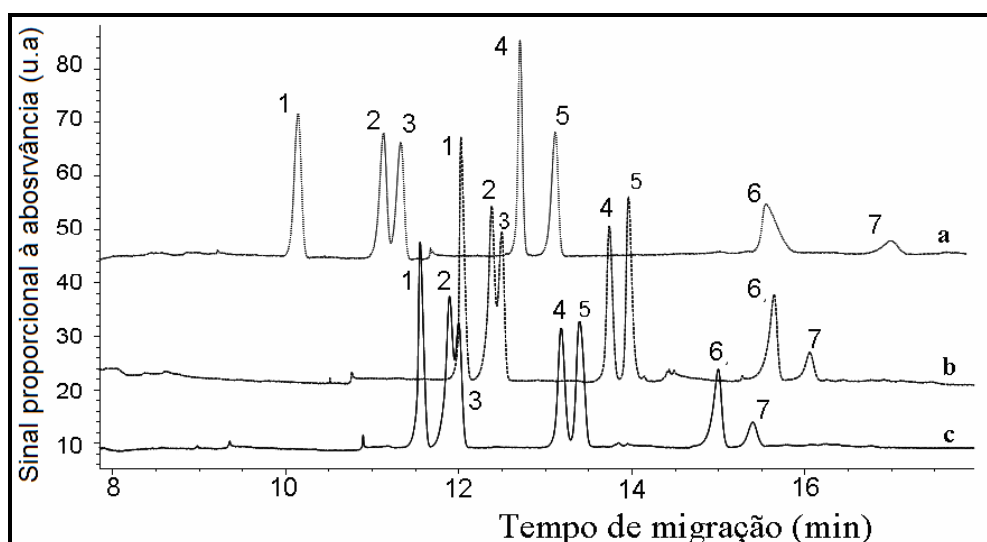


Figura 38: Eletroferogramas de um estudo univariado da variação da porcentagem de ACN no eletrólito de trabalho (a) 15%, (b) 17% e (c) 20%. Solução padrão contendo as sete estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Demais condições Tabela 10. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

O efeito da variação da concentração do tampão borato também foi avaliado e o resultado é mostrado na Figura 39: Observou-se que houve uma pequena alteração na separação dos picos 4 (Fluo) e 5 (Pico) em função do aumento da concentração do tampão de 40 para 120 mmol L^{-1} , sendo essa separação afetada nas concentrações de 100 e 120 mmol L^{-1} . Entre as concentrações de 40 e 80 mmol L^{-1} de tampão, observou-se uma boa robustez nos resultados em relação a resolução dos picos. Com relação aos tempos de migração, ocorreu um aumento (de até 2 min) na medida em que se aumentou a concentração do tampão borato no eletrólito de trabalho. Baseado nesse resultado, a concentração de 40 mmol L^{-1} de borato foi escolhida para continuidade ao trabalho por este propiciar o menor tempo de análise, melhor separação entre os picos 4 e 5 além de se minimizar, pela presença de menor quantidade de eletrólito no meio de separação, a possibilidade do aquecimento demasiado do capilar durante as análises. Em todos os casos testados, não se obteve a separação adequada entre os picos 2 e 3.

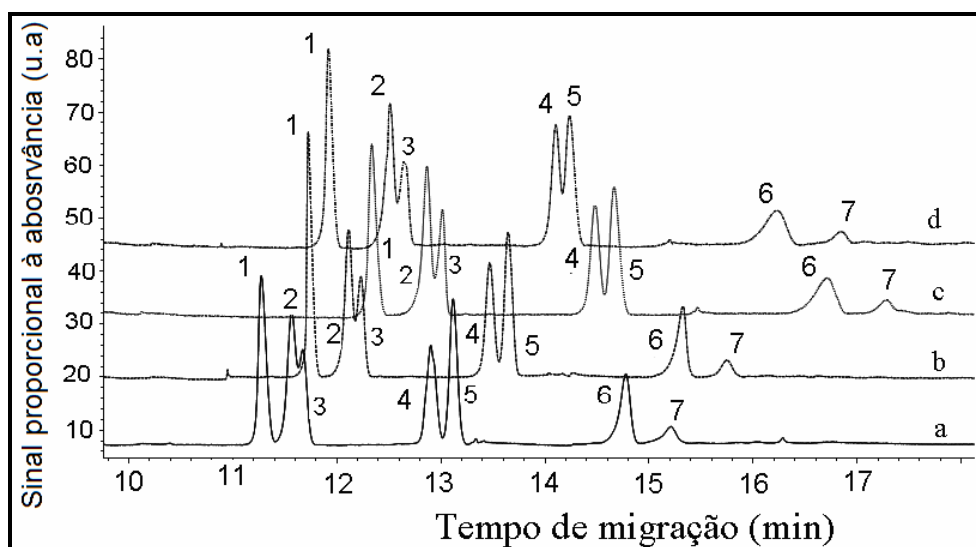


Figura 39: Eletroferogramas variando a concentração de borato no eletrólito (a) 40, (b) 80, (c) 100 e (d) 120 mmol L^{-1} . Eletrólito com SDS em 30 mmol L^{-1} , pH 8,60 e 17% ACN. Demais condições Tabela 10. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

Após a primeira avaliação de condições usando os estudos univariados, um estudo multivariado foi aplicado para o estabelecimento da condição final de separação. Por causa do número de variáveis envolvidas, o estudo dos efeitos das variáveis pela abordagem univariada torna-se demasiadamente tediosa para a busca de condições ideais para a separação. Em contrapartida, o planejamento experimental permite testar simultaneamente numerosos fatores ou variáveis permitindo detectar possíveis interações entre essas variáveis, evitando o uso de um grande número de experimentos independentes comum na abordagem tradicional. Adicionalmente, o estudo multivariado permite explorar as sinergias ou antagonismos entre variáveis, fato que pode possibilitar o ajuste crítico que define uma condição ótima para a separação das espécies. Assim sendo, o planejamento experimental, a análise dos eletroferogramas, a análise dos gráficos de Pareto e avaliação da função “desejabilidade” foram usados no ajuste da composição do eletrólito de trabalho, a fim de se obter uma boa resolução entre os picos dos sete analitos de interesse com os menores tempos de migração possíveis.

Na primeira etapa, um planejamento fatorial composto central (CCD) do tipo 2^3 foi usado, permitindo avaliação de três fatores em dois níveis (que se desdobram em cinco níveis). Esse planejamento permite obter a combinação de

resultados (no caso, as resoluções entre picos) que apontam para as melhores condições para a análise. Dos parâmetros avaliados nos estudos univariados, verificou-se que uma pequena variação na concentração de ACN causava um grande efeito na resolução dos picos no eletroferograma e nos tempos de migração. Portanto, a quantidade de ACN foi novamente incluída no planejamento para encontrar as condições finais de separação. As outras duas variáveis escolhidas nessa etapa foram a concentração do surfactante (SDS) e o valor do pH do eletrólito de trabalho. A resposta investigada foi a resolução entre os pares de picos, que foi calculada pela Equação 49, onde é utilizado o critério da largura do pico a meia altura. O tempo total de análise (indicado pelo tempo de migração do último analito) também foi avaliado. Na Tabela 11 são indicadas as variáveis e os níveis (codificado e real) utilizados para o planejamento CDD.

$$R = 1,176 \left\{ \frac{(t_1 - t_2)}{w_{1(1/2)} + w_{2(1/2)}} \right\} \quad \text{Equação 49}$$

Tabela 11: Fatores e níveis aplicados no planejamento CCD 2³.

| Parâmetros | Níveis | | | | |
|-----------------------------|--------|-----|-----|-----|--------|
| | +1,682 | +1 | 0 | -1 | -1,682 |
| ACN (%) | 23,0 | 21 | 18 | 15 | 13,0 |
| pH | 9,84 | 9,5 | 9,0 | 8,5 | 8,16 |
| SDS (mmol L ⁻¹) | 48,4 | 45 | 40 | 35 | 31,6 |

A Tabela 12 apresenta a combinação das variáveis e a ordem aleatória sugerida pelo programa. Assumiu-se variância homogênea para o sistema sendo essa avaliada pelas repetições no ponto central do planejamento.

Tabela 12: Combinação aleatória do planejamento CCD 2³.

| Ordem Aleatória | Experimentos | pH | Concentração de SDS (mmol L ⁻¹) | ACN (%) |
|-----------------|--------------|------|---|---------|
| 11 | A | 9,00 | 40,0 | 13,0 |
| 14 | B | 9,84 | 40,0 | 18,0 |
| 16(C) | C | 9,00 | 40,0 | 18,0 |
| 12 | D | 9,00 | 40,0 | 23,0 |
| 10 | E | 9,00 | 48,4 | 18,0 |
| 3 | F | 8,50 | 35,0 | 21,0 |
| 7 | G | 8,50 | 45,0 | 21,0 |
| 1 | H | 8,50 | 35,0 | 15,0 |
| 6 | I | 9,50 | 45,0 | 15,0 |
| 2 | J | 9,50 | 35,0 | 15,0 |
| 5 | L | 8,5 | 45,0 | 15,0 |
| 15 (C) | M | 9,00 | 40,0 | 18,0 |
| 9 | N | 9,00 | 31,6 | 18,0 |
| 4 | O | 9,50 | 35,0 | 21,0 |
| 17 (C) | P | 9,00 | 40,0 | 18,0 |
| 8 | Q | 9,50 | 45,0 | 21,0 |
| 13 | R | 8,16 | 40,0 | 18,0 |

Na Figura 40 os resultados são apresentados em função da magnitude da resolução entre os pares de picos das estrobilurinas que aparecem nos eletroferogramas. Os picos, independentemente das condições experimentais, apareceram na seguinte ordem: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). As resoluções entre os pares de picos foram identificadas como Res. 1 e 2, Res. 2 e 3, Res. 3 e 4, Res. 4 e 5, Res. 5 e 6 e Res. 6 e 7. Um valor de resolução entre 2,0 e 2,5 foi considerado como valor ideal.

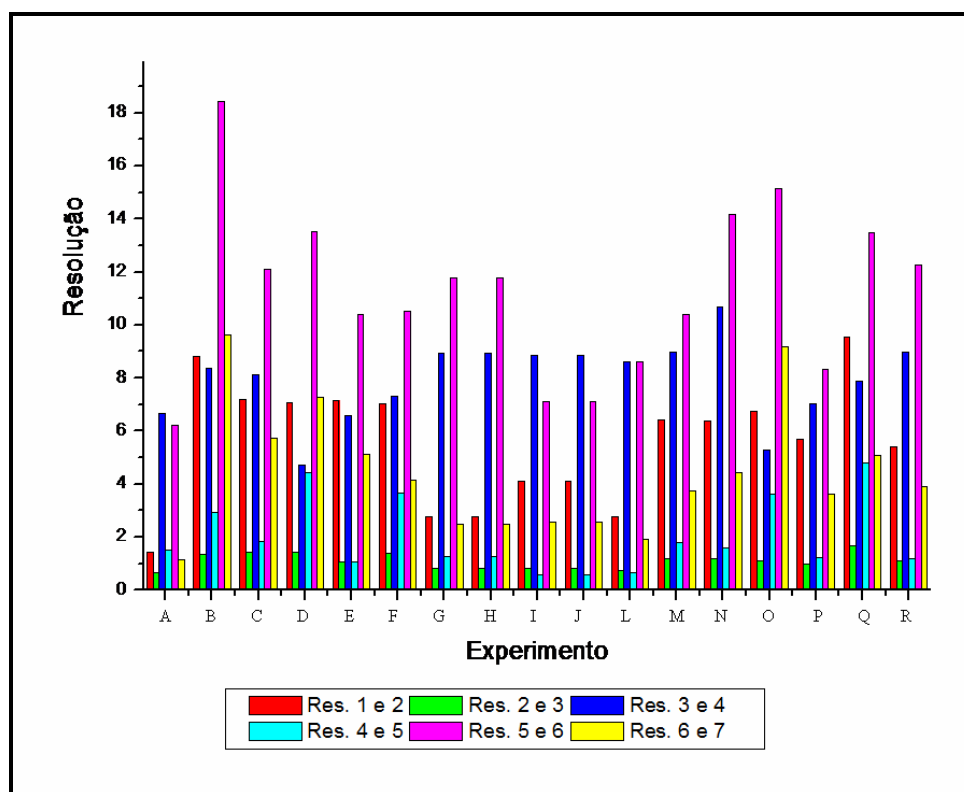


Figura 40: Resposta das resoluções entre os pares de picos após planejamento CCD 2³. Pesticidas identificados com números de 1 a 7. Experimentos realizados seguindo a ordem aleatória e condições da Tabela 12. Demais condições Tabela 10. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

Pela avaliação da resolução entre os pares de picos (Figura 40) é possível perceber que a separação dos analitos 1 e 2 não é favorecida apenas na condição do experimento A (resolução igual a 1,44). Percebe-se que pequenas variações na porcentagem de ACN têm forte influência na separação como indicado nos experimentos A, C e D. Com o aumento da quantidade de ACN na composição do eletrólito de trabalho, a resolução entre todos os pares de picos foi maior que 2,0, com exceção da resolução entre os analitos 2 e 3 que passou de 0,65 (experimento A) para 1,42 (experimento C e D). Os experimentos O (35 mmol L⁻¹ de SDS) e Q (45 mmol L⁻¹) indicam que um aumento na concentração de SDS é favorável à separação entre o par de picos 2 e 3, pois o valor da resolução passou de 1,09 para 1,68. Analisando as resoluções entre os pares de picos, pode-se perceber que a separação entre os analitos identificados como 2 e 3 é a mais crítica e a resolução entre os analitos 4 e 5 é a que apresentou maiores variações, ficando entre 0,58

(experimento I) a 4,79 (experimento Q). A maior resolução entre o par de picos 2 e 3 foi de 1,68 nas condições dos experimentos Q e G.

Em termos do efeito das condições no tempo de migração total (dado pelo tempo de migração do pico que migra com menor velocidade) indicado na Figura 40, maior tempo foi observado quando a condição do experimento B foi aplicada (acima de 28 min). O tempo de migração foi maior com o aumento do pH de 9,0 para 9,84 (experimento B e C, respectivamente) e voltou a aumentar com o pH igual 8,16 (experimento R). Assim um pH igual a 9,0 foi considerado como ideal por apresentar menor tempo de migração e ter pouco influencia na resolução dos picos. O aumento da concentração de SDS no eletrólito (experimento F e G) também aumentou o tempo de migração dos analitos.

Considerando os experimentos desse planejamento a condição do experimento D e também dos experimentos G e Q poderiam ser escolhidas para o método, porém a resolução entre os analitos identificados como 2 e 3 foi igual a 1,42 (em G) e 1,68 (em Q), respectivamente. O valor de 1,68 é satisfatório, porém nessas condições G e Q, o pico referente ao analito 7 teve menor eficiência, menor altura e maior largura de pico quando comparado ao experimento D. Esses resultados não foram considerados satisfatórios. Os valores para a resolução entre os analitos 4 e 5 nos experimentos D, G e Q foram satisfatórios e iguais a 4,44, 2,59 e 4,79, respectivamente. Nessas condições o tempo de migração do último analito foi maior na condição do experimento Q (22,5 min).

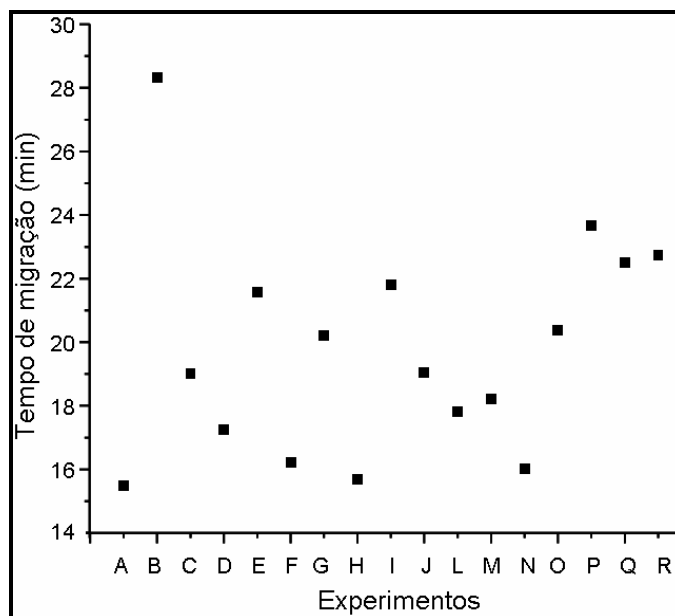


Figura 41: Resultado para o tempo de migração total para cada experimento do planejamento CCD 2^3 . Experimentos realizados seguindo a Tabela 12.

Na Figura 42 são apresentados os gráficos de Pareto que indicam a significância de cada variável na resposta da resolução entre os analitos, identificados como 2, 3, 4 e 5. Os gráficos mostram cada um dos efeitos calculados em ordem decrescente de magnitude. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado (razão entre o efeito e o desvio padrão). A linha vertical (pontilhada) pode ser usada para julgar quais efeitos são estatisticamente significativos. A barra que ultrapassa a linha corresponde a um efeito significativo ao nível de 95%.

Da Figura 42 A (resolução entre os analitos 2 e 3, mais crítica) e da Figura 42 B (resolução entre os analitos 4 e 5, também crítico), verifica-se que os efeitos principais (de dimensão linear e quadrática) do fator solvente orgânico (ACN) foram significativos (95% de confiança). Não foram evidenciadas, nos resultados obtidos pelos gráficos de Pareto, quaisquer interações relevantes entre os fatores para as duas resoluções. Os valores positivos dos efeitos indicam que um aumento da magnitude das variáveis implicaria no aumento da resolução (para a faixa experimental compreendida nos níveis do planejamento). No entanto, experimentalmente, um aumento da porcentagem de solvente orgânico no eletrólito de trabalho pode prejudicar a formação das micelas de SDS e alterar

totalmente o mecanismo de separação, assim o fator concentração de SDS no meio também precisa ser considerado.

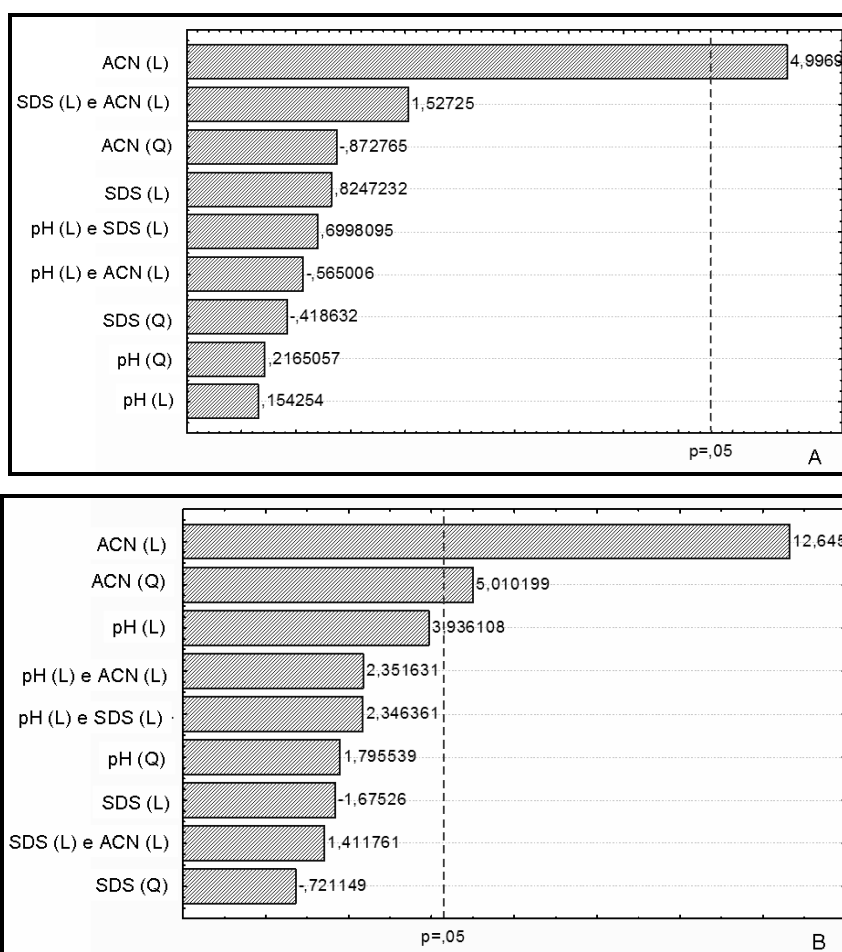


Figura 42: Gráfico de Pareto indicando os efeitos estatisticamente significativos para a resolução entre os pares de picos 2 e 3 (gráfico A) e entre 4 e 5 (gráfico B). Resultado obtido pelo planejamento CCD 2^3 . (L) dimensão linear e (Q) quadrática do efeito.

Um segundo planejamento experimental CCD 2^2 foi utilizado na tentativa de aperfeiçoar as condições de análise para obter uma melhor separação entre os analitos 2 e 3, sem comprometer a resolução entre os demais analitos. Outra propriedade que foi monitorada nessa tentativa de ajuste foi a eficiência do último pico (TRI). Nesse novo planejamento, as variáveis consideradas foram a concentração de SDS e a porcentagem de ACN em níveis que cobriram faixas de valores que não foram avaliadas no planejamento anterior. O pH foi mantido constante em 9,0 (devido ao resultado do tempo de migração dos analitos no

planejamento anterior) e concentração do tampão borato igual a 40 mmol L⁻¹. Os níveis das variáveis para o planejamento CCD 2² estão apresentados na Tabela 13. As combinações para as variáveis e a ordem aleatória na qual os experimentos foram avaliadas e estão na Tabela 14.

Tabela 13: Parâmetros e níveis considerados no planejamento CCD 2².

| Parâmetros | Níveis | | | | |
|-----------------------------|----------|----|----|----|---------|
| | + 1,4142 | +1 | 0 | -1 | -1,4142 |
| ACN (%) | 28,2 | 27 | 24 | 21 | 19,8 |
| SDS (mmol L ⁻¹) | 64 | 60 | 50 | 40 | 36 |

Tabela 14: Combinações para o planejamento CCD 2².

| Ordem Aleatória (ordem de análise) | Experimentos | Concentração de SDS (mmol L ⁻¹) | ACN (%) |
|---------------------------------------|--------------|--|------------|
| 9 (C) | A | 50,0 | 24,0 |
| 7 | B | 50,0 | 19,8 |
| 5 | C | 35,9 | 24,0 |
| 6 | D | 64,1 | 24,0 |
| 2 | E | 40,0 | 27,0 |
| 8 | F | 50,0 | 28,2 |
| 11 (C) | G | 50,0 | 24,0 |
| 3 | H | 60,0 | 21,0 |
| 4 | I | 60,0 | 27,0 |
| 10 (C) | J | 50,0 | 24,0 |
| 1 | L | 40,0 | 21,0 |

Na Figura 43 é apresentado o resultado obtido para a resolução entre os pares de picos dos analitos que foram identificados de 1 a 7, em ordem crescente de tempo de migração. O tempo de migração do último pico também foi avaliado e está representado na Figura 44.

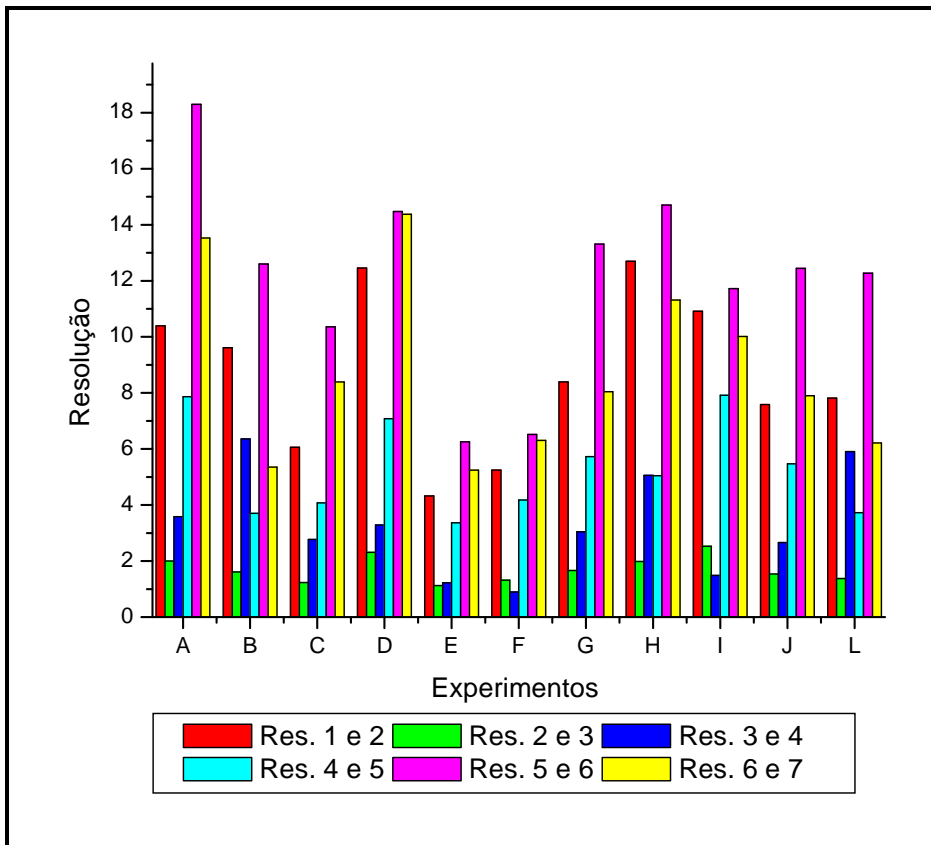


Figura 43: Resultado da resolução obtida após planejamento CCD 2^2 . Pesticidas identificados com números de 1 a 7. Experimentos realizados seguindo a ordem aleatória estabelecida na Tabela 14. Azo (1), Dimo (2), Kreo (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

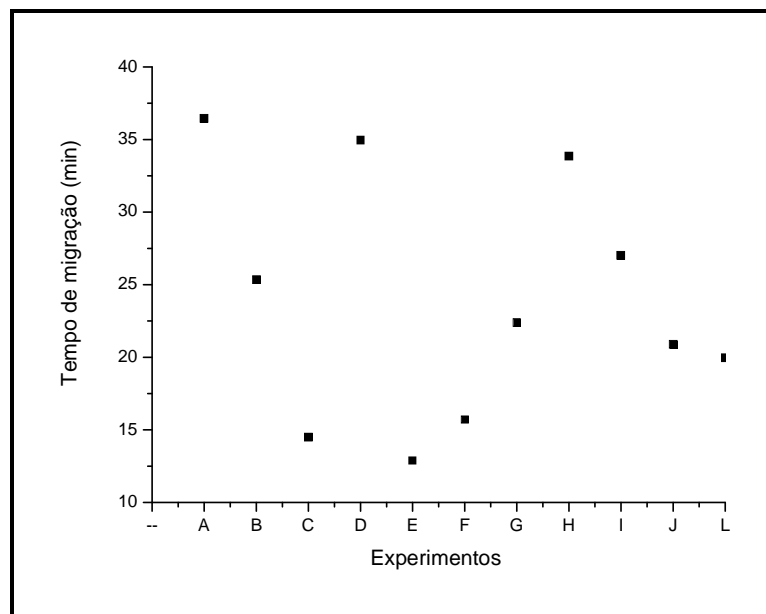


Figura 44: Resultado para o tempo de migração do último pico em cada experimento após planejamento CCD 2^2 . Experimentos realizados seguindo a Tabela 14.

Ao analisar os resultados obtidos para a resolução entre os pares de picos após o planejamento CCD 2² (Figura 43) foi observado que a resolução entre os analitos 4 e 5 foi maior que 2,0 em todas as situações. Para os analitos 2 e 3 a resolução foi próxima ou maior que o valor de 2,0 nas condições dos experimentos A, D, H e I.

Nos experimentos E e L e nos experimentos F e J observa-se que o aumento da quantidade do modificador orgânico no eletrólito de trabalho causa a redução do tempo de migração do último pico (Figura 44), porém ocorre alterações nos tempos de migração dos analitos 2, 3, 4 e 5 afetando a resolução entre os pares de picos. Com as condições D e H as resoluções entre os picos 2, 3, 4 e 5 foram satisfatórias, porém o tempo total de análise foi maior de 30 min.

Na Figura 45 são apresentados os gráficos de Pareto que indicam o grau de significância de cada uma das variáveis na resolução entre os analitos identificados como 2, 3 e 4. A resolução entre 4 e 5 não foi considerada mais crítica na faixa estudada para as variáveis.

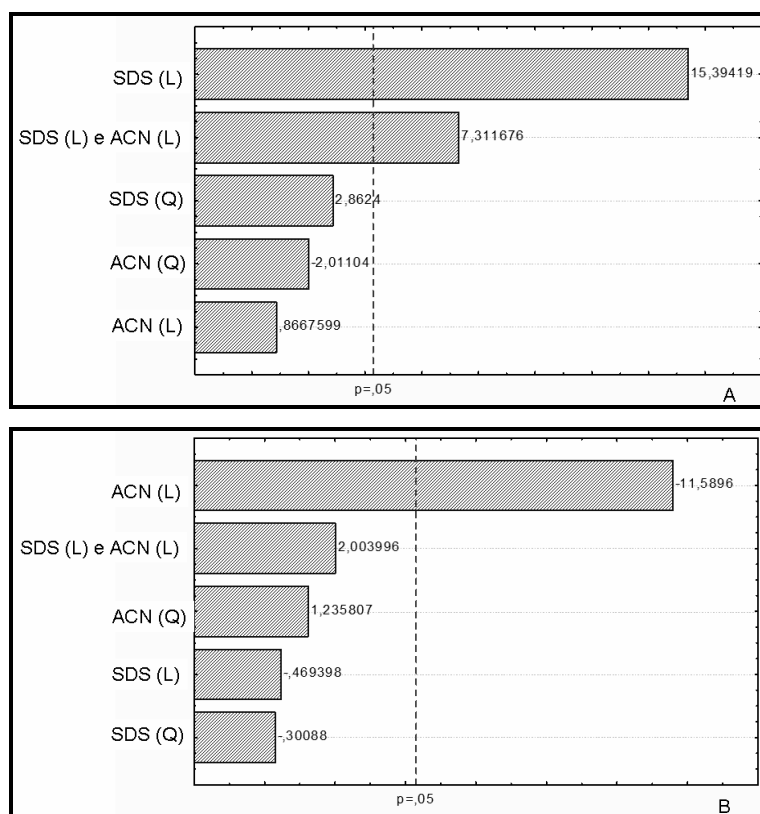


Figura 45: Gráfico de Pareto indicando os efeitos estatisticamente significativos para o planejamento CCD 2² mostrando a importância dos fatores para a resolução entre os pares de picos 2 e 3 (A) e entre 3 e 4 (B). (L) dimensão linear e (Q) quadrática do efeito.

Na resolução entre os analitos 2 e 3 (Figura 45 A) o efeito da concentração de surfactante (contribuição linear) foi significativo (95% de confiança) assim como a interação entre os dois fatores SDS e ACN. Assim, uma condição que propicie uma resolução adequada entre esses analitos precisa ser determinada considerando simultaneamente os dois fatores. Na resolução entre os analitos 3 e 4, apenas a quantidade de ACN (contribuição linear) foi significativa (95% de confiança).

O ajuste do modelo obtido com o planejamento pode ser avaliado pelos gráficos de resíduos (Figura 46 A e B) e pelos gráficos dos valores observados e previstos (Figura 47 A e B). No gráfico de resíduos pode-se perceber a distribuição aleatória dos resultados para ambas as resoluções (entre 2 e 3 e entre 3 e 4), o que indica um ajuste satisfatório. Através dos gráficos dos valores observados versus os previstos pelo modelo, uma relação linear foi obtida, podendo ser considerada ideal, o que confirma o ajuste.

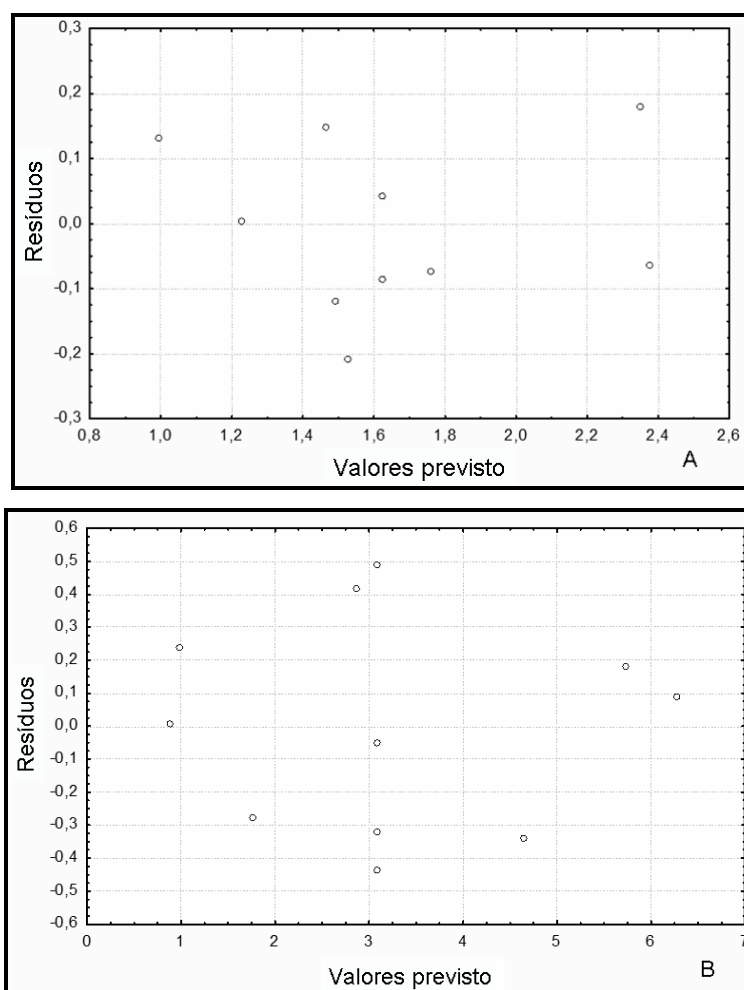


Figura 46: Gráfico dos resíduos para a resolução entre 2 e 3 (A) e para a resolução entre 3 e 4 (B).

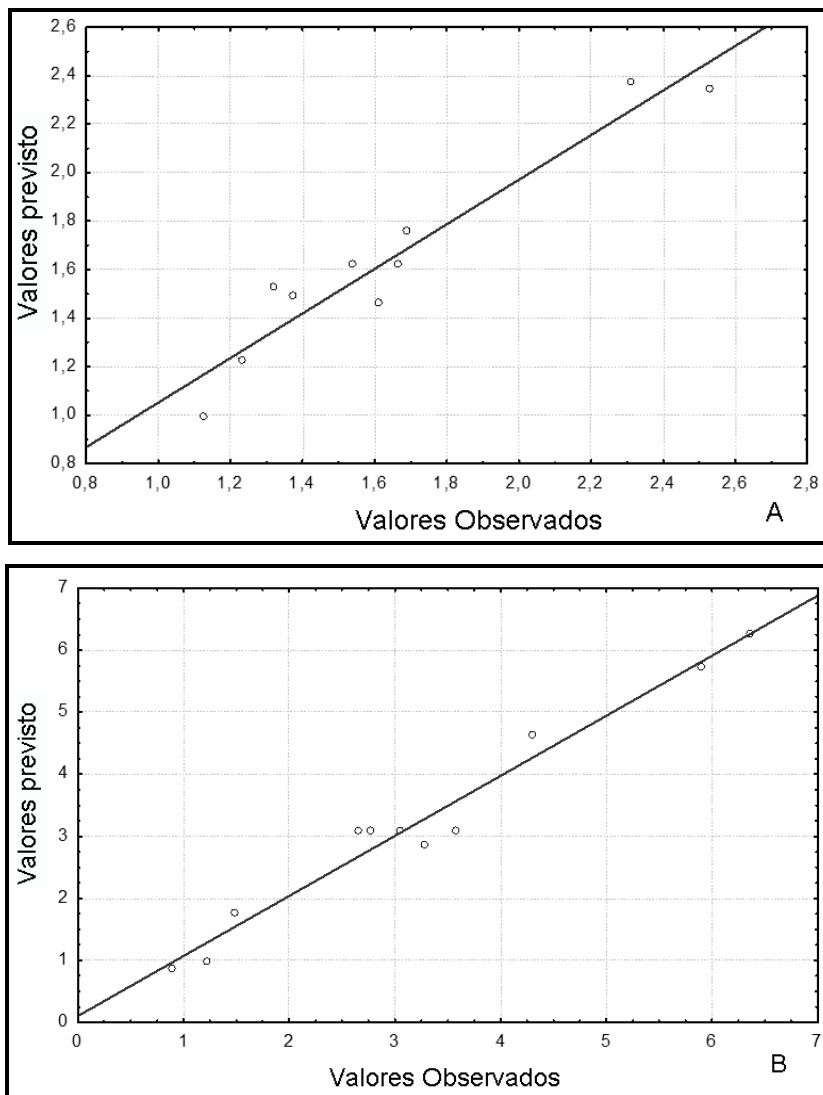


Figura 47: Gráficos dos valores observados versus preditos para os resultados das resoluções entre os analitos 2 e 3 (A) e entre 3 e 4 (B).

Os resultados mostram que diferentes condições são necessárias para obter a melhor resolução entre os analitos 2 e 3 e entre 3 e 4. Assim, para se determinar uma condição que mantenha uma resolução aceitável (de compromisso) entre 2 e 3 e entre 3 e 4, a função “desejabilidade” foi utilizada. Quando se precisa da condição ótima para uma combinação de respostas (resolução entre 2 e 3 e entre 3 e 4) pode-se fazer uma sobreposição de cada uma das superfícies de resposta gerada para cada condição. Este é um método de programação não-linear e, no caso do programa Statistica, que usa a abordagem de Derringer e Suich (1980), a ferramenta é a função “desejabilidade”. Neste tratamento as respostas (Y_i) são convertidas em outra função individual d_i que varia em uma faixa de $0 \leq d_i \leq 1$. Se

a resposta for aquela que se quer, $d_i = 1$ e se a resposta estiver fora da região aceitável, $d_i = 0$. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a “desejabilidade” global.

A função “desirability” é apresentada na Figura 48 aponta como desejável um valor de resolução próximo a 2,5 e indesejável o valor 1,0. Importante a ser observado é o comportamento das resoluções em função dos fatores estudados. A concentração do surfactante não exerce influência alguma na resolução do par de picos 3 e 4 e apenas a redução de ACN no eletrólito causa o aumento da resolução entre esses analitos. O efeito da concentração de SDS na resolução entre 3 e 4 é constante (Figura 48B) indicando que, para esse par de picos esse efeito não é importante (resultado que confirma a indicação do gráfico de pareto - Figura 45 B). A Figura 48 E mostra um efeito linear contrario do aumento da porcentagem de ACN na resolução entre 3 e 4, o que foi indicado pelo gráfico de pareto (Figura 48 B), representado pelo sinal negativo do efeito linear da ACN, ou seja, para que a resolução entre 3 e 4 aumente é necessário reduzir a porcentagem de ACN no eletrólito.

A resolução entre o par de picos 2 e 3 tende a aumentar com o aumento de ambos os fatores (SDS e ACN). Pelo gráfico de Pareto (Figura 45 A), um aumento na resolução entre 2 e 3 seria obtido pela interação linear entre esses dois fatores com aumento das concentrações (sinal positivo do efeito). O comportamento linear da concentração do SDS na resolução entre 2 e 3 é visível na Figura 48 A, que indica que a resolução aumenta com o aumento da concentração do surfactante (também indicado na Figura 45A). Um aumento na porcentagem de ACN contriu com menor intensidade (curva menos inclinada - Figura 48 D) na resolução entre 2 e 3, mas também tem influência linear na resolução desses analitos. A interação entre concentração de SDS e porcentagem de ACN é mais favorável à resolução entre 2 e 3.

Dessa forma, os valores dos pontos ótimos das duas variáveis para as resoluções foram 64 mmol L^{-1} de SDS e 25% de ACN (indicado pela linha vertical pontilhada na Figura 48 C e F, sendo o valor global da função “desejabilidade” igual a 0,969. Como pode ser observado na Figura 49, uma boa separação foi alcançada dentro de um tempo total de análise de aproximadamente 30 min, no eletrólito de trabalho com tampão borato (40 mmol L^{-1} , pH 9,0) e as outras

condições indicadas na Tabela 10. Os picos foram identificados e a ordem de migração foi mantida após análise individual dos analitos sendo a ordem de migração: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

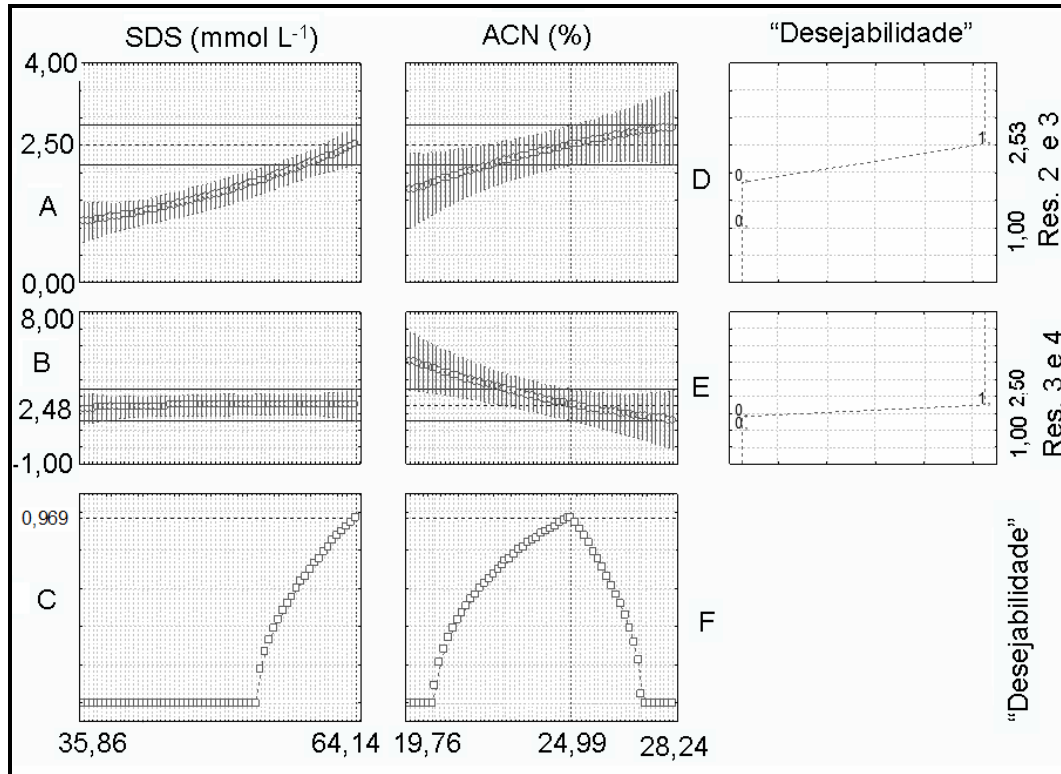


Figura 48: Gráfico da função “desejabilidade” para o planejamento CCD 2².

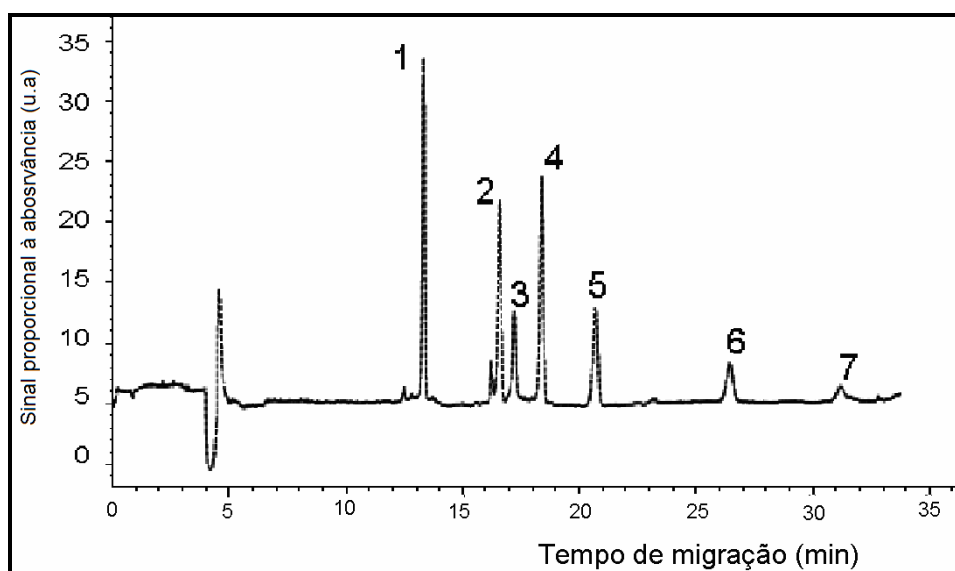


Figura 49: Eletroferogramas com as condições indicadas pelo planejamento CCD 2² após uso da função desejabilidade. Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). Eletrólito: tampão borato 40 mmol L⁻¹, pH 9,0, 64 mmol L⁻¹ de SDS, 25% de ACN. Demais condições Tabela 10.

A condição de análise obtida foi considerada, a princípio, como ideal, porém, após teste de repetibilidade e de precisão intermediária percebeu-se grandes variações no tempo de migração em análises feitas no mesmo dia (acima de 10%) e em dias diferentes (acima de 15%) e no formato dos picos ao longo das análises realizadas. Essas variações podem ser explicadas pelo aquecimento do capilar ao longo das corridas, altos valores de corrente, em torno de 110 μ A foram observados. Além disso, era necessário a troca dos vials contendo os eletrólitos a cada cinco corridas, devido a alterações nos eletroferogramas. Tal frequência de troca é inaceitável quando se busca um procedimento de análise de rotina. Com os dois planejamentos realizados para obter uma melhor resolução entre os analitos 2 (Dimo) e 3 (Kreso), sem comprometer as resoluções entre os demais analitos, os resultados indicaram o uso de alta concentração de SDS e valor elevado de ACN, resultando em levado tempo de análise. Adicionalmente, o uso dessas condições causava o entupimento do capilar e a necessidade de limpeza rotineira, mesmo estabelecendo-se um programa de limpeza a cada cinco corridas usando (i) água ultrapura por 30 min e (ii) água ultrapurificada:ACN 50:50% v/v. Nessas condições estabelecidas para separação, as análises ficaram inviabilizadas.

Por causa desses resultados inconsistentes, um novo estudo foi realizado usando outra abordagem de planejamento experimental. Para tal, primeiramente, o diâmetro capilar foi reduzido para 50 μm d.i. e 60 cm de comprimento total, já que a resolução pode ser maior se reduzido o diâmetro do capilar. O preparo do eletrólito também foi alterado, utilizando tetraborato de sódio, que tem maior capacidade de tamponamento, comparado com o ácido bórico utilizado nos testes anteriores, e por isso pode ser utilizado em menores concentrações. O planejamento aplicado também foi alterado, optando-se pelo planejamento Box-Behnken (BBD). Este planejamento ajuda na investigação de efeitos lineares, quadráticos e interações de três fatores, cada um em três níveis (3^3). Os três fatores escolhidos foram concentração do surfactante (SDS), concentração do tampão e porcentagem de solvente orgânico (ACN). Os três níveis, o alto, o médio e o baixo, foram designados como +1, 0, -1, respectivamente. Os níveis das variáveis estão apresentados na Tabela 15. Os valores das variáveis SDS e ACN foram propostos baseado nos resultados obtidos nos planejamentos anteriores, ao contrário da concentração do tampão tetraborato que cobriu em valores de concentração reduzidos devido à maior capacidade de tamponante da solução. Como feito anteriormente, o tempo de migração (t), e a resolução (R), foram considerados para a avaliação dos resultados desse planejamento.

Tabela 15: Níveis das variáveis aplicadas no planejamento BBD 3^3 .

| Variáveis | Níveis | | |
|---|--------|----|----|
| | -1 | 0 | +1 |
| Concentração Surfactante (mmol L^{-1}) | 50 | 30 | 70 |
| Concentração tampão (mmol L^{-1}) | 3 | 5 | 7 |
| Acetonitrila (%) | 21 | 24 | 27 |

Após a seleção dos fatores e níveis, um conjunto de 15 combinações em ordem aleatória foi gerado para o planejamento experimental.

Tabela 16: Combinação do planejamento BBD 3³.

| Ordem Aleatória | Experimentos | Tampão (pH 9,0) (mmol L ⁻¹) | SDS (mmol L ⁻¹) | Solvente Orgânico (% ACN) |
|-----------------|--------------|--|--------------------------------|------------------------------|
| 2 | A | 7,0 | 30,0 | 24,0 |
| 11 | B | 5,0 | 30,0 | 27,0 |
| 6 | C | 7,0 | 50,0 | 21,0 |
| 14 | D | 5,0 | 50,0 | 24,0 |
| 1 | E | 3,0 | 30,0 | 24,0 |
| 12 | F | 5,0 | 70,0 | 27,0 |
| 9 | G | 5,0 | 30,0 | 21,0 |
| 15 | H | 5,0 | 50,0 | 24,0 |
| 3 | I | 3,0 | 70,0 | 24,0 |
| 8 | J | 7,0 | 50,0 | 27,0 |
| 7 | L | 3,0 | 50,0 | 27,0 |
| 4 | M | 7,0 | 70,0 | 24,0 |
| 13 | N | 5,0 | 50,0 | 24,0 |
| 10 | O | 5,0 | 70,0 | 21,0 |
| 5 | P | 3,0 | 50,0 | 21,0 |

Os resultados para as resoluções entre os analitos Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), que apresentaram maior dificuldade na separação, são apresentados na Figura 50.

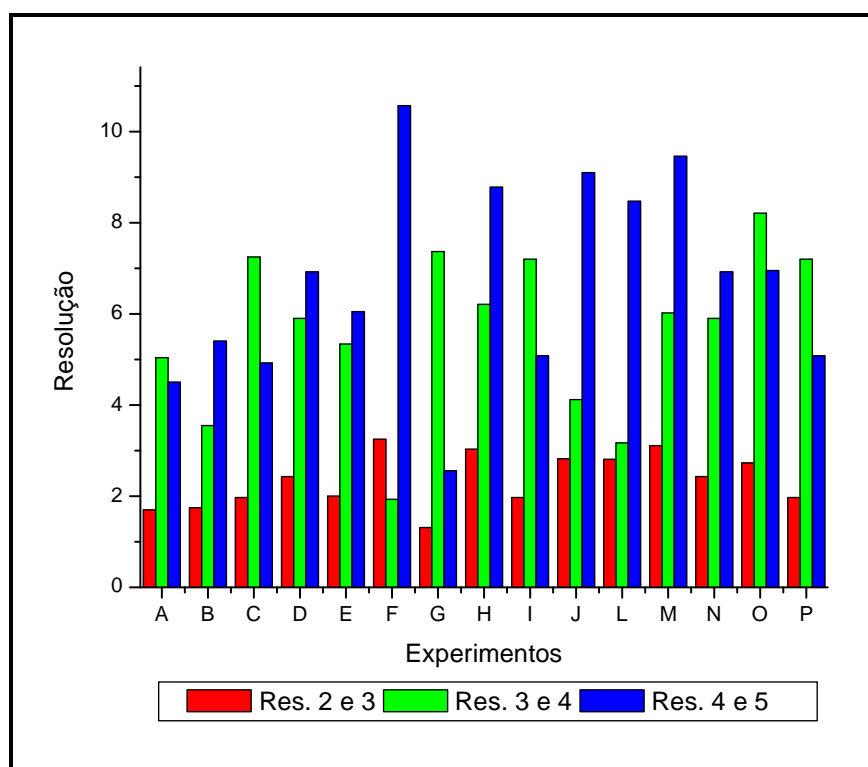


Figura 50: Resultado da resolução obtida após planejamento BBD 3^3 . Pesticidas identificados com números de 1 a 5. Experimentos realizados seguindo a ordem aleatória estabelecida na Tabela 16. Dima (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5).

Os resultados dos experimentos do planejamento BBD 3^3 para as resoluções mostraram que as condições utilizadas foram favoráveis para a separação dos pares de picos dos analitos 2 e 3, 3 e 4, 4 e 5, com valores de resolução acima ou muito próximo ao valor esperado (entre 2,0 e 2,5). A resolução entre os picos 3 e 4 foi menor que 2,0 apenas na condição do experimento F (1,93) e a menor resolução obtida para os analitos 4 e 5 foi com a condição do experimento G (2,56). Para o par de picos 2 e 3 a resolução variou entre 1,31 (experimento G) a 3,25 (experimento F), ver Figura 50.

O tempo de migração, obtido nas condições do planejamento BBD 3^3 para o analito Tri (7) está apresentado na Figura 51. O tempo de migração do último pico variou entre 9,7 a 30,3 min nas condições do experimento E e O, respectivamente. As resoluções entre os pares de picos no experimento E, que apresentou menor tempo de análise, foi igual a 2,0, 5,34 e 6,05 para os pares 2 e 3, 3 e 4 e 4 e 5, respectivamente, podendo ser considerado o melhor resultado devido ao tempo de análise. Os maiores tempos de migração foram observados quando a concentração

de SDS foi de $70,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Apesar do bom resultado encontrado no experimento E, os gráficos de Pareto e a função “desejabilidade” foram considerados para a escolha da condição final. Importante salientar que a resolução entre os analitos Dimo (2) e Kreso (3) precisa ser maior que 2,0 para que o objetivo de obter maior sensibilidade possa ser aplicado (preconcentração no capilar).

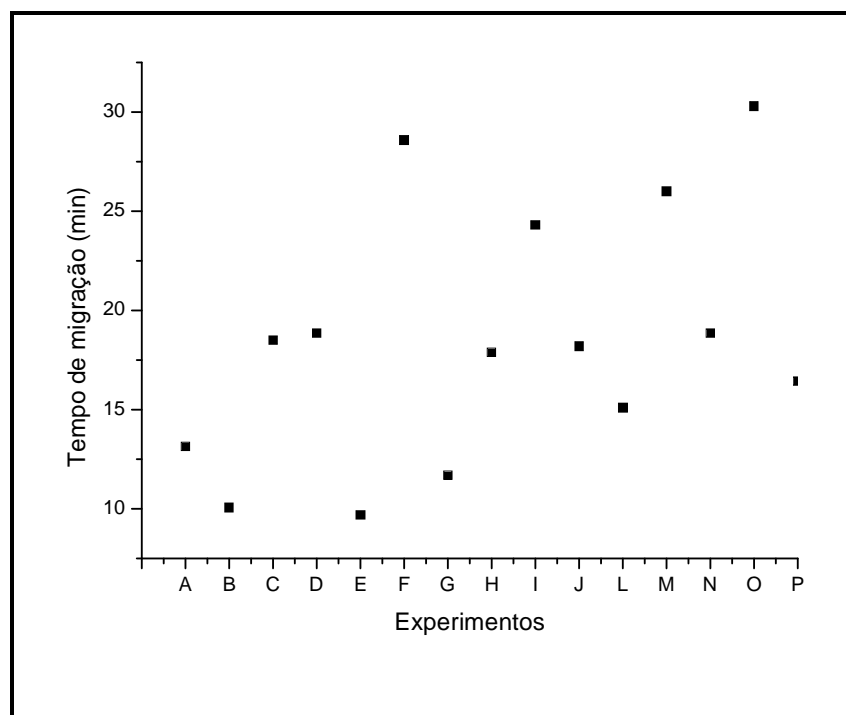


Figura 51: Resultado para o tempo de migração do último pico (Tri) em cada experimento após planejamento BBD 3^3 . Experimentos realizados seguindo a Tabela 16.

Na Figura 51 são apresentados os gráficos de Pareto para as resoluções entre os analitos Dimo (2) e Kreso (3) (Figura 52 A) e os analitos Kreso (3) e Fluo (4) (Figura 52 B). Esses analitos têm tempos de migração próximos e por isso a resolução entre eles é mais crítica e precisa ser otimizada.

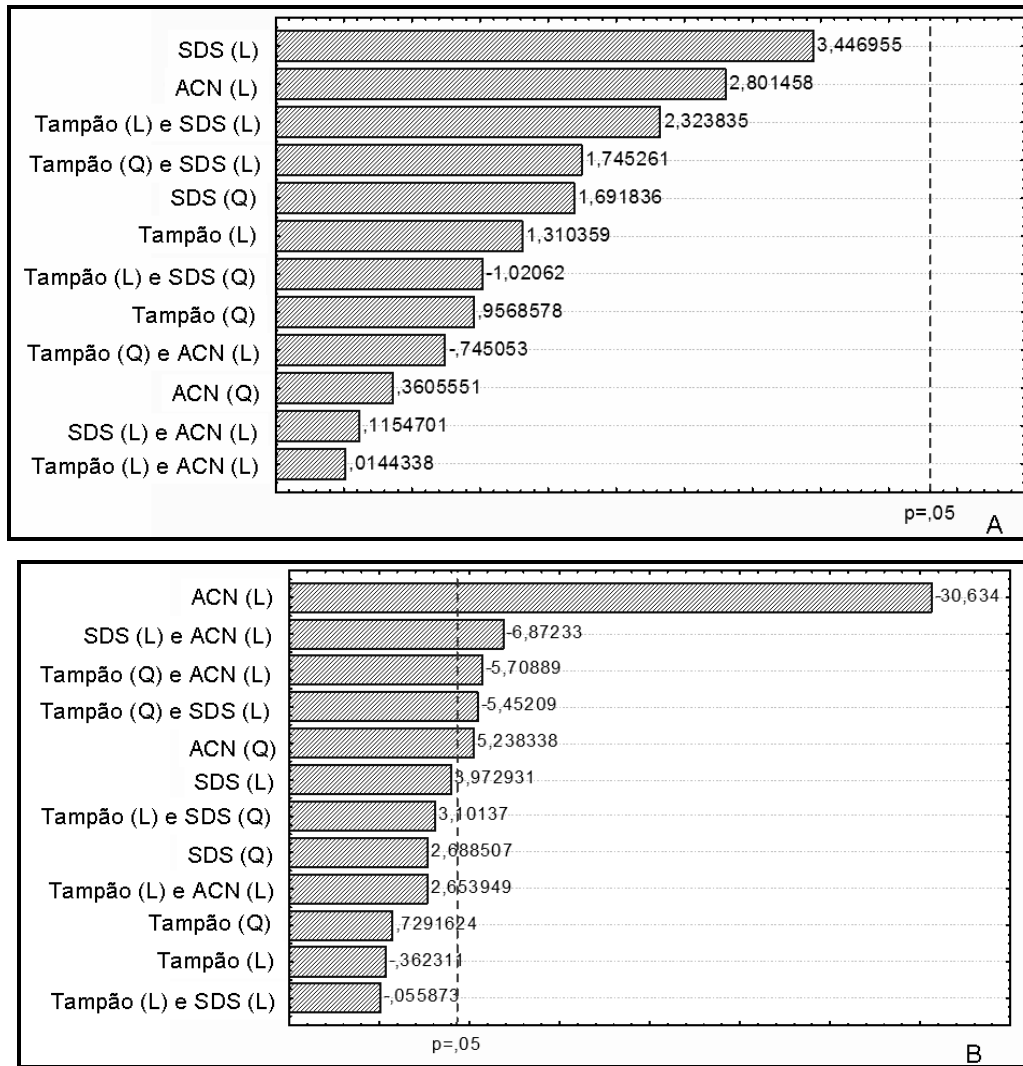


Figura 52: Gráfico de Pareto indicando as condições que afetam as resoluções entre 2 e 3 (A) e entre 3 e 4 (B). Dimo (2), Kreso (3) e Fluo (4).

O gráfico de Pareto indica que a resolução entre o par de picos 2 e 3 não tiveram fatores estatisticamente importantes para a resposta na faixa escolhida para o experimento, porém, para a resolução entre 3 e 4 a porcentagem de ACN no eletrólito teve o efeito mais importante. O gráfico de Pareto (Figura 52 B) indica uma contribuição linear relevante da ACN sendo uma maior resolução alcançada com a redução de sua porcentagem no eletrólito. Outras condições também alteram a resolução entre os picos 3 e 4, porém em menor proporção, como por exemplo, a interação linear entre SDS e ACN e as interações quadráticas da concentração do tampão com SDS e ACN.

Os gráficos de resíduos (Figura 53A) para a resolução entre 2 e 3 apresenta aleatoriedade nos dados, mas o gráfico de valores previstos em função de valores observados (Figura 53 B) mostra que os dados estão distanciados da linha reta, caracterizando um ajuste menos satisfatório do que para a resolução entre 3 e 4 (Figura 54 A e B).

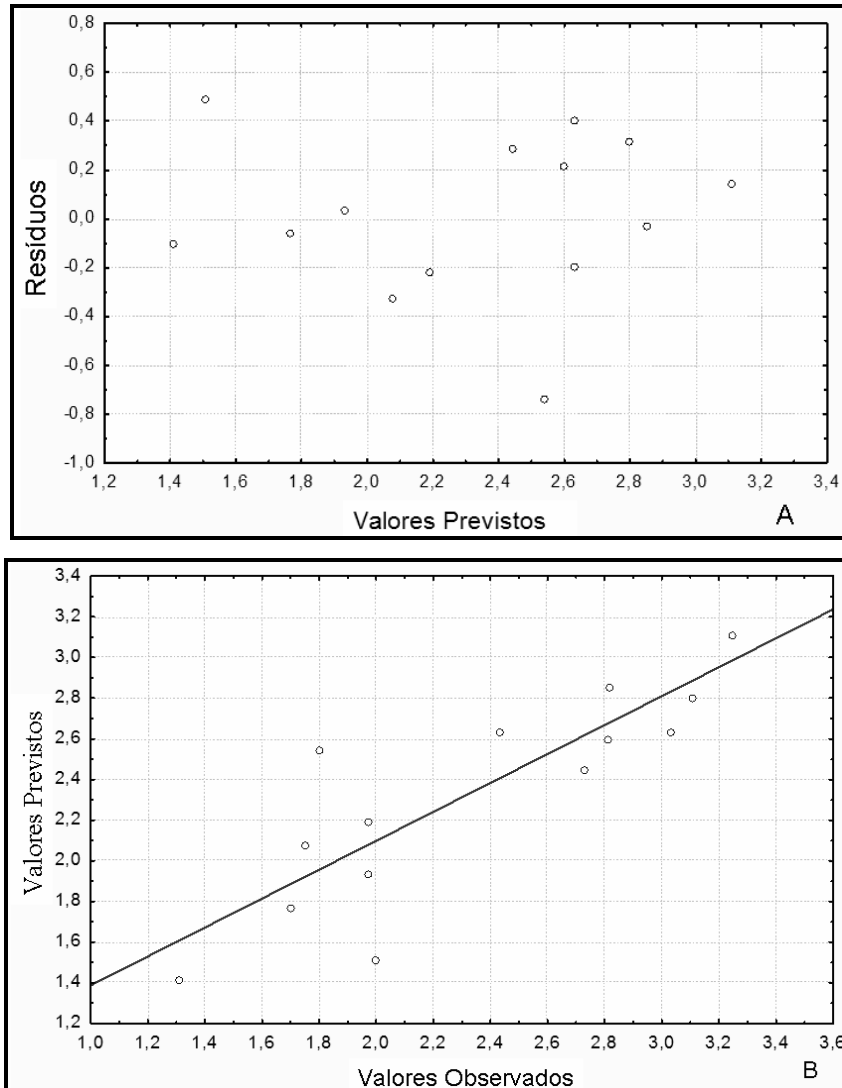


Figura 53: Gráfico da dispersão dos resíduos (A) e gráficos dos valores previstos e valores observados (B) para a resolução entre Dimo (2) e Kreso (3).

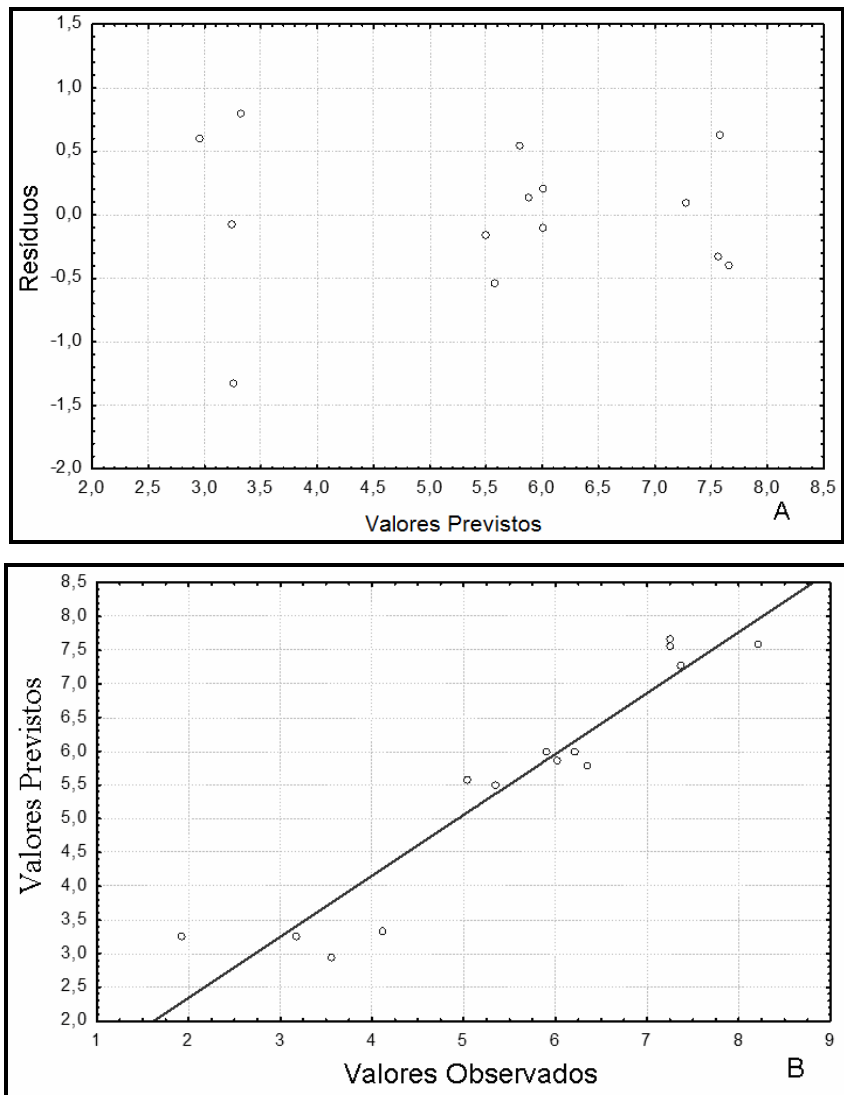


Figura 54: Gráfico da dispersão dos resíduos (A) e gráficos dos valores previstos e valores observados (B) para a resolução entre Kreso (3) e Fluo (4).

Apesar da pequena falta de ajuste, o modelo foi considerado como satisfatório para determinar uma resolução ideal entre os analitos e a função “desejabilidade” foi aplicada (Figura 55). A resolução entre os picos 4 e 5 também foi avaliada, assim como o tempo total de análise.

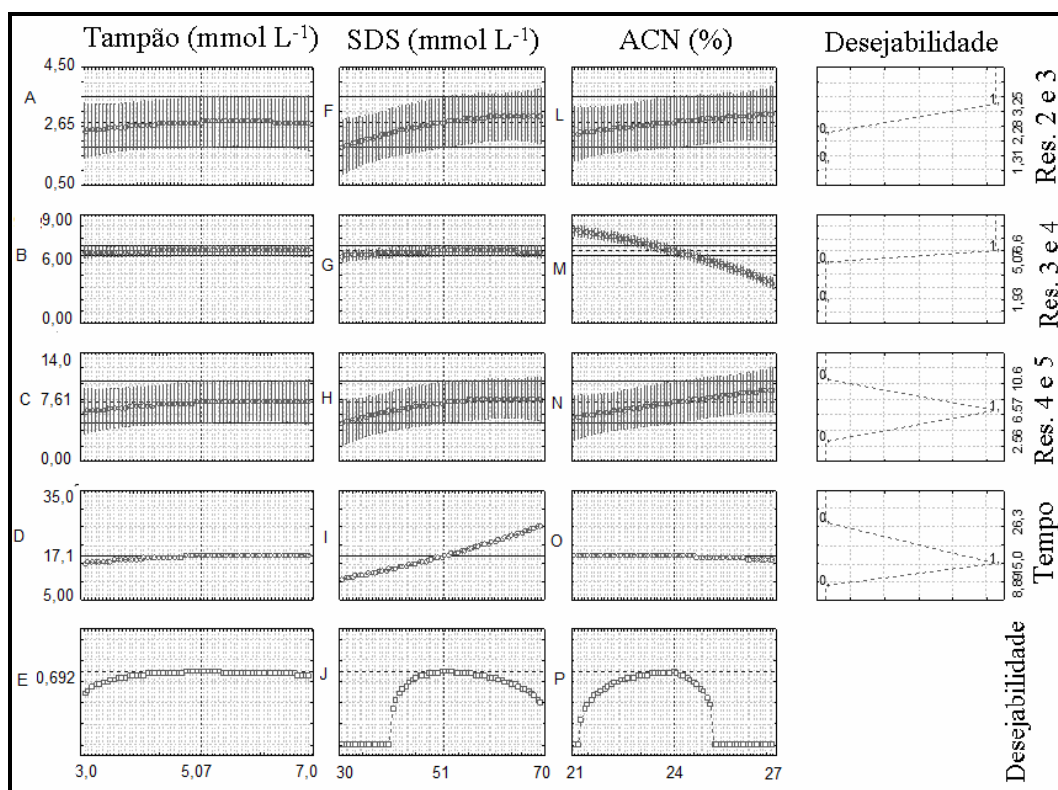


Figura 55: Gráfico da função “desabilidade” para resolução entre os analitos e tempo total de análise. Dima (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5)

Os valores específicos de porcentagem de ACN, concentração de SDS e tampão tetraborato de sódio foram calculados de modo que a resolução entre os analitos fossem maximizadas e tempo de separação minimizado. As resoluções entre os picos, 2 e 3, inferiores a 1,31 foram atribuídas um desejo de 0,0 e resoluções superiores a 3,25 um desejo de 1,0. Para os demais pares de picos foram atribuídos valores desejáveis superiores próximos a 6 e 7, já que esses valores haviam sido atingidos após avaliação do gráfico de barras (Figura 50). Para o tempo de separação superior a 26,3 min foi atribuída a um valor desejável de 0,0 e um tempo de menor de 15 min foi atribuído uma conveniência de 1,0.

Na Figura 55 A, B e C pode ser observado que a concentração do tampão não teve influência em nenhuma resolução entre os pares de pico para todas as respostas. O tempo de migração do último pico (Tri) também não sofre alteração quanto à variação da concentração do tampão tetraborato (Figura 55 D). Esses resultados apontam grande robustez quanto à concentração do tampão tetraborato no eletrólito de trabalho.

A concentração de SDS teve influência muito semelhante nas resoluções entre os pares de picos 2 e 3 e entre 4 e 5 (Figura 55 F e G, respectivamente), sendo observado um aumento nas resoluções com o aumento da concentração de SDS de 30 para aproximadamente 50 mmol L⁻¹. Para o par de picos 2 e 3 a redução da concentração de SDS é mais crítica, pois a resolução seria menor que 2,0 com 30 mmol L⁻¹ do surfactante, já para o par de picos 4 e 5 essa redução traria a resolução para um valor próximo a 4,0 o que não seria crítico para a separação desses analitos. Para o par de picos 3 e 4 (Figura 55 G), a concentração de SDS não teve nenhuma influência para a resolução entre esses analitos, sendo mantida em valor próximo a 6,0. Já para o tempo de migração a concentração de SDS teve forte influência com comportamento linear, um aumento na concentração do surfactante aumenta o tempo de migração dos analitos. O aumento na concentração de micelas permite maior retenção dos analitos na fase pseudo-estacionária, aumentando a separação entre os analitos, com maior afinidade a micelas. O tempo do analito na fase pseudo-estacionária e o tempo total de análise tendem a ser maiores com o aumento da concentração de SDS, pois as micelas têm velocidade de migração contrária ao EOF.

A porcentagem do modificador orgânico teve forte influência na resolução entre os picos 3 e 4 (Figura 55 M) com comportamento linear contrário ao aumento da resolução, ou seja, o aumento da porcentagem de ACN tem ação direta na redução da separação desses analitos. Para os pares de picos 2 e 3 e entre 4 e 5, a influência do modificador orgânico foi semelhante (ver Figura 55 L e N) sendo mais crítica a pequena influência na resolução entre 2 e 3, que tem menores valores de resolução. O modificador orgânico altera a solubilidade dos analitos na fase aquosa, bem como as propriedades físico-químicas das micelas que alteram a seletividade de separação.

Para determinar a condição ideal para a concentração de SDS, a maior influência foi do parâmetro tempo de migração ser no máximo de 15 min e também o compromisso com a resolução entre os analitos 2 e 3 ser maior que 2,5. Para a porcentagem de ACN, o parâmetro mais determinante foi a resolução entre os analitos 3 e 4 e também a busca de uma maior resolução entre 2 e 3. Conclui-se que uma resolução entre 2 e 3 maior que 2,5 sem aumentar o tempo de migração ou sem diminuir a resolução entre 3 e 4, não é possível.

Os valores apontados como ideais para as três variáveis considerando as condições estabelecidas inicialmente são indicados na Tabela 17 e o eletroferograma com os sete analitos nessa condição é mostrado na Figura 56. Devido à robustez do tampão, a concentração ideal foi aproximada para 5,1 mmol L⁻¹. Os valores da resolução entre os picos foram 3,03, 6,21 e 8,78 para os picos 2 e 3, picos 3 e 4 e picos 4 e 5, respectivamente. O tempo de migração obtido foi de 16 min.

Tabela 17: Valores ideais considerados segundo o planejamento BBD 3³.

| Parâmetros | Condições |
|--|--|
| Tampão | 5,1 mmol L ⁻¹ |
| Tetraborato de sódio | |
| SDS | 51 mmol L ⁻¹ |
| ACN | 24% |
| pH | 9,0 |
| Capilar | 60 cm comprimento total e 50 µm d.i |
| Temperatura | 25 °C |
| Diferença de potencial | 30 kV |
| Tempo e pressão de introdução solução | 15s, 50 mbar |

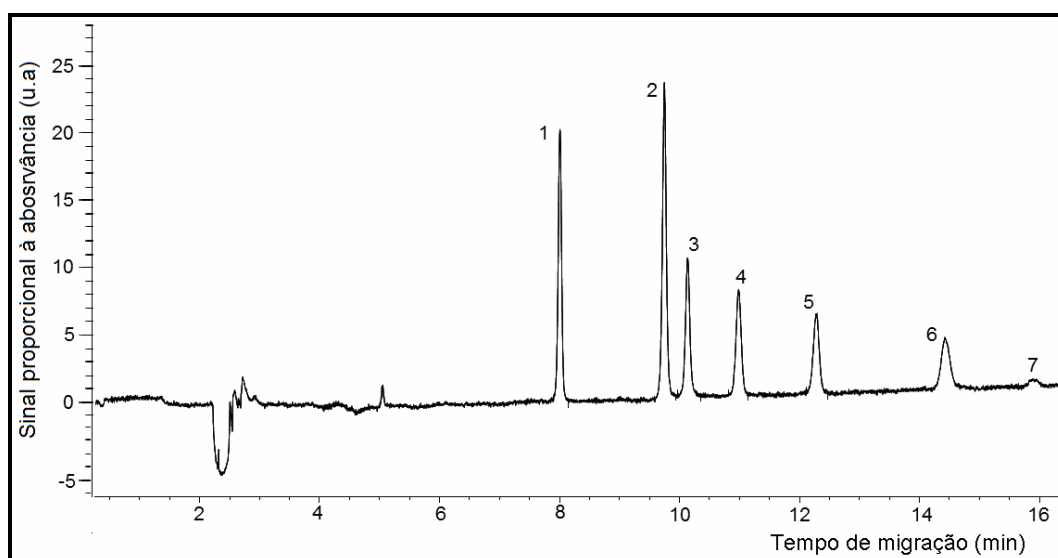


Figura 56: Eletroferogramas com as condições indicadas pelo planejamento BBD 3^3 após uso da função desejabilidade. Azo (1), Dima (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7). Demais condições Tabela 16.

Esses valores foram considerados e utilizados para dar continuidade ao trabalho. Após o teste de repetibilidade, as variações para o tempo de migração e também os formatos dos picos (largura, altura e área) mostraram maior estabilidade com variações menores que 10%. Os valores estão detalhados no estudo da precisão do método. Os entupimentos no capilar não foram observados e a limpeza foi eficiente entre os dias de análise. O valor da corrente gerada durante a análise foi de no máximo $40 \mu\text{A}$, após sua estabilização, o que indica que o aquecimento do capilar não foi um fator crítico nessa condição.

5.2.

Concentração dos analitos no capilar

Com o intuito de melhorar a capacidade de detecção do método para os pesticidas, foi realizado um estudo visando à concentração dos analitos no capilar, já que a determinação absorciométrica em eletroforese capilar é prejudicada pelo caminho óptico limitado pela espessura do capilar. Como mencionado, tentativas de aumentar o caminho óptico podem ser feitas com o uso de capilares com caminho óptico estendido (aumento de aproximadamente três vezes) ou com uso

de celas do tipo Z que aumentam o caminho em até 20 vezes. Outra possibilidade é a concentração dos analitos no capilar. Nessa abordagem, um volume maior de amostra é introduzido no capilar no limite da preservação da resolução entre os analitos e da manutenção da eficiência dos picos, já que a injeção de um grande volume de amostra pode ampliar a largura dos picos e impedir a homogeneidade do campo elétrico ao longo do capilar.

Em MEKC, a concentração dos analitos no capilar se dá principalmente pela abordagem que não utiliza a fase pseudo-estacionária na solução dos analitos, que é conhecida como *sweeping* (por varredura) onde a condição de preparo da solução dos analitos é crítica e deve ser ajustada. Nessa abordagem, a acumulação dos analitos ocorre porque a fase pseudo-estacionária entra na zona da amostra “varrendo” o analito e concentrando-o em uma zona estreita.

A extensão do acúmulo do analito na zona depende das interações que ocorrem quando a fase micelar penetra na solução da amostra, que deve estar preparada em um eletrólito sem surfactante. A afinidade do analito pela micela, é crucial, pois o efeito será maior para os analitos que têm maior afinidade pela fase micelar em relação à solução. Assim a composição da solução contendo os analitos é importante na focalização dos analitos numa zona estreita.

Um estudo com soluções de analito com diferentes composições foi realizado. Uma proporção de ACN na solução dos analitos foi incluída, pois é importante que a condição ajustada preveja a possibilidade de inclusão de alguma quantidade de ACN proveniente dos procedimentos de extração dos analitos das amostras reais. A adição de ACN também altera a velocidade eletroforéticas dos íons (no caso sistema micela-analito) em solução porque a razão entre sua constante dielétrica (ϵ) e viscosidade (η) é maior (111.44 cP) em relação a razão da água (87,6 cP). Com isso, a mobilidade dos sistemas micela-analito em solução contendo esse solvente é maior⁶⁷. Assim, quando as condições são apropriadas, as micelas penetram na zona dos analitos e migram com maior velocidade (devido à menor viscosidade do meio) criando uma região mais concentrada de micelas. Os íons do tampão tetraborato, quando adicionados à solução dos analitos, podem ajudar nessa diferença de mobilidade das micelas, seja pela presença maior de íons ou pela mudança da condutividade da solução em relação ao eletrólito de trabalho. No trabalho já desenvolvido para Pico e Pira, a concentração dos

analitos no capilar foi melhor quando a solução dos analitos continha o tampão utilizado no eletrólito.

Na Figura 57 são mostrados eletroferogramas obtidos após diferentes ajustes na composição das soluções dos analitos. Diferentes tempos de introdução das soluções foram avaliados.

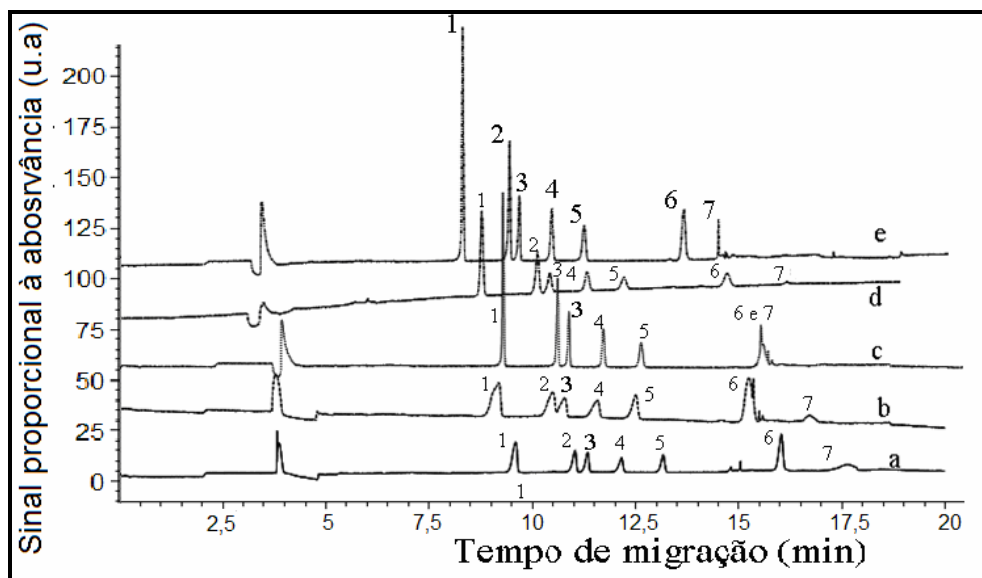


Figura 57: Processo de concentração dos analitos no capilar. Pesticidas preparados nos seguintes meios ($7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$): (a) ACN: tampão tetraborato 35 mmol L^{-1} 30:70 % v/v, 15 s; (b) ACN: tampão tetraborato 35 mmol L^{-1} 30:70 % v/v, 30 s; (c) ACN: tampão tetraborato 45 mmol L^{-1} 10:90 % v/v, 30 s; (d) 100% água, 30 s (e) ACN: 45 mmol L^{-1} tampão tetraborato 10:90 % v/v, 45 s. Pressão 50 mbar. Demais condições Tabela 17. Analitos: Azo (1), Dime (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

O resultado apresentado na Figura 57 mostra que em água pura (eletroferograma d) e com tempo máximo de introdução de 30 s os picos dos analitos ficaram largos e pouco intensos, indicando que a concentração dos analitos numa zona não foi alcançada, provavelmente devido à baixa mobilidade de migração das micelas quando estas entram na zona da solução dos analitos. A solução dos analitos preparada em tetraborato de sódio (35 mmol L^{-1}) (eletroferogramas a e b) não foi favorável ao enriquecimento dos analitos em zonas estreitas, mesmo com tempos de injeção maiores de solução de analito (30 s).

Analisando a condição onde a quantidade de ACN foi reduzida para 10% (eletroferogramas c e e da Figura 57) é possível verificar o aumento de sinal que indica enriquecimento do analito nas suas respectivas zonas. No eletroferograma “e” da Figura 57, a resolução entre os picos é mantida, mesmo após injeção por tempo de 45 s. O sinal da Azo (1) é intenso, assim como o sinal dos demais analitos. Os picos são mais estreitos (melhor eficiência) com o sinal do Tri (7) aparecendo com melhor intensidade e eficiência. A redução da porcentagem do solvente e o aumento da concentração do tampão foram favoráveis ao processo de *sweeping*. A redução da quantidade do solvente ajudou na interação entre analito e micela e a presença do tampão tetraborato em alta concentração permitiu uma velocidade de migração das micelas e da zona do analito favorável à focalização. Essa condição foi selecionada para uma otimização da porcentagem de solvente e concentração de tampão tetraborato na solução de preparo dos analitos.

A partir desses resultados preliminares, um ajuste final de condição de concentração de analito foi realizado. O efeito da porcentagem de ACN foi avaliado mantendo constante a concentração do tampão tetraborato em 45 mmol L⁻¹ e o tempo de introdução da solução em 45 s (Figura 58). O aumento da porcentagem de ACN na solução dos analitos até o valor de 20% favorece a focalização dos analitos pelas micelas (eletroferograma c da Figura 58). A presença de ACN na solução dos analitos permite a entrada das micelas na solução favorecendo assim a interação analito-micela. A porcentagem igual a 25% de ACN permite, nesse caso, maior dispersão das micelas sendo desfavorável a focalização. Devido a alta concentração do tampão tetraborato, a velocidade de migração das micelas que entram na zona dos analitos (que já tem direção contrária ao EOF) é reduzida favorecendo ainda mais concentração. Em relação ao ganho de sinal (altura do pico) vale ressaltar o aumento da altura de pico o analito Tri (7) que foi mais expressivo em comparação ao aumento do sinal dos demais analitos.

O aumento na concentração do tampão tetraborato na solução de preparo dos analitos não foi favorável ao processo de focalização e interação analito-micela (ver Figura 59). Todos os picos tiveram a altura reduzida quando a concentração foi maior de 45 mmol L⁻¹. A velocidade de migração das micelas nas concentrações maiores de tetraborato foi muito reduzida e a penetração de

micelas na zona dos analitos foi prejudicada, mesmo com a presença de ACN. A redução mais visível foi em relação ao pico do analito Tri (7).

A porcentagem de solvente ACN igual a 20% e a concentração de 45 mmol L⁻¹ foram selecionados como sendo a condição ideal para o processo de concentração de analito no capilar via *sweeping*. Essa condição foi utilizada para otimizar o tempo de introdução da solução com uma pressão de 50 mbar (Figura 60). O aumento nas áreas referentes aos analitos Azo e Pira foi mais expressivo (aumentou linearmente) quando o tempo de introdução aumentou de 40 para 65 s (Figura 61) em comparação às áreas dos demais analitos. Porém, o aumento na altura dos demais picos não teve o mesmo comportamento. Picos mais largos indicam um menor efeito do processo de *sweeping* a partir de um tempo de 45 s de introdução da amostra. Para os demais analitos, a altura dos picos foi praticamente constante durante o aumento de tempo de introdução de amostra e para os analitos Kreso (3) e Tri (7) não foi observado aumento nas áreas e alturas dos picos, permanecendo constante independentemente do tempo de introdução de amostra. Assim o tempo de 45 s foi selecionado como ideal para introdução dos analitos e para o processo de *sweeping*.

Na Tabela 18 são apresentadas as melhores condições para a determinação de estrobilurinas utilizando MEKC com detecção por fotometria de absorção em 210 nm. Essas condições foram utilizadas para estabelecer os parâmetros analíticos de mérito do método.

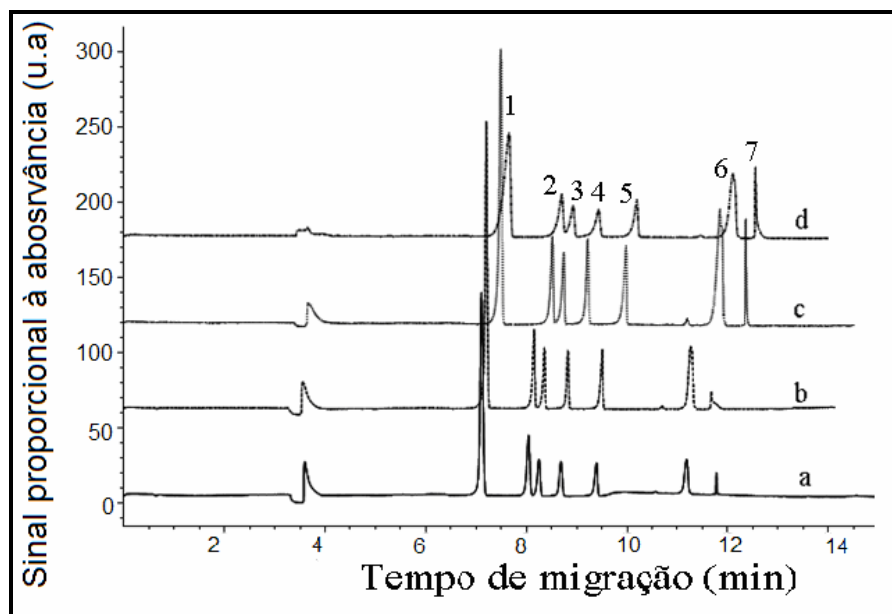


Figura 58: Otimização das condições de preparo da solução dos analitos. Variações da porcentagem de ACN na solução, (a) 10%, (b) 15%, (c) 20%, (d) 25%. Demais condições Tabela 17. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

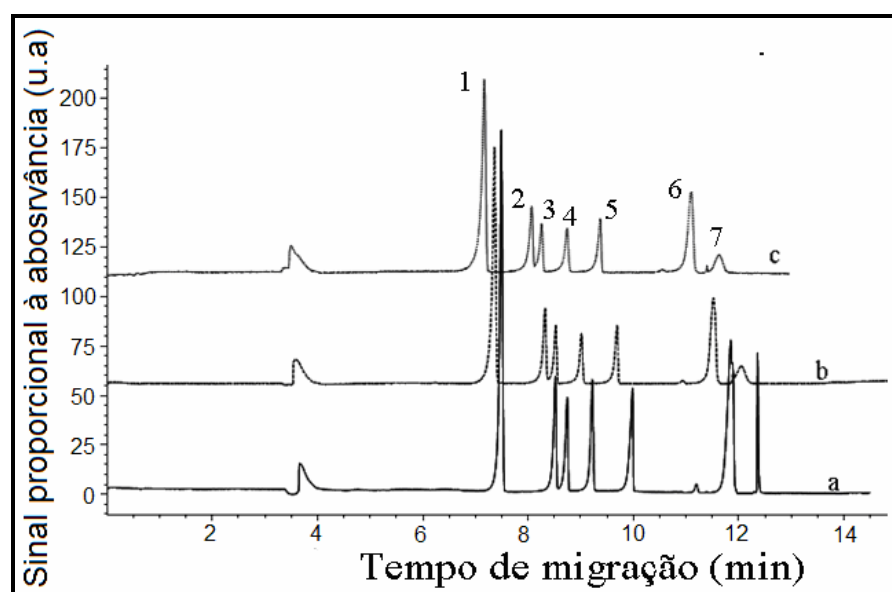


Figura 59: Otimização das condições de preparo da solução dos analitos. Variações da concentração de tetraborato de sódio, (a) 45, (b) 55 e (c) 60 mmol L⁻¹. Porcentagem de ACN constante em 20%. Demais condições Tabela 17. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

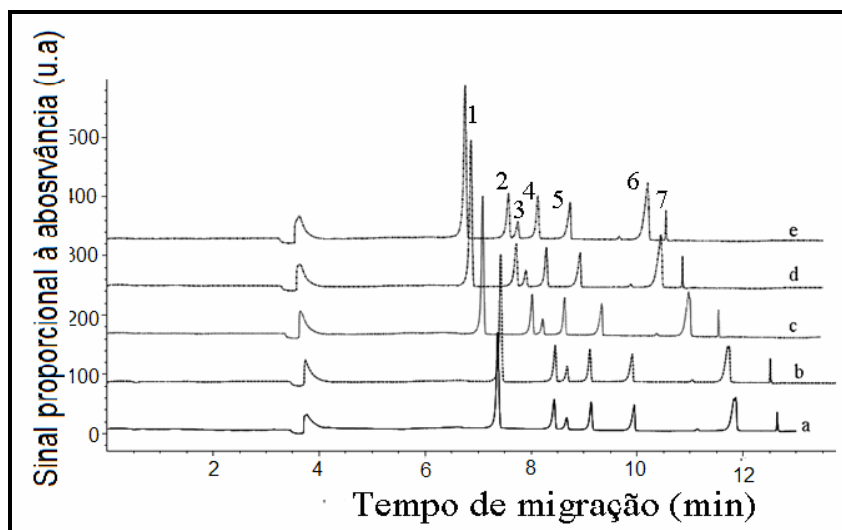


Figura 60: Otimização do tempo de injeção da solução padrão no processo de concentração de analito no capilar (a) 40 s, (b) 45 s, (c) 50 s, (d) 60 s (e) 65 s com pressão de 50 mbar. Demais condições Tabela 17 . Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

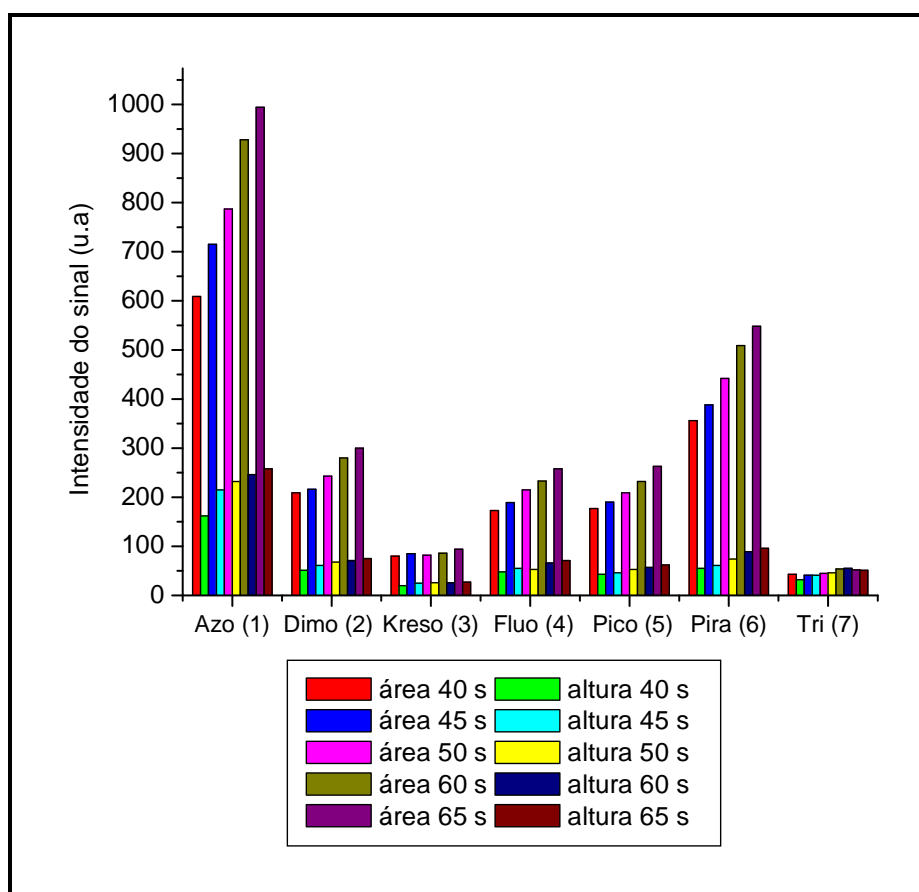


Figura 61: Resultados obtidos para área e altura dos picos dos analitos em função do tempo de introdução das soluções a 50 mbar por injeção hidrodinâmica.

Tabela 18: Condições estabelecidas para determinação das sete estrobilurinas por MEKC.

| Condições de análise | Condições estabelecidas |
|---|--------------------------------|
| Capilar | 60 cm x 50 μm d.i. |
| Temperatura | 25°C |
| Voltagem | 30 kV |
| Comprimento de onda | 210 nm |
| Concentração do tampão (pH 9,0) | 5,1 mmol L ⁻¹ |
| Concentração de SDS | 51 mmol L ⁻¹ |
| Solvente orgânico (ACN) | 24% |
| Tempo de injeção | 45 s |
| Preparo dos analitos | |
| Tampão tetraborato de sódio (pH 9,0) | 45 mmol L ⁻¹ (80 %) |
| Solvente orgânico (ACN) | 20 % |

5.3.

Parâmetros de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito, resposta linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (testes de recuperação) do método desenvolvido foram calculados e avaliados a seguir.

5.3.1.

Resposta Linear

As curvas analíticas foram construídas com soluções contendo todos os pesticidas em diferentes faixas de concentrações, com variações entre 0,1 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,021 a 3,0 mg L⁻¹). As medições foram realizadas em triplicatas para cada nível de concentração. Comportamento linear pode ser observado em todas as curvas analíticas (Figura 62 e Figura 63). Após verificar a ausência de valores

discrepantes para cada nível de concentração, pelo teste de Grubbs¹⁸¹, foi realizado o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O comportamento linear foi indicado pelos valores de coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2) superiores a 0,99 (Tabela 19). Nos gráficos de resíduos (Figura 62 e Figura 63), o padrão de distribuição aponta a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta, confirmando a escolha pelo comportamento linear para todos os analitos.

A adequação do modelo para os pesticidas também foram avaliados pelos testes F e t de student, assim como pelos valores de p. A Tabela 19 apresenta os valores obtidos para F, t e p. Como os valores calculados de F foram muito superiores aos valores críticos para todos os analitos, pode-se constatar que o modelo linear é estatisticamente válido para todos os analitos na faixa de concentração estudada em um nível de significância de 5%. Os valores de t calculados foram também superiores ao valor crítico, resultando em um modelo que relaciona linearmente a intensidade de sinal e concentração. Os valores de p são menores do que o valor de α (significância), indicando um modelo que relaciona linearmente a área do pico com a concentração do analito. A partir dos diversos testes estatísticos, pode-se concluir que o método apresenta resposta linear para todos os pesticidas.

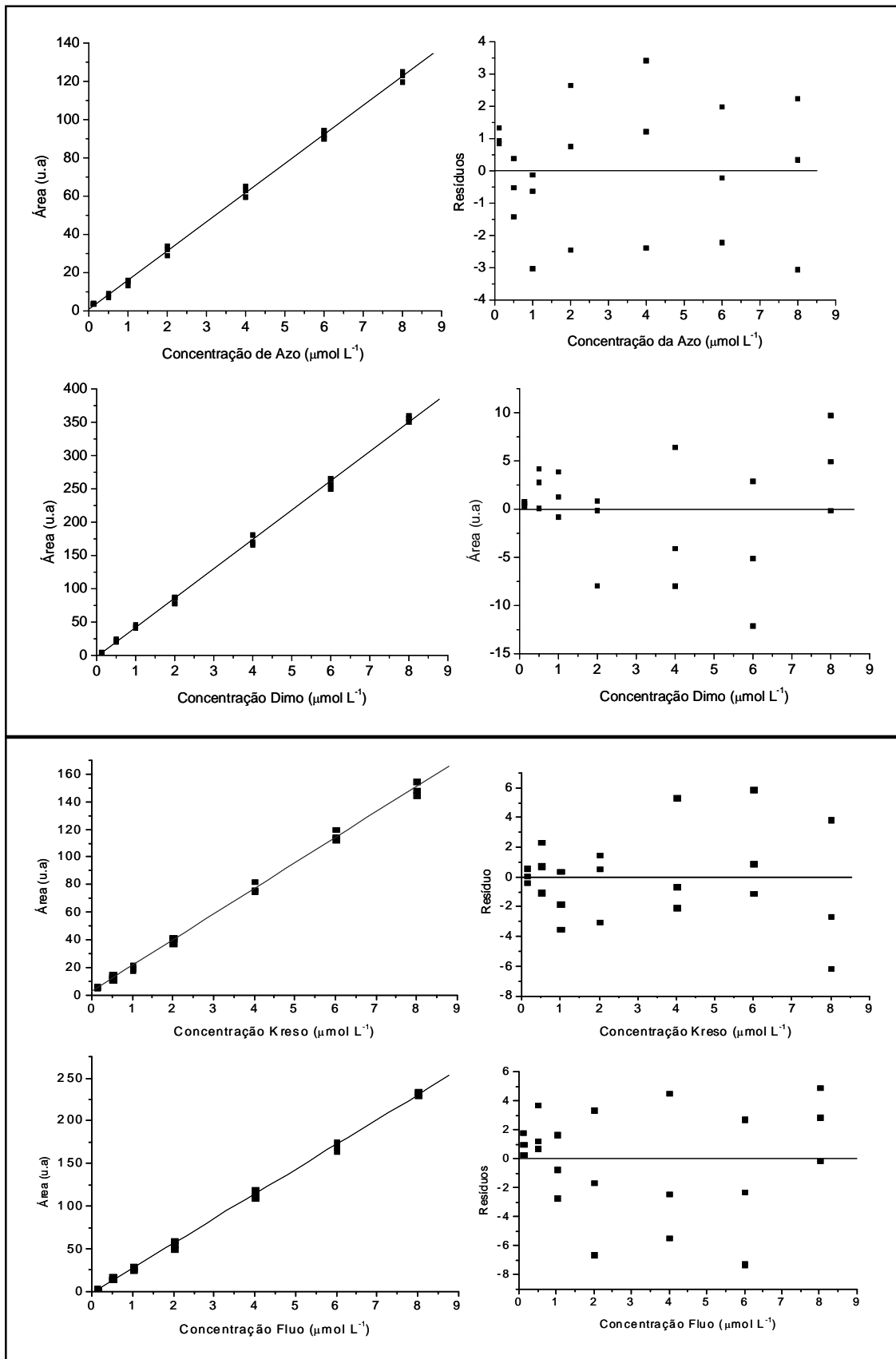


Figura 62: Curvas analíticas e os gráficos de resíduos dos pesticidas: azoxistrobina, dimoxistrobina, kresoxim-metil e fluoxastrobina.

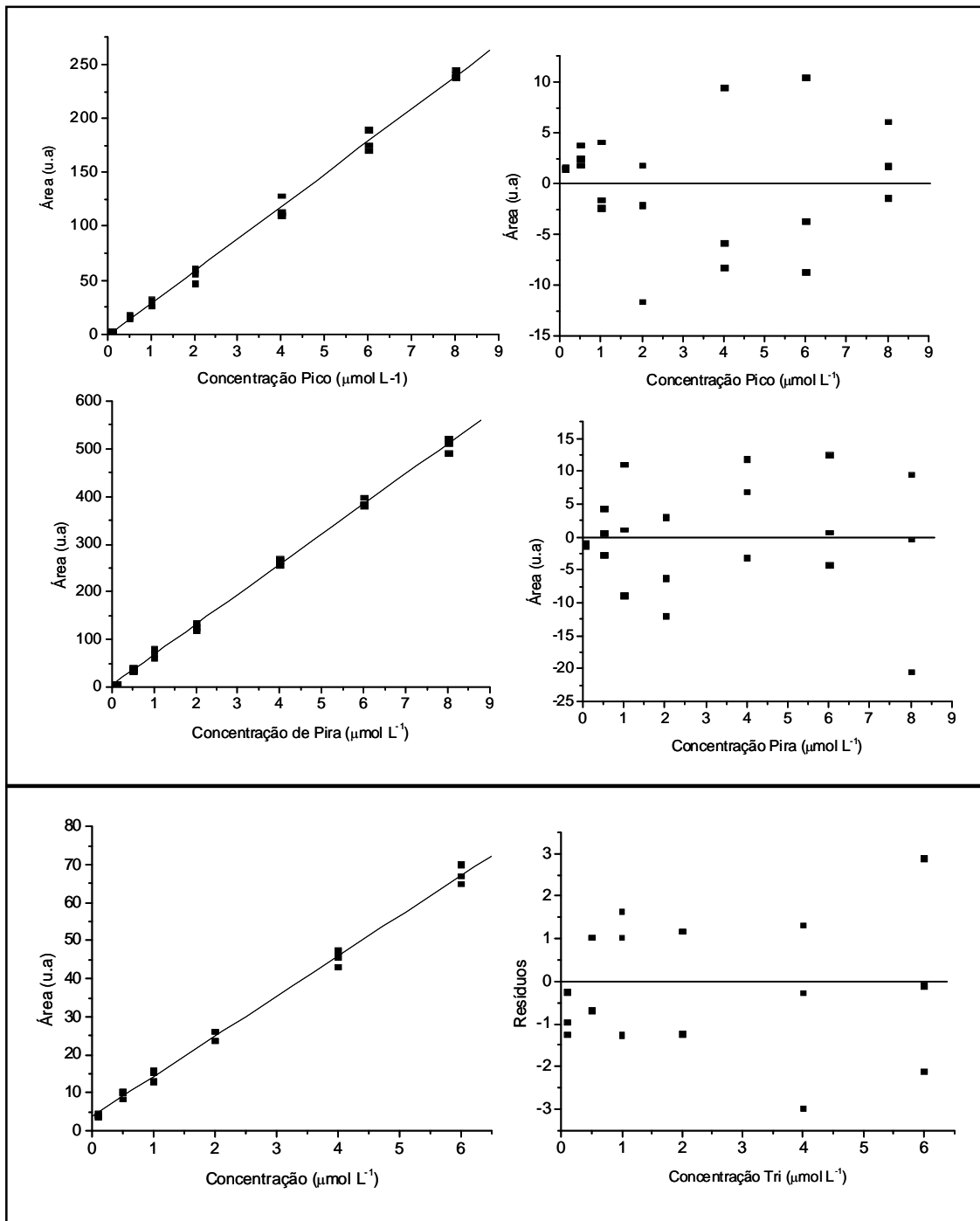


Figura 63: Curvas analíticas e os gráficos de resíduos para os pesticidas: picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina.

Tabela 19: Parâmetros das curvas analíticas dos pesticidas.

| Pesticidas | Parâmetros | | | | | | |
|------------------|--|---------------------|----------------|-------|------------------|------------------|--------------------------|
| | Sensibilidade da curva (x 10 ⁶ L mol ⁻¹) | Coefficiente Linear | R ² | r | F _{cal} | t _{cal} | p |
| Azoxistrobina | 15,2 ± 0,2 | 0,9 ± 0,6 | 0,998 | 0,999 | 10106 | 101 | 2,26 x 10 ⁻²⁷ |
| Dimoxistrobina | 44,0 ± 0,4 | 1,9 ± 1,7 | 0,998 | 0,999 | 13763 | 117 | 1,21 x 10 ⁻²⁸ |
| Kresoxim-metil | 18,5 ± 0,2 | 3,1 ± 0,9 | 0,997 | 0,998 | 6461 | 80 | 1,57 x 10 ⁻²⁵ |
| Fluoxastrobina | 28,9 ± 0,3 | -1,4 ± 1,2 | 0,998 | 0,999 | 10684 | 103 | 1,33 x 10 ⁻²⁷ |
| Picoxistrobina | 30,1 ± 0,4 | -2,0 ± 1,9 | 0,996 | 0,998 | 4482 | 67 | 5,00 x 10 ⁻²⁴ |
| Piraclostrobina | 63,2 ± 0,6 | 4,9 ± 2,7 | 0,998 | 0,999 | 9502 | 97 | 4,06 x 10 ⁻²⁷ |
| Trifloxistrobina | 10,5 ± 0,2 | 3,7 ± 0,5 | 0,995 | 0,998 | 3714 | 61 | 2,25 x 10 ⁻²⁰ |

F_{crítico} = 4,381 para todos, com exceção da trifloxistrobina F_{crítico} = 4,494.

t_{crítico} = 2,45, para todos, com exceção da trifloxistrobina t_{crítico} = 2,57.

5.3.2.

Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores para LOD e LOQ foram calculados utilizando os valores obtidos por medições de soluções preparadas contendo a menor concentração dos analitos que poderiam ser diferenciados do ruído da linha base. Os valores de s_b foram calculados após medição de sete soluções distintas. Os valores de LOD e LOQ estão na Tabela 20. O LOD variou entre 7,0 µg L⁻¹, para trifloxistrobina e piraclostrobina, a 15 µg L⁻¹ para fluoxastrobina. Os valores de LOQ ficaram entre 21 e 45 µg L⁻¹.

Tabela 20: Valores de limite de detecção e de limite de quantificação dos analitos usado o método MEKC.

| Pesticidas | LOD | LOD | LOQ | LOQ |
|------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | ($\mu\text{g L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
| Azoxistrobina | 0,03 | 13 | 0,10 | 40 |
| Dimoxistrobina | 0,03 | 11 | 0,10 | 33 |
| Kresoxim-metil | 0,04 | 13 | 0,13 | 40 |
| Fluoxastrobina | 0,03 | 15 | 0,10 | 45 |
| Picoxistrobina | 0,03 | 12 | 0,10 | 36 |
| Piraclostrobina | 0,02 | 7 | 0,05 | 21 |
| Trifloxistrobina | 0,03 | 12 | 0,10 | 41 |

5.3.3.

Repetibilidade

As repetibilidades para os sete analitos foram calculadas pelos desvios padrões relativos (RSD) tanto para os tempos de migração dos picos e quanto para as áreas dos picos de cada analito. Para esse teste foi utilizado uma concentração próxima ao centro da curva analítica (aproximadamente $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) de cada analito com sete replicatas. Os valores para o tempo de migração dos analitos variaram entre 0,25% para Dimo e Kreso e 0,71% para Pira (ver Tabela 21). Esses valores podem ser considerados excelentes para a técnica MEKC e apropriadas para análises de rotina. As variações para as áreas dos picos foram maiores ficando entre 1,7 a 7,9% para Pico e Tri, respectivamente. A maior variação para a área para o analito Tri pode estar associada a variações no processo de *sweeping*, pois foi o analito mais sensível às condições de concentração. A variação de 7,9% é aceitável para a técnica de MEKC.

Tabela 21: Valores da repetibilidade do método MEKC para os pesticidas

| Pesticidas | Área (%) | Tempo (%) |
|------------------|----------|-----------|
| Azoxistrobina | 4,0 | 0,28 |
| Dimoxistrobina | 3,2 | 0,25 |
| Kresoxim-metil | 4,4 | 0,25 |
| Fluoxastrobina | 3,1 | 0,46 |
| Picoxistrobina | 1,7 | 0,31 |
| Piraclostrobina | 2,4 | 0,71 |
| Trifloxistrobina | 7,9 | 0,36 |

5.3.4.

Precisão Intermediária

Os valores obtidos para a precisão intermediária (Tabela 22) mostraram que as maiores variações entre as medidas realizadas em dias diferentes foram para as áreas dos picos dos analitos, mesmo assim os resultados foram satisfatórios com variações entre 1,3 e 3,5%. O teste F baseado no princípio da ANOVA foi aplicado para todos os analitos, comparando tanto o tempo de migração quanto as áreas dos picos (Tabela 22). Todos os valores de F_{cal} foram menores que o valor de $F_{crítico}$ (4,71), o maior valor de F_{cal} (3,81) foi para o tempo de migração do analito Pico. Por esses resultados poderia-se dizer que não existe diferença significativa, com nível de confiança de 95%, entre as médias das áreas e dos tempos de migração. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios para a técnica MEKC.

Tabela 22: Precisão intermediária do método para tempo e área dos pesticidas.

| Pesticidas | Precisão | | Precisão | |
|------------------|-----------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| | Intermediária (%) (Área) | F _{cal} | Intermediária (%) (Tempo) | F _{cal} |
| Azoxistrobina | 3,5 | 0,47 | 0,40 | 2,41 |
| Dimoxistrobina | 2,0 | 0,28 | 0,16 | 0,35 |
| Kresoxim-metil | 2,9 | 0,26 | 0,06 | 0,047 |
| Fluoxastrobina | 4,0 | 1,2 | 0,32 | 2,41 |
| Picoxistrobina | 5,3 | 1,5 | 0,52 | 3,81 |
| Piraclostrobina | 1,3 | 0,51 | 0,70 | 1,63 |
| Trifloxistrobina | 2,5 | 0,11 | 0,90 | 0,020 |

5.4.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação em amostras de sopas infantis industrializadas de frutas (maçã, mamão e laranja) e vegetais (cenoura, feijão, beterraba e trigo), obtidas em lojas comerciais da cidade. Essa amostra foi selecionada por possuir em sua composição diferentes tipos de frutas e vegetais e que, por isso, podem estar sujeitos à contaminação com as estrobilurinas. Os diferentes pesticidas poderiam estar presentes, pois estes são aplicados em diferentes lavouras.

5.4.1.

Preparo das amostras de sopas prontas infantis

Neste trabalho o método QuEChERS aplicado foi modificado depois de testes preliminares realizados com as amostras. Para os ensaios de recuperação, amostras em branco das sopas infantis de frutas e vegetais foram fortificadas com

os pesticidas de modo que a concentração final da solução ficasse próxima ao ponto médio das respectivas curvas analíticas.

O primeiro teste foi realizado com amostra de sopas de vegetais seguindo as seguintes etapas para o método QuEChERS: (i) 10 g de amostra foram pesados e em seguida adicionou-se água ultrapurificada até aproximadamente 15 g, a mistura foi agitada por 30 s com vortex; (ii) 10 mL de ACN foi adicionado e agitou-se o tubo por 1 min com vortex; (iii) 4 g de $MgSO_4$ e 1 g de NaCl foram adicionados e agitou-se novamente o tubo por 1 min; (iv) 1 mL do sobrenadante foi retirado transferido para outro tubo e realizada a etapa de limpeza com adição de 150 mg de $MgSO_4$ e 25 mg de C-18, para a realizar extração em fase sólida dispersiva (D-SPE); (v) o sobrenadante foi novamente retirado e levado a quase secura sob fluxo de nitrogênio até aproximadamente 200 μL (vi) o volume foi retomado para 1 mL com adição de solução de tampão tetraborato de sódio 45 mmol L^{-1} ; (vi) a solução foi filtrada e analisada por MEKC. A adição de água foi inicialmente proposta para aumentar a fluidez da amostra pastosa e assim ajudar no contato entre os reagentes e matriz da amostra. A adição de água também ajuda a compensar o calor gerado com a adição de $MgSO_4$. O uso de C-18 na etapa de limpeza é importante por ajudar na remoção de gorduras.^{40,41, 182} A Figura 64 mostra os resultados obtidos para esse teste.

O procedimento de extração foi eficiente para os analitos Azo, Dimo, Kreso, Fluo e Pico. Porém, interferentes ainda presentes no extrato atrapalharam na determinação dos pesticidas Pira (6) e Tri (7), os analitos com maiores tempos de migração. A Tabela 23 apresenta os resultados de recuperação obtidos nessa etapa com medidas realizadas em 210 nm. A estrobilurina Pira apresenta um máximo de absorção em 270 nm, assim os eletroferogramas após esse processo de extração foram analisados nesse comprimento de onda e observou-se que o interferente presente na amostra (observado em 210 nm) não absorve em 270 nm. Outra observação importante é que a Pira tem o tempo de migração alterado (ver os eletroferogramas b e c e também d e f da Figura 65). Apesar da menor intensidade do pico, em 270 nm, foi possível confirmar a ausência de Pira na amostra, devido a ausência do pico no branco (ver eletroferograma a da Figura 65). A recuperação para o analito, calculada com os resultados obtidos com medidas em 270 nm foi igual a $92 \pm 6\%$. O mesmo não foi observado para o

analito Tri devido presença do pico interferente (*), mesmo em 270 nm (Figura 65).

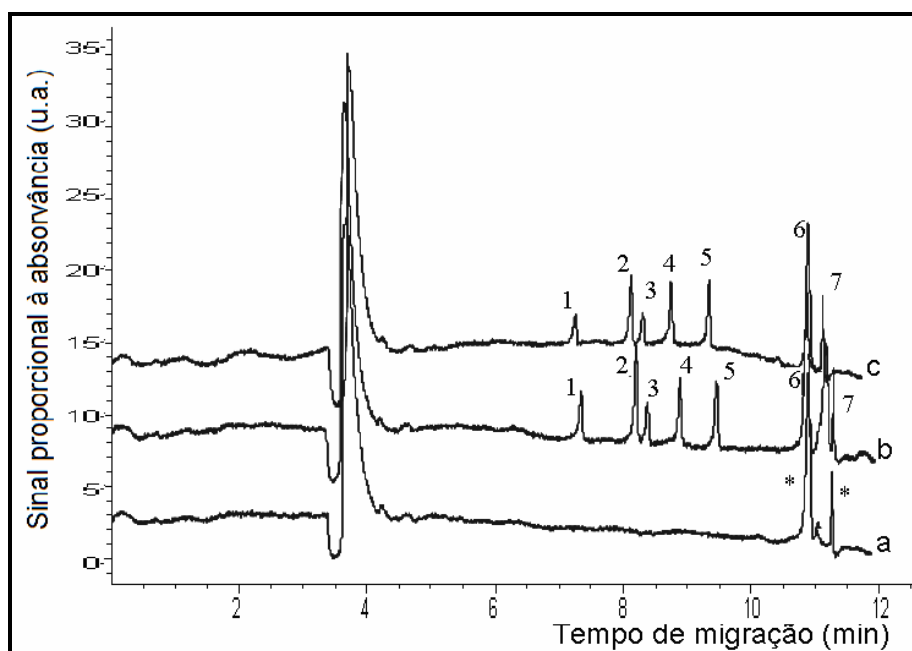


Figura 64: Eletroferogramas das amostras de papinha de vegetais após procedimento de extração QuEChERS: (a) branco da amostra, (b) amostra após adição dos pesticidas, (c) padrão dos analitos com os sete pesticidas. (*) interferentes. Condições de análise ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

Tabela 23: Valores das recuperações para os pesticidas nas amostras de sopas infantis de vegetais após o primeiro procedimento de extração por QuEChERS.

| Analitos | Recuperações (%) |
|----------|------------------|
| Azo | 90 ± 3 |
| Dimo | 92 ± 4 |
| Kreso | 85 ± 6 |
| Fluo | 91 ± 5 |
| Pico | 95 ± 3 |
| Pira | n. i. |
| Tri | n. i. |

n.i = analitos não identificados.

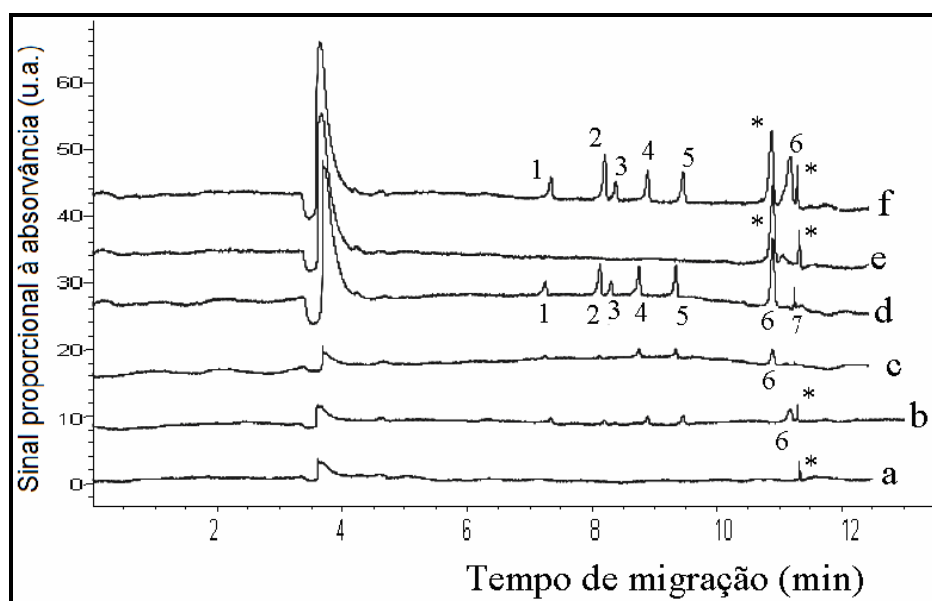


Figura 65: Eletroferogramas das amostras de sopas infantis após procedimento de extração QuEChERS: (a) branco 270 nm, (b) amostra 270 nm, (c) padrão 270 nm, (d) padrão 210 nm, (e) branco 210 nm e (f) amostra 210 nm. Condições de análise ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

A adição do sorvente PSA pode ajudar na remoção de ácidos graxos e outros ácidos orgânicos presentes nos alimentos. Assim, foi realizado um teste com adição de PSA completando o processo de extração D-SPE. A combinação entre PSA e C-18 foi importante nas amostras de sopas de vegetais devido ao maior teor de gordura. A quantidade de PSA e C-18 adicionada ao extrato das sopas foi avaliada. A Figura 66 apresenta os eletroferogramas do teste que mostram que a quantidade de 25 mg de PSA e 25 mg de C-18 promoveu a limpeza adequada de todo o sobrenadante. Valores acima dessa quantidade devem ser evitados, pois o analito Tri não foi devidamente extraído, pode ter ficado adsorvido aos sorventes (ver eletroferogramas da Figura 66 d e f). Os valores de recuperações para Pira e Tri foram iguais a $90 \pm 5\%$ e $91 \pm 6\%$, respectivamente. Para os demais analitos as recuperações obtidas anteriormente em 210 nm foram mantidas.

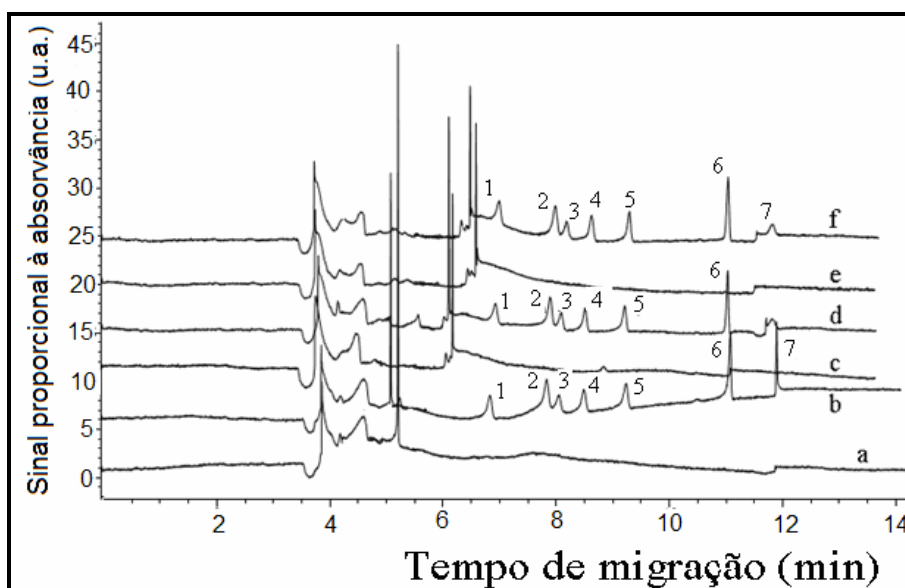


Figura 66: Análise da amostra de papinha de vegetais após adição dos pesticidas e variações nas quantidades de PSA e C-18 adicionado ao extrato no processo de limpeza: (a) branco e (b) amostra após adição de 25 mg; (c) branco e (d) amostra após adição de 50 mg; (e) branco e (f) amostra após adição de 100 mg de PSA e C-18. Condições de análise ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

Outra modificação importante no método QuEChERs foi com relação ao ajuste de pH. A adição de acetado de sódio e ácido acético (pH próximo de 5,0) foi importante para a extração dos pesticidas em sopas de frutas. Na Figura 67 é mostrado o resultado da análise de uma amostra de sopa de fruta com o procedimento QuEChERs antes e após ajuste de pH. Sem o ajuste de pH não foram extraídos os pesticidas (eletroferograma *a* Figura 67), no entanto, depois do ajuste, os picos foram identificados no eletroferograma da amostra (eletroferograma *b* Figura 67). O ajuste de pH auxiliou na transferência dos analitos da fase aquosa para a fase orgânica. Um grande pico interferente (*) pode ser observado nessa amostra, impedindo a determinação do pesticida Tri (7), o ajuste de pH também auxiliou na transferência do interferente para a fase orgânica. Na Figura 68 é mostrada outra análise de amostra de sopa de fruta com uso da mistura ácido acético/acetado de sódio. Novamente, interferentes estão presentes e atrapalham as determinações de Tri mesmo após medida em outros comprimentos de onda (270 nm). Na Tabela 24 são apresentados os resultados de

recuperação obtidos. Menores valores foram encontrados para Kreso e Pira, mas foram considerados satisfatórios.

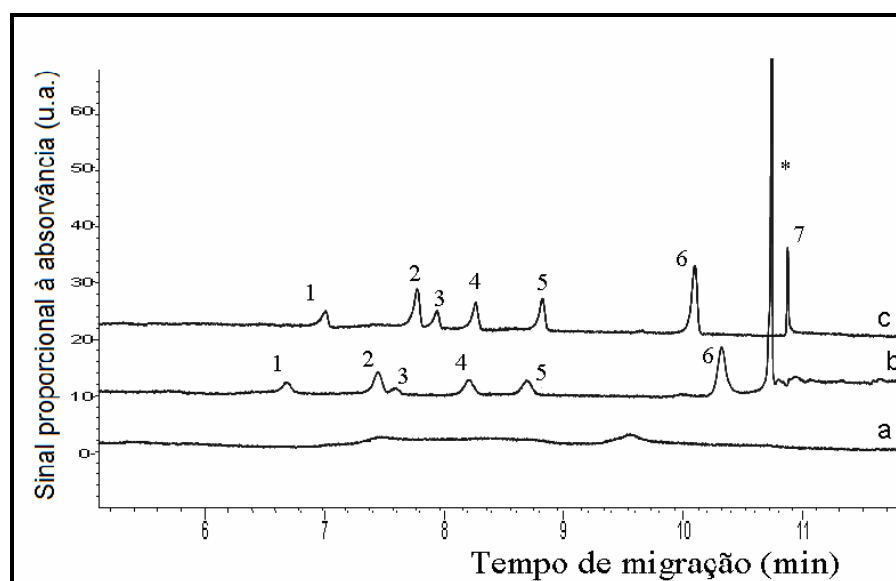


Figura 67: Eletroferogramas de uma amostra de papinha de fruta após a adição dos pesticidas e processo de extração QuEChERS, (a) sem ajuste de pH, (b) após ajuste de pH e (c) solução padrão dos pesticidas. Demais condições ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

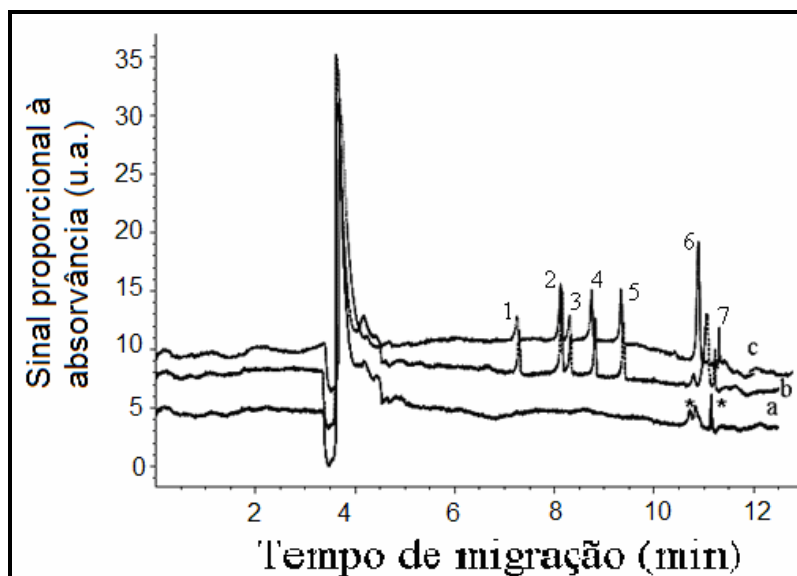


Figura 68: Análise de uma amostra de papinha de fruta após procedimento QuEChERS com adição de ácido acético e acetato de sódio. (a) branco da amostra, (b) amostra com adição dos sete pesticidas, (c) solução padrão dos pesticidas e (*) interferentes da matriz. Demais condições ver Tabela 18. Analitos: Azo (1), Dimo (2), Kreso (3), Fluo (4), Pico (5), Pira (6) e Tri (7).

Tabela 24: Recuperações para os pesticidas nas amostras de sopas infantis composta de frutas, após procedimento de extração por QuEChERs com ajuste de pH.

| Analitos | Recuperações (%) |
|----------|------------------|
| Azo | 94 ± 3 |
| Dimo | 95 ± 4 |
| Kreso | 85 ± 5 |
| Fluo | 92 ± 6 |
| Pico | 96 ± 4 |
| Pira | 80 ± 5 |
| Tri | n. i. |

n.i = analito não identificado.

O diagrama de fluxo (Figura 69) a seguir representa o processo de extração QuEChERs que foi estabelecido para as amostra de sopas de frutas e vegetais. Na etapa de limpeza todo o sobrenadante foi tratado, levado à secura e retomado para

ACN:tetraborato de sódio 45 mmol L⁻¹ 20:80% v/v, conseguindo uma pré-concentração de 10 vezes.

A determinação de Pira e Tri foi prejudicada nessas amostras por interferentes não identificados que têm tempo de migração muito próximos aos analitos e também absorvem em 210 nm. Para a Pira a absorbância em 270 nm pode ser utilizado como comprimento de onda alternativo para as medidas do analito nas amostras. O processo de limpeza com PSA e C-18 auxiliou na determinação de Pira nas amostras contendo vegetais e diminuiu a interferência nas amostra de fruta. Para o Tri as interferências não foram removidas durante o processo de extração e limpeza.

Para verificar a presença ou ausência desses pesticidas (Pira e Tri) nas amostras analisadas e também para testes de comparação entre métodos, um método de referência foi adaptado para medidas cromatográficas²⁸. Após ajuste das condições cromatográficas, a ordem de eluição dos pesticidas foi: Azo (3,57 min), Dimo (6,19 min), Fluo (6,63 min), Kreso (9,31 min), Pico (9,74 min), Pira (12,94 min) e Tri (15,18 min).

Na Figura 70 mostra um cromatograma de uma amostra de sopa de vegetais (medida realizada em 210 nm) após passar pelo procedimento de extração. Observou-se que um pico aparece com tempo de eluição de 14,17 min entre os analitos Pira e Tri, assim é possível confirmar a presença de um interferente e descartar a possibilidade da presença desses pesticidas nas amostras. As amostra de sopas de fruta também foram analisadas por cromatografia e mesma ordem de eluição foi observada, com o pico interferente com tempo de eluição de 14,17 min. Outro teste foi realizado com brancos das amostras, após passarem pelo procedimento de extração e limpeza. Os brancos foram enriquecidos com o pesticida Pira e analisados com medidas de fluorescência com excitação em 270 nm e emissão em 340 nm. O resultado confirma que o tempo de migração para a Pira nas amostras é em 12,94 min (ver Figura 71). O mesmo teste foi realizado para a Tri, porém com medidas em 210 nm que confirmaram seu tempo de migração em 15,18 min.

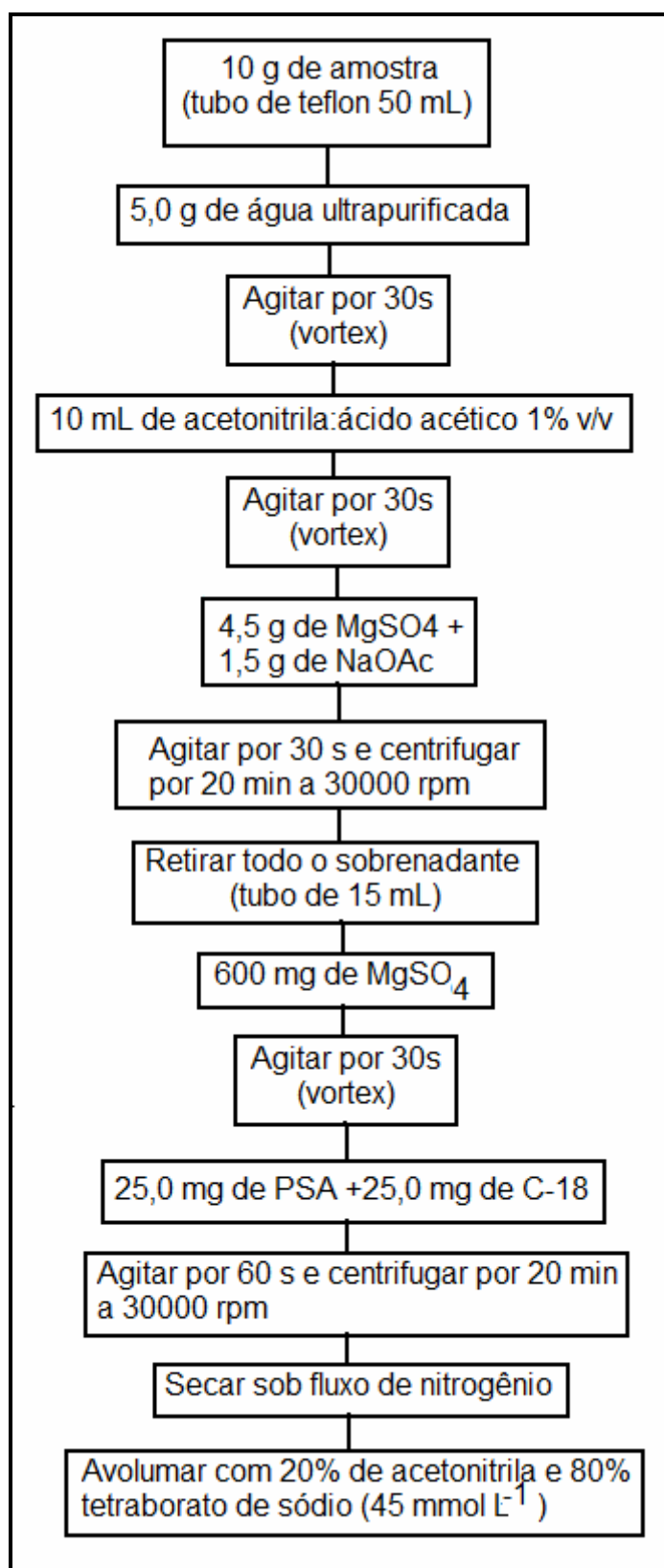


Figura 69: Diagrama para o procedimento de extração por QuEChERS que deve ser utilizado para extração de estrobilurinas em amostras de sopas prontas infantis.

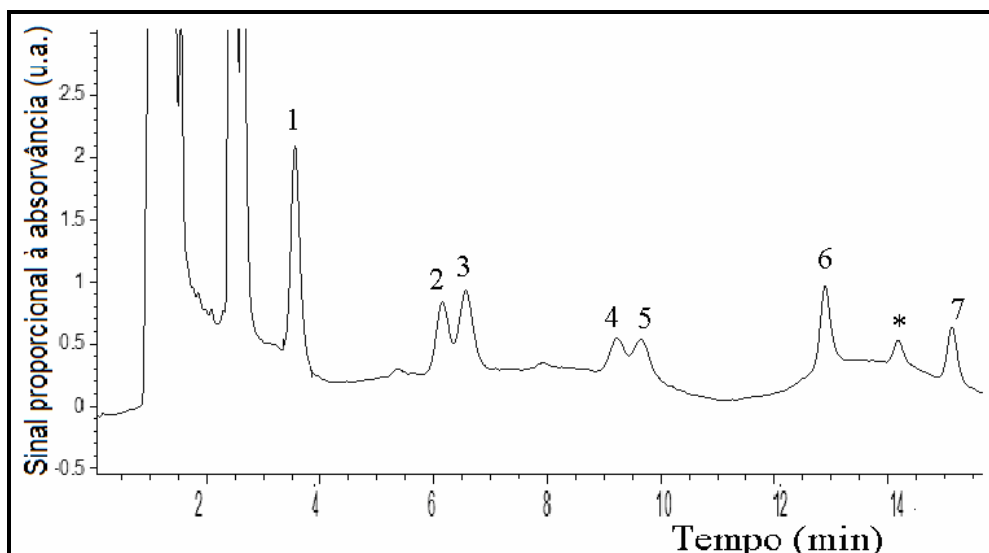


Figura 70: Cromatograma de uma amostra de sopa de vegetais após adição dos pesticidas e processo de extração e limpeza. (1) Azo, (2) Dimo, (3) Fluo, (4) Kreso, (5) Pico, (6) Pira (7) Tri e (*) interferente. Resultado medido em 210 nm.

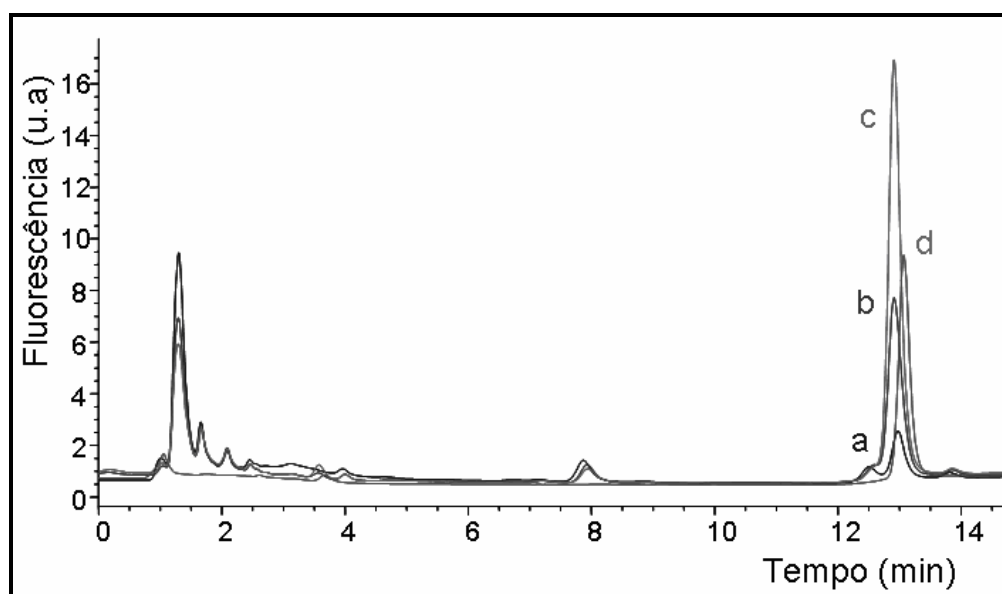


Figura 71 : Cromatograma de brancos referente a uma amostra de sopa vegetal com adições de diferentes concentrações de Pira: (a) $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (b) $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e (c) $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Pira (d) cromatograma de um solução padrão $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Análise por HPLC realizadas com o par 270/340 nm para excitação/emissão.

Para avaliar o grau de proximidade entre os resultados, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao utilizado como comparação (HPLC-

DAD), as análises foram efetuadas em replicatas autênticas, com seis extrações independentes de amostra de vegetais (para todos os pesticidas com exceção do Tri) e seis soluções aquosas para o analito Tri. As amostras foram enriquecidas com os pesticidas de modo que a concentração final, após procedimento de limpeza e pré-concentração (10 vezes), fosse igual a $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para ser analisada pelos dois métodos. As medidas para Pira foram realizadas por absorção em 270 nm em MEKC e em HPLC, os demais analitos foram medidos em 210 nm.

A comparação entre os métodos MEKC e HPLC foi feita aplicando-se o teste de hipótese, com comparação de médias. Curvas analíticas foram realizadas em ambos os métodos. Os resultados obtidos mostraram que não existe diferença significativa para o nível de 95% de confiança ($t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tabelado}} = 2,228$) para a amostra analisada pelos os dois métodos na determinação de todos os pesticidas. Os valores dos parâmetros estatísticos calculados estão na Tabela 25. Os valores de recuperações obtidas por MEKC variaram entre 83 e 96% para Kreso e Pira. Apesar do menor valor obtido para Kreso os resultados foram considerados satisfatórios para as amostras analisadas.

Tabela 25: Valores dos parâmetros obtidos após comparação de métodos.

| Pesticidas | Parâmetros | | |
|------------|----------------------|------------------|------------------|
| | Sp | t_{cal} | Recuperações (%) |
| AZO | $2,9 \times 10^{-7}$ | 0,478 | 90 ± 3 |
| DIMO | $1,1 \times 10^{-7}$ | 0,660 | 90 ± 3 |
| FLUO | $5,0 \times 10^{-8}$ | 1,73 | 92 ± 1 |
| KRESO | $7,6 \times 10^{-7}$ | 0,677 | 83 ± 3 |
| PICO | $1,7 \times 10^{-7}$ | 1,44 | 93 ± 5 |
| PIRA | $3,0 \times 10^{-7}$ | 0,854 | 96 ± 2 |
| TRI | $4,5 \times 10^{-7}$ | 0,678 | 92 ± 5 |

Graus de liberdade = 10.

5.5.

Incertezas

As incertezas para o método desenvolvido com os pesticidas foram calculadas considerando os componentes mais relevantes para os cálculos que estão expressos no diagrama de causa e efeito para as medições em CE/UV-vis (Figura 17). Com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza foram calculadas a incerteza combinada e a incerteza expandida, conforme cálculo apresentado na Equação 47 e Equação 49, respectivamente.

A Tabela 26 apresenta o resumo das incertezas calculadas para a concentração dos analitos em um nível intermediária das curvas analíticas.

Tabela 26: Valores das incertezas calculadas para os dois níveis de concentração estudados para os dois analitos.

| Fontes de variação | Incerteza ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | | | | | | |
|---|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Azo | Dimo | Kreso | Fluo | Pico | Pira | Tri |
| Preparo soluções | 0,089 | 0,089 | 0,089 | 0,089 | 0,089 | 0,089 | 0,089 |
| Repetibilidade | 0,22 | 0,16 | 0,19 | 0,16 | 0,19 | 0,082 | 0,36 |
| Precisão Intermediária | 0,15 | 0,087 | 0,089 | 0,18 | 0,22 | 0,052 | 0,12 |
| Curva analítica | 0,057 | 0,055 | 0,074 | 0,073 | 0,084 | 0,060 | 0,074 |
| Incerteza combinada | 0,29 | 0,21 | 0,43 | 0,27 | 0,32 | 0,15 | 0,39 |
| Incerteza expandida ($U_{k=2,01; 95\%}$) | 0,58 | 0,43 | 0,86 | 0,53 | 0,64 | 0,30 | 0,78 |

Nível: $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 72 são apresentadas as contribuições de cada componente de incerteza para cada analito no nível estudado. Considerando o valor da concentração, a maior fonte de incerteza para todos os analitos foram os componentes da precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária). As soluções foram preparadas por ajuste de volume, mas a contribuições da incerteza desse componente não foi expressivo para incerteza combinada, apenas para o analito Pira que teve os menores valores das componentes de incerteza o preparo das soluções foi mais relevante. As incertezas combinadas para o nível estudado

para cada analito representam: 7%, 5%, 7%, 6%, 7%, 3% e 8%, para, Azo, Dimo, Kreso, Fluo, Pico, Pira e Tri, respectivamente. Pode-se considerar satisfatórios os valores de incertezas obtidos para os analitos pelas medidas realizadas por MEKC com detecção na região do UV.

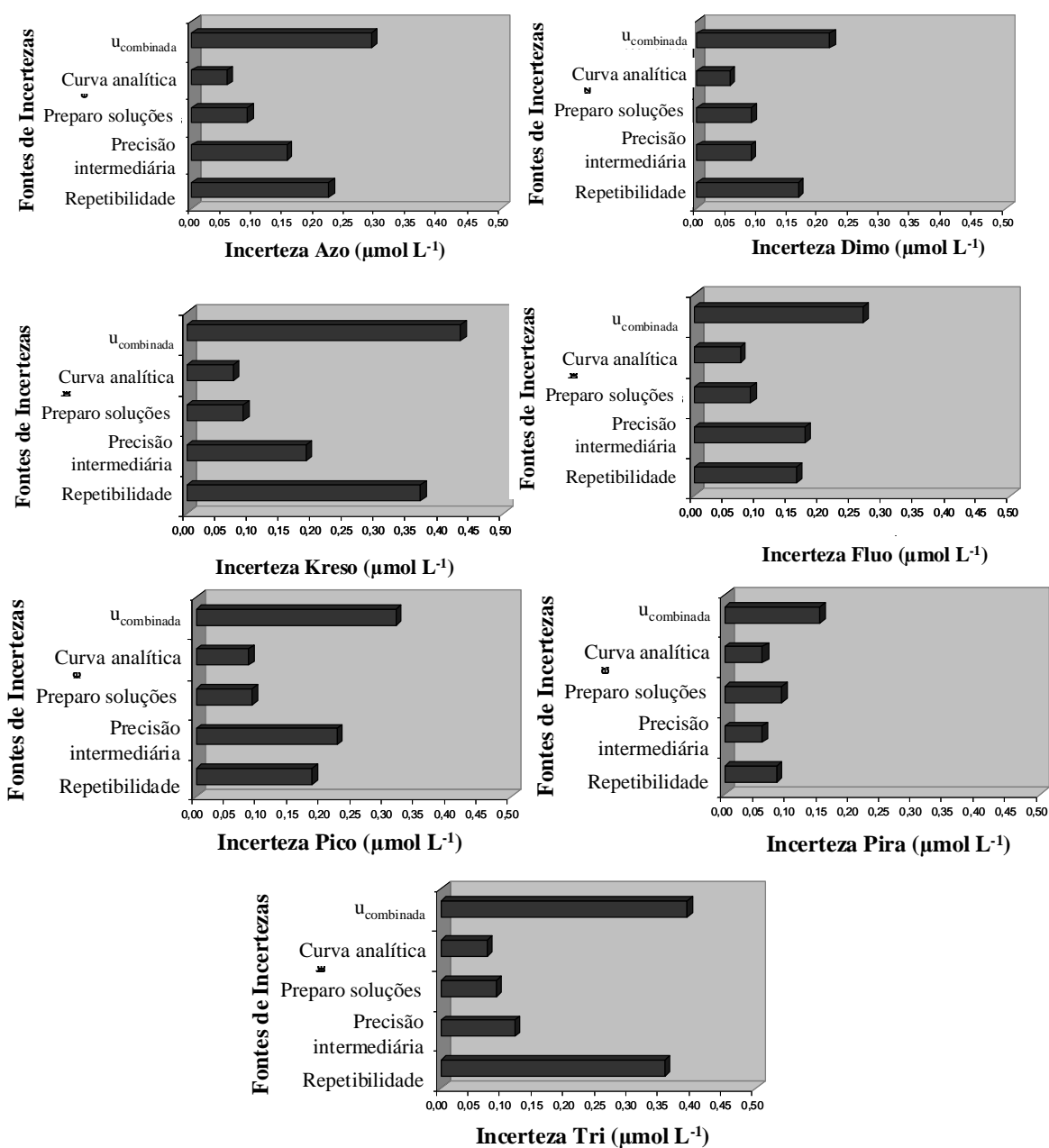


Figura 72: Gráfico de barras com as incertezas de cada componente nos níveis estudados.

6

Determinação de aminoglicosídeos por CE-LIF após interações com nanopartículas de CdTe modificadas com ácido tioglicólico

Neste capítulo, o potencial da técnica de eletroforese capilar com detecção de fotoluminescência induzida por laser foi avaliada para determinação de aminoglicosídeos após interação com nanopartículas de CdTe modificadas com ácido tioglicólico (TGA-CdTe). A variação de fotoluminescência em função da presença de canamicina (um aminoglicosídeo) dissolvida em dispersões coloidais de nanopartículas TGA-CdTe foi estudada recentemente por Khan¹⁸³ no LEEA-PUC-Rio. Em função da significativa amplificação de fluorescência, as condições experimentais foram ajustadas de modo a tirar vantagem desse efeito na determinação de canamicina, usando como sonda analítica uma dispersão aquosa de nanopartículas de TGA-CdTe.

No presente capítulo, apresentam-se estudos visando a adaptação da abordagem proposta por Khan na técnica de eletroforese capilar, com o objetivo de (i) avaliar a possibilidade de se observar esse mesmo efeito em condições de separação eletroforética, (ii) avaliar a possibilidade de alcançar a migração diferencial de diferentes sistemas aminoglicosídeos-nanopartículas de TGA-CdTe e (iii) avaliar o potencial do uso de uma sistema de excitação a laser para permitir a quantificação de canamicina pela fluorescência induzida no sistema canamicina-nanopartículas de TGA-CdTe.

6.1.

Características das nanopartículas de TGA-CdTe .

As nanopartículas TGA-CdTe utilizadas nesse trabalho foram sintetizadas e caracterizadas no laboratório¹⁸³. Os espectros de absorção e de fluorescência das nanopartículas de TGA-CdTe estão apresentados na Figura 73. Pode ser visto uma larga banda de absorção (características das nanopartículas semicondutoras de Cd) com máximo de absorção em aproximadamente 470 nm. O espectro de

fotoluminescência (banda de emissão com excitação em 410 nm), Figura 73 B, apresenta um máximo espectral em 518 nm com largura na meia altura (FWHM) de aproximadamente 35 nm. A intensidade de fotoluminescência e o valor de FWHM indicam que as nanopartículas apresentam uma razoável homogeneidade de tamanho e que seu tamanho é da ordem de alguns nanômetros, de fato, determinou-se esse tamanho médio em 2,1 nm (calculado) e 3,0 nm (por microscopia eletrônica de transmissão)¹⁸³.

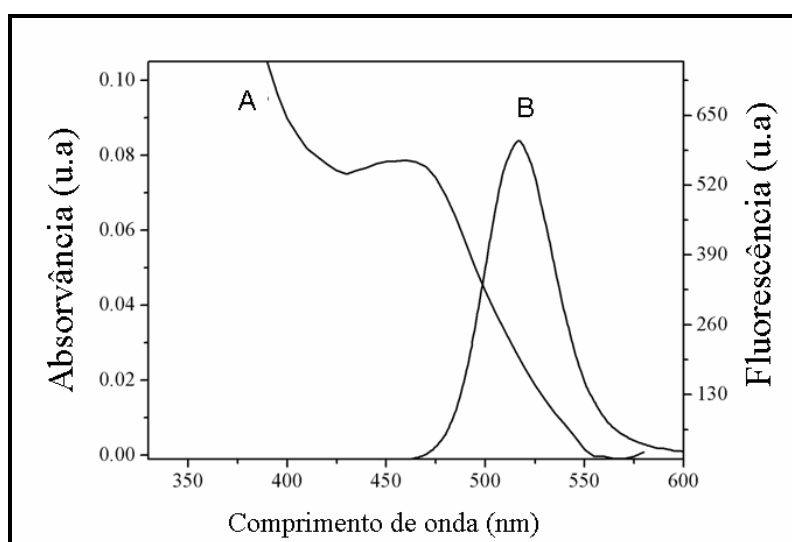


Figura 73: Espectros de absorção (A) e emissão de fotoluminescência (B) das nanopartículas TGA-CdTe.

A intensidade da fotoluminescência das nanopartículas TGA-CdTe foi significativamente maior após interações com aminoglicosídeos, como mostra a Figura 74. Nesse trabalho, verificou-se que a magnitude amplificada na presença de canamicina é estável por mais de 1 h sendo fortemente dependente do pH da dispersão aquosa, da concentração de nanopartículas dispersas em solução, da temperatura e do tamanho das nanopartículas¹⁸³.

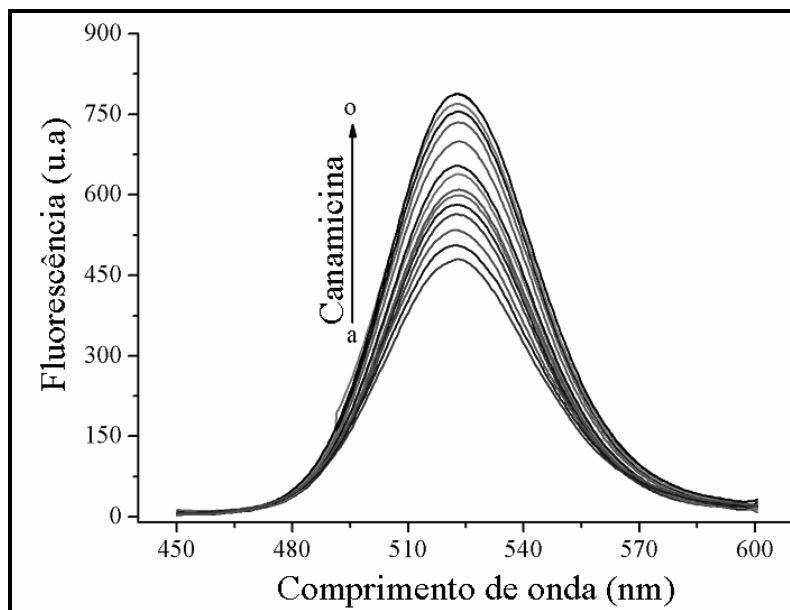


Figura 74: Espectros de fotoluminescência das nanopartículas de TGA-CdTe na presença de diferentes concentrações canamicina: (a) 0,0; (b) 1,7; (c) 3,3; (d) 5,0; (e) 6,7; (f) 8,0; (g) 11; (h) 15; (i) 32; (j) 48,0; (k) 65; (l) 82; (m) 98; (n) 132 e (o) $165 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Adaptado referência 183.

6.2.

Comportamento das nanopartículas de TGA-CdTe e interações com aminoglicosídeos em condições de eletroforese capilar.

Em CE, a detecção por fotoluminescência, pode se realizada diretamente ou indiretamente em função das características fluorescentes dos analitos e das sondas usadas para sua determinação. Quando as sondas são nanopartículas semicondutoras, a queda da intensidade de fotoluminescência é o fenômeno mais usual quando existe interação com moléculas químicas (especialmente aquelas com grupos retiradores de elétrons) em solução. Tal supressão de fotoluminescência é em geral do tipo dinâmico, onde não se forma uma ligação formal entre a molécula de analito e a nanopartícula. Pelo contrário, a interação é de contato, usualmente rápido, entre as duas partes. Nesses casos, a detecção do analito é feita indiretamente medindo a supressão de sinal com um modelo adequado (Stern-Volmer ou Langmuir). Quando adaptada em eletroforese capilar com detecção com laser, esse tipo de abordagem seria classificada de eletroforese capilar com detecção por supressão de fotoluminescência.

A interação entre canamicina e as nanopartículas de TGA-CdTe é do tipo estático, isto é, existe a formação de um complexo canamicina-TGA-CdTe cuja constante de ligação foi calculada por Khan como sendo $5,8 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$. Como consequência da interação, a fotoluminescência da sonda aumentou e a abordagem é a eletroforese capilar com detecção de fotoluminescência a, no caso, induzida por laser.

Os primeiros testes realizados na eletroforese capilar foram feitos apenas com as nanopartículas TGA-CdTe em solução, sem a presença dos aminoglicosídeos. A Figura 75 apresenta um estudo da variação da concentração do tampão tetraborato (pH 8,0) no tempo. O tampão tetraborato escolhido para os testes por causa do tamponamento na faixa de fluorescência intensa e estável das nanopartículas de TGA-CdTe (pH 8 e 9) e por ter capacidade tamponante em concentrações mais baixas (5 mmol L^{-1}), ou seja, contribuindo para manter baixa força iônica e fotoluminescência mais intensa das nanopartículas semicondutoras¹⁸⁴. Em meio com alta força iônica, os íons que adsorvem na superfície da nanopartícula podem atrapalhar a interação com o analito, no caso, os aminoglicosídeos. Adicionalmente, baixa concentração de tampão evita o alargamento das zonas pelo calor gerado pelo efeito Joule. Em contrapartida, a baixa força iônica pode aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar, causando alargamento e distorção das bandas e, causar distúrbios no fluxo eletroosmótico que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração.

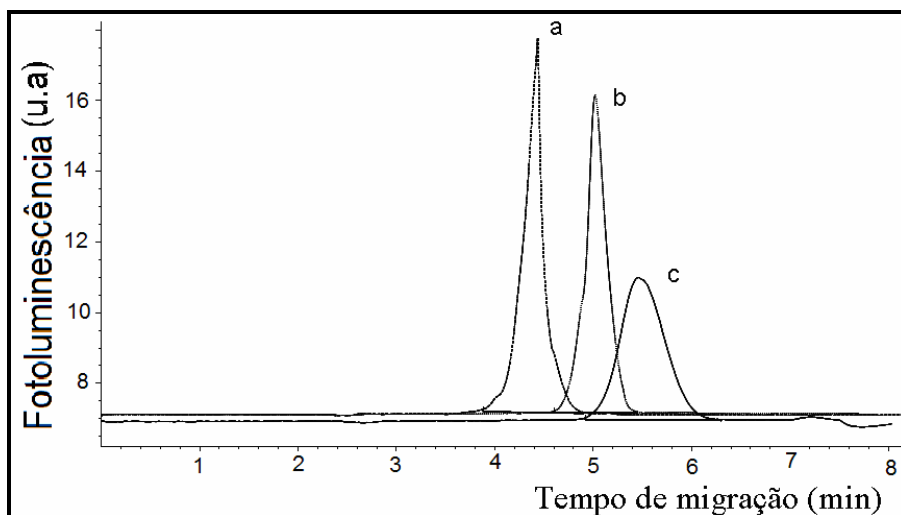


Figura 75: Eletroferogramas das nanopartículas após variações da concentração do tampão, (a) tampão borato $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, (b) 10 mmol L^{-1} e (c) 50 mmol L^{-1} em pH 8,0. Injeção de 30 s de $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, temperatura de 25°C , voltagem de 25 kV, capilar de $75 \mu\text{m d.i.}$

O resultado mostrou que a concentração do tampão para o eletrólito de corrida pode ser variado entre $5,0$ e 10 mmol L^{-1} sem efeito relevante na largura do pico e com aumento de tempo de migração de quase 1 min no meio com força iônica mais elevado. Na concentração mais elevada (50 mmol L^{-1}) o sinal da nanopartícula é significativamente reduzido, indicando um efeito de supressão, provavelmente por causa de atrações eletrostáticas que retiram elétrons das nanopartículas. A concentração de 10 mmol L^{-1} foi selecionada para o prosseguimento dos estudos.

Outro teste foi realizado para avaliar o efeito em se adicionar diferentes quantidades de nanopartículas de TGA-CdTe no capilar. Na Figura 76 são apresentados os eletroferogramas obtidos com diferentes tempos de injeção da dispersão de nanopartículas (Figura 76 B) e também a relação entre quantidade de nanopartícula introduzida no capilar (em termos do tempo de injeção) e a área dos picos (Figura 76 A). O resultado é uma relação linear com coeficiente de correlação maior que 0,99, o que indica a boa dispersão das nanopartículas de CdTe-TGA são monodispersas.¹⁸⁵ Vale notar um crescimento no tempo de migração dos picos em função da diminuição do TGA-CdTe na zona.

Nos eletroferogramas das nanopartículas livres, observamos que há apenas um único pico. As nanopartículas sintetizadas são monodispersas e ideais

para análises eletroforéticas com detecção direta de fotoluminescência, pois fornecem uma melhor resolução entre os picos relativos às interações analito-nanopartículas. Soluções contendo nanopartículas polidispersas irão resultar em eletroferogramas carregados de picos, não sendo favorável a detecções diretas.

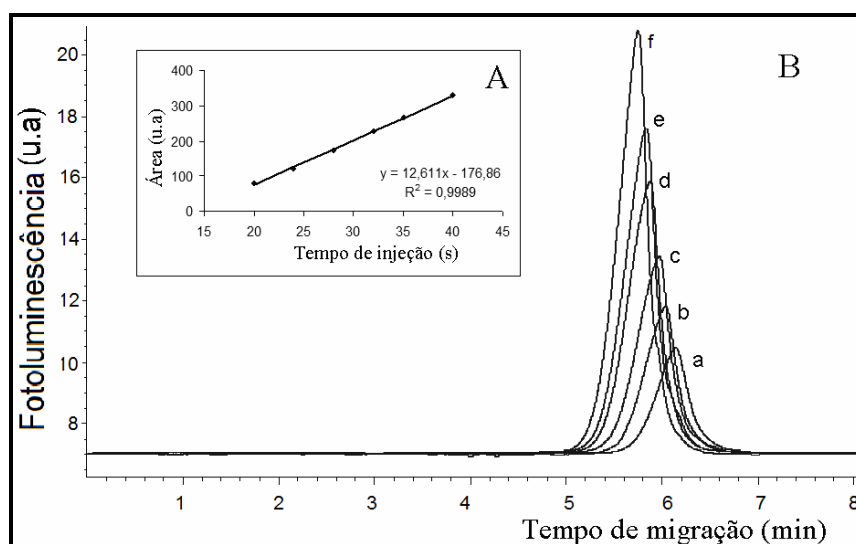


Figura 76: Eletroferogramas das nanopartículas após variações do tempo de injeção: (a) 20, (b) 24, (c) 28, (d) 32, (e) 35 e (f) 40 s. Concentração do tampão tetraborato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 8,0). Injeção de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$, diferença de potencial 25 kV, capilar de $75 \text{ }\mu\text{m d.i.}$

O tempo de 20 s para introdução de nanopartículas foi escolhido para se ter menor sinal de branco e, mesmo assim, quantidade relevante de TGA-CdTe para interação com os aminoglicosídeos. A temperatura dos testes foi sempre mantida em $20 \text{ }^\circ\text{C}$ para garantir a estabilidade das nanopartículas em solução. Temperaturas mais elevadas podem levar a agregação das nanopartículas alterando suas características físicas e químicas que resultam na diminuição de fotoluminescência.

A interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas pode ocorrer antes ou após a introdução no capilar. Testes foram realizados para verificar qual seria a melhor forma para promover a interação entre os aminoglicosídeos e as nanopartículas. Para esses testes foram selecionados dois aminoglicosídeos, a canamicina e a neomicina.

A interação entre aminoglicosídeos e nanopartículas antes da introdução no capilar foi avaliada adicionando os aminoglicosídeos (neomicina ou canamicina) a uma solução contendo as nanopartículas (tampão tetraborato 1,0 mmol L⁻¹ em pH 8,0). Os resultados apresentados na Figura 77 mostraram que a interação ocorre e permanece após introdução no capilar. Com adição de neomicina (Figura 77 b) ocorre claramente um ganho de sinal (maior área e intensidade de sinal), mas o tempo de migração do pico após a interação é muito próximo do pico relativo às nanopartículas livres (Figura 77 a). Por outro lado, no caso da canamicina, depois da adição desta, verifica-se apenas a alteração no tempo de migração do pico não sendo observado ganho de sinal. A mudança no tempo de migração indica que ocorre a formação de um sistema canamicina-nanopartículas de TGA-CdTe, porém as condições (concentração de nanopartículas e analito) utilizadas nesse teste não foram favoráveis ao ganho de sinal esperado, quando na presença de canamicina.

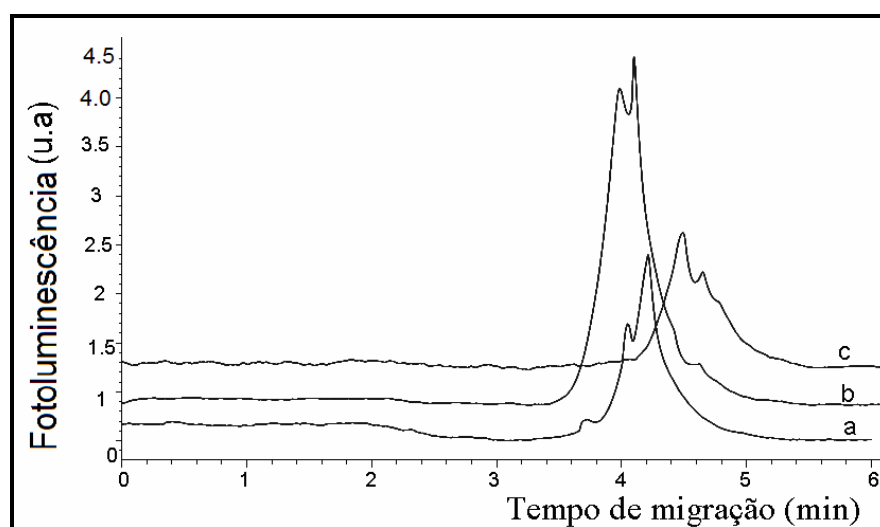


Figura 77: Eletroferogramas das dispersões de nanopartículas (a); nanopartículas misturadas previamente com neomicina (b); nanopartículas misturadas previamente com canamicina (c). Injeção de uma solução $6,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de nanopartículas. Neomicina e canamicina na concentração $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ na dispersão contendo nanopartículas. Eletrólito tampão tetraborato 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0; 20 °C; 25 kV; capilar de 75 μ m d.i. e tempo de injeção de 20 s com pressão de 50 mbar.

O aumento de fluorescência das nanopartículas na presença de aminoglicosídeos pode ser resultado da produção de um novo e eficiente processo

radiativo devido à adsorção dos aminoglicosídeos ou devido à estabilização da superfície que minimiza os processos não-radiantes. A estabilização minimiza o movimento dos constituintes da superfície aumentando a eficiência da emissão das nanopartículas.

A injeção separada da dispersão de TGA-CdTe e de solução dos aminoglicosídeos foi feita para se avaliar a interação das espécies no capilar. Como as nanopartículas estão carregadas negativamente em pH 8,0, elas têm velocidade de migração menor e contrária ao fluxo eletroosmótico, ao contrário dos aminoglicosídeos que migram na direção do fluxo eletroosmótico, nas condições aplicadas (potencial positivo). Portanto, a interação entre essas espécies ocorreu depois de aplicada a diferença de potencial que permitiu a mistura dos componentes dentro do capilar. Na Figura 78 se apresenta um esquema da interação dos aminoglicosídeos e as nanopartículas de TGA-CdTe no capilar.

Primeiro uma solução contendo as nanopartículas, preparada em tampão tetraborato (pH 8,0; 1,0 mmol L⁻¹) foi introduzida no capilar (preenchido com o eletrólito) por 20 s. Em seguida, foi realizada a introdução de uma solução aquosa contendo os analitos no capilar (diluição em água ultrapurificada) no capilar preenchido com tampão (Figura 78 A). Em seguida, aplicou-se uma diferença de potencial de 25 kV com temperatura de 20 °C (Figura 78 B). Antes de cada análise com a presença de analitos foi feita uma análise mantendo as mesmas condições, porém, foi introduzido no capilar apenas nanopartículas e água ultrapura (controle). Na Figura 79 são mostrados os resultados obtidos para canamicina (b) e neomicina (c) após interações com as nanopartículas de TGA-CdTe no capilar. Os eletroferogramas mostram claramente que ocorreu a interação analito-nanopartículas na presença de ambos aminoglicosídeos.



Figura 78: Representação esquemática do procedimento de interação no capilar entre aminoglicosídeos (representado pelas cargas positivas) e nanopartículas TGA-CdTe (representado pelas cargas negativas). (A) injeção e (B) aplicação pontencial. EOF: fluxo eletroosmótico.

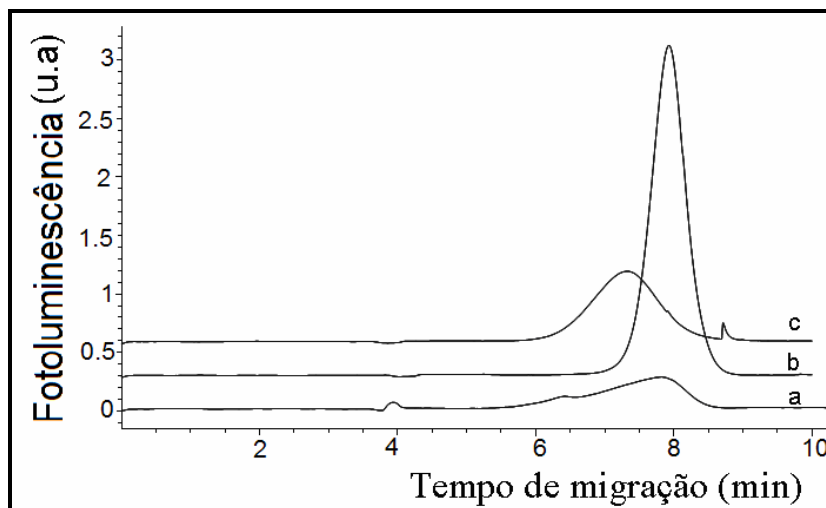


Figura 79: Eletroferogramas após interação dos aminoglicosídeos e nanopartículas no capilar. (a) controle; (b) após introdução de canamicina e (c) após a introdução de neomicina. Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, por 20 s seguida da introdução de neomicina ou canamicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo tempo de 20 s. Tampão 10 mmol L^{-1} em pH 8,0. Temperatura de 20°C , voltagem de 25 kV, capilar de $75 \mu\text{m d.i}$

Comparando as duas possibilidades de interação entre analito e nanopartículas, a abordagem de introdução separadas dos componentes com mistura no capilar mostrou ser mais eficiente, principalmente para a canamicina, pois ocorreu alteração no tempo de migração e ganho de sinal quando comparado com a mistura previa entre analito e nanopartículas (ver Figura 77). Nesse processo de interação também existe a vantagem de uma única solução de nanopartículas poder ser utilizada em várias análises, reduzindo o consumo da dispersão de nanopartículas, que por serem de cádmio, deve ter seus resíduos descartados apropriadamente. O método de interação no capilar foi escolhido para dar continuidade ao desenvolvimento do trabalho.

Outro parâmetro importante a ser avaliado é o pH, pois a concentração hidrogeniônica da solução aquosa das nanopartículas influencia nas interações entre analito e nanopartículas, além de afetar a agregação das nanopartículas e,

portanto sua estabilidade¹⁸⁶. Para as nanopartículas recobertas com moléculas estabilizadoras, nesse caso TGA, o pH ácido protona os grupo tiolato, devendo portanto ser evitado para não remover o ligante (que estabiliza as nanopartículas em meio aquoso) da superfície das nanopartículas. A fotoluminescência nesse caso terá menor intensidade, podendo ser extinta em valores abaixo de pH 5,0. Por outro lado, em meio básico (entre 7,0 e 9,0), a intensidade da fotoluminescência das nanopartículas pode ser amplificada, pois o grupo carboxílico da molécula estabilizadora estará desprotonado resultando em uma densidade homogênea de cargas negativas favoráveis à dispersão das nanopartículas.¹⁸⁷ Em meio básico com pH acima de 10,0 a fluorescência das nanopartículas tende a diminuir devido à formação de hidróxido de cádmio em sua superfície. O pH da solução tampão utilizada em eletroforese capilar é um parâmetro muito importante para a otimização das condições de separação e quantificação dos analitos, pois também tem influência na intensidade do fluxo eletroosmótico.

Na Figura 80 é apresentado o resultado do estudo da variação de pH (entre 8,0 e 9,0) do eletrólito de corrida e da solução contendo as nanopartículas em função da presença de neomicina na solução. O valor ideal do pH para a interação foi avaliado pelo aumento de sinal calculado pela razão da área do pico após introdução de analito (A) pela área do pico sem a presença do analito (A_0). Apenas a neomicina foi utilizada nesse teste.

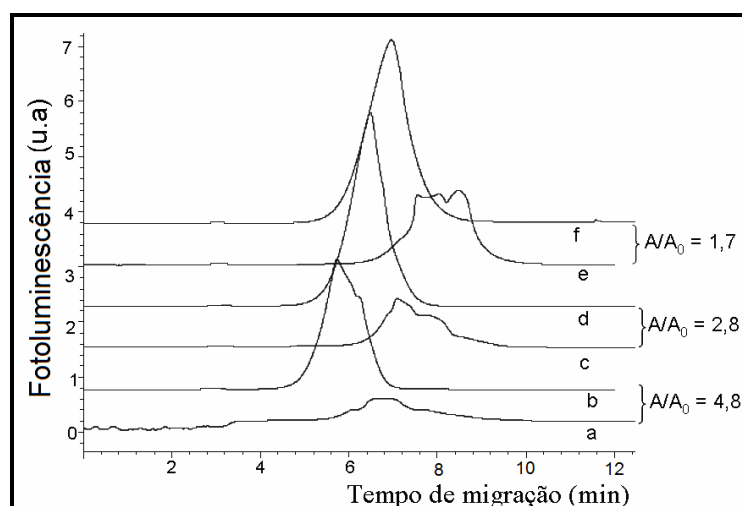


Figura 80: Influência do pH na interação entre neomicina-nanopartículas. Os eletroferogramas (a) sinal da solução controle e (b) solução de neomicina ambos em pH 8,0. Em (c) sinal da solução controle e (d) solução de neomicina ambos em

pH 8,5. Em (e) sinal da solução controle e (f) solução de neomicina ambos em pH 9,0. Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, por 20 s seguida da introdução de neomicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo tempo de 20 s, 20 °C, 25 kV e capilar de 75 μm d.i.

A dependência do sinal em função do pH é comprovado pelas razões que variaram de 4,8 em pH 8,0, para 1,7 em pH 9,0. Esse resultado demonstra a influência da interação eletrostática entre nanopartículas e aminoglicosídeos.

Em meio alcalino, com pH abaixo de 9,0, o grupo carboxílico do ligante (TGA) na superfície das nanopartículas está desprotonado e o grupo amina primária dos aminoglicosídeos (pK_a 9,4) está protonado. Portanto, a adsorção máxima será alcançada quando, em solução, a maior fração de nanopartículas estiver carregada com o grupo COO^- recobrando sua superfície e aminoglicosídeos com o grupo NH_3^+ . A forte atração eletrostática entre esses grupos resulta em uma forte adsorção e conseqüentemente em aumento de sinal fluorescente. Outra consideração importante é que as nanopartículas de CdTe são modificadas com TGA, mas ainda pode existir alguns sítios na sua superfície e a ligação com outros ligantes podem ocorrer nos locais com carga catiônica devido à presença de íons de cádmio. Portanto, a adsorção dos aminoglicosídeos pode ser resultado da ligação do grupo amina primária (uma fração de grupos amina não protonada pode existir em pH próximo de 8,0) com os íons Cd^{2+} presentes na superfície e formar a ligação N-Cd, minimizando os processos não radiativos e aumentando a luminescência.

As condições escolhidas para os testes com outros aminoglicosídeos e para avaliar o potencial quantitativo da abordagem na determinação de canamicina e de neomicina são indicadas na Tabela 27.

Tabela 27: Condições de análise para aminoglicosídeos-TGA-CdTe.

| Condições de análise | Condições estabelecidas |
|---|---|
| Capilar | 60 cm x 75 µm d.i. |
| Temperatura | 25°C |
| Diferença de potencial | 25 kV |
| Laser | 410 nm |
| Concentração do tampão (pH 8,0) | 10 mmol L ⁻¹ |
| Tempo de injeção nanopartículas e analitos | 20 s |
| Solução nanopartículas | Tampão tetraborato 1 mmol L ⁻¹ (pH 8,0) |

6.3.

Interação entre os demais aminoglicosídeos e as nanopartículas TGA-CdTe

As condições ajustadas (Tabela 27) foram mantidas constantes nos testes com os demais aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina, ampicilina e tobramicina). Na Figura 81 estão os eletroferogramas de diferentes aminoglicosídeos após interação com as nanopartículas TGA-CdTe no capilar. O aumento da intensidade de fotoluminescência das nanopartículas é observado após interação com todos os aminoglicosídeos avaliados. Esse resultado era esperado já que estes aminoglicosídeos têm estrutura química semelhantes, porém o ganho de sinal foi diferente para mesmas quantidades de diferentes aminoglicosídeos. Os tempos de migração ficaram muito próximos uns dos outros indicando certa dificuldade para obter a separação desses complexos aminoglicosídeos-nanopartículas de TGA-CdTe nas condições ajustadas.

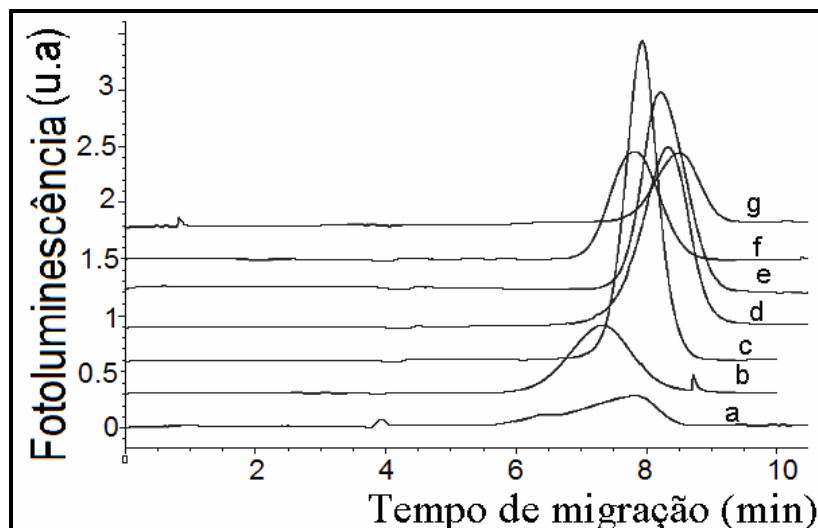


Figura 81: Eletroferogramas das nanopartículas após interação com os diferentes aminoglicosídeos, (a) branco; (b) neomicina; (c) canamicina; (d) tobramicina; (e) amicacina; (f) gentamicina e (g) estreptomicina. Eletrólito de trabalho: tampão tetraborato (10 mmol L^{-1} , pH 8,0). Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas, por 20 s seguida da introdução dos aminoglicosídeos na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por 20s. Temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$, diferença de potencial de 25 kV, capilar de $75 \text{ }\mu\text{m d.i.}$

Ao se comparar os valores das constantes de ligação entre os aminoglicosídeos e as nanopartículas de TGA-CdTe, calculada por Khan¹⁸³ a partir das isothermas de Langmuir (Tabela 28) verifica-se uma clara relação direta com a intensidade de fotoluminescência.

Tabela 28: Constantes de ligação entre os aminoglicosídeos e as nanopartículas de TGA-CdTe (adaptada de Khan¹⁸³).

| Aminoglicosídeos | Faixa linear normalizada (x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) | Constante de ligação (B) (x 10 ⁷ L mol ⁻¹) |
|------------------|---|--|
| Canamicina | 0,28 – 8,2 | 5,65 |
| Neomicina | 0,16 – 1,6 | 27,8 |
| Estreptomicina | 0,33 – 9,8 | 0,06 |
| Gentamicina | 0,31 – 9,1 | 5,8 |
| Amicacina | 0,30 – 9,8 | 5,45 |
| Tobramicina | 0,16 – 2,3 | 13,3 |

O resultado mostrou que a constante de equilíbrio da ligação é maior para neomicina com valor de $2,7 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1}$ (6 grupos de aminas primárias), e menor para estreptomicina com $6,0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (2 grupos de aminas primárias). Sugere-se que o aumento da fotoluminescência está relacionado com as múltiplas aminas primárias distribuídas entre os aminoaçúcares e aminociclitol nas moléculas dos aminoglicosídeos. Porém na presença de neomicina a saturação da superfície das nanopartículas ocorre mais rapidamente. Pelos eletroferogramas, é observado menor intensidade do sinal para neomicina (Figura 81 eletroferograma b) quando comparado ao sinal da canamicina (Figura 81 eletroferograma c), o que mostra que a quantidade de neomicina introduzida no capilar já é suficiente para que ocorra a saturação da superfície das nanopartículas. Por outro lado, a respsota analítica é mais sensível para neomicina, pois uma menor quantidade de moléculas é suficiente para passivar a superfície das nanopartículas TGA-CdTe.

A baixa intensidade do pico obtido para estreptomicina (Figura 81 eletroferograma g) se deve ao fato de sua constante de ligação ser menor, assim mais moléculas de estreptomicina são necessárias para ativar a superfície das nanopartículas e induzir o aumento de sinal.

Uma observação importante é em relação às mudanças nos tempos de migração após as interações das nanopartículas com diferentes aminoglicosídeos. A maior variação no tempo de migração é entre a presença de neomicina e

estreptomicina, essa variação pode estar relacionada com as diferentes quantidades de amins primárias dessas moléculas. As separações eletroforéticas ocorrem pelas diferenças nas mobilidades das espécies carregadas. Considerando inicialmente que após as interações não houve alterações significativas no raio das nanopartículas, pode-se dizer que as diferenças nos tempos de migração estão relacionadas com as variações da carga das espécies aminoglicosídeos-nanopartículas. O tempo de migração para neomicina é menor em relação aos demais aminoglicosídeos, mesmo após forte interação (maior constante de ligação), pois maior quantidade de grupos amins primárias carregadas positivamente estão presentes, conferindo à banda de analito-nanopartículas maior carga positiva e conseqüentemente menor tempo de migração (EOF normal – direção catodo). Para a estreptomicina, que tem menor quantidade de grupos amina primárias, menor carga positiva estará presente na banda analito-nanopartículas e assim seu tempo de migração será maior, podendo nesse caso ocorrer maior concentração de carga negativa pela presença de nanopartículas livres. Para os demais aminoglicosídeos, com 4 e 5 grupos amins primárias, os tempos de migração ficaram próximos e intermediários aos tempos obtidos com neomicina e estreptomicina, o que indica uma menor carga líquida positiva (em relação a neomicina) ou que a banda de analito-nanopartículas nesse caso pode ser neutra.

Como verificado, o tampão borato não foi capaz de promover a separação da zona das nanopartículas livres das conjugadas com os aminoglicosídeos. A interação pode ser observada pelo aumento do sinal fluorescente do pico relativo as nanopartículas livres. A dificuldade dessa separação utilizando o modo CZE pode ser explicada considerando que os aminoglicosídeos após interação com as nanopartículas contribuíram muito pouco para alterar a razão massa-carga do sistema aminoglicosídeo-nanopartículas deTGA-CdTe em relação ao das nanopartículas livres. Assim, o comportamento eletroforético entre nanopartículas livres e conjugadas não foi muito diferente. O tampão fosfato, em pH 8,0 também foi avaliado mas sem sucesso com a separação.

Para tentar promover a separação entre as nanopartículas livres e as conjugadas, foi tentado o método MEKC. Nesse caso, SDS foi adicionado ao eletrólito de trabalho em concentração acima de sua concentração micelar crítica, 10 mmol L^{-1} . O resultado obtido, apresentado na Figura 82, mostra que o SDS

atrapalha na interação entre nanopartículas TGA-CdTe e canamicina. O aumento de sinal não foi observado, a interação entre canamicina e SDS provavelmente foi maior do que a atração analito-nanopartículas. A adição de SDS (concentração final de 10 mmol L^{-1}) na solução de nanopartículas livres foi verificada também em medições no espectrofluorímetro, que confirmaram que o surfactante aniônico impediu a interação entre nanopartículas e aminoglicosídeos, porém, a presença do SDS não diminuiu a fotoluminescência característica das nanopartículas de TGA-CdTe.

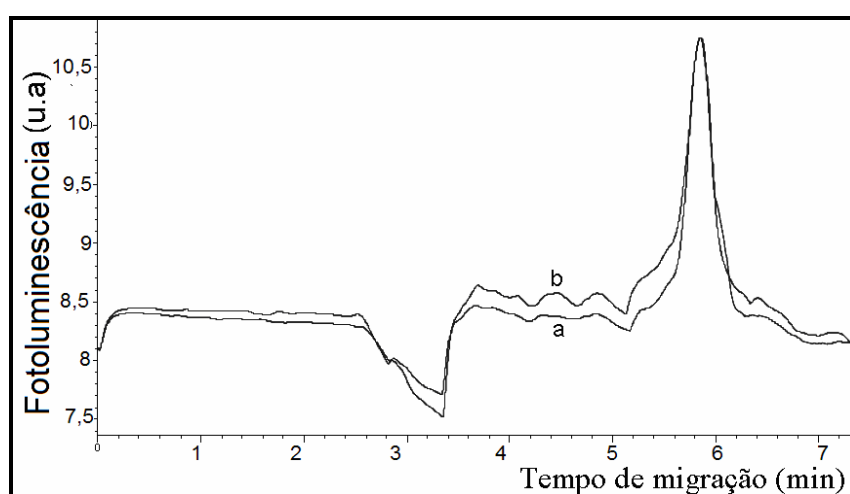


Figura 82: Eletroferograma após adição de SDS no eletrólito de corrida. Introdução de uma solução $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas: (a) branco, por 20 s e (b) introdução de canamicina na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pelo tempo de 20 s. Demais condições Tabela 27.

Apesar de a separação entre nanopartículas livres das conjugadas com os aminoglicosídeos não ter sido obtida nas condições estabelecidas, testes para avaliar o potencial quantitativo da abordagem foram feitos por meio da determinação de alguns parâmetros de mérito (repetitividade, precisão intermediária, linearidade e limite de detecção e quantificação) para canamicina e neomicina.

6.4.

Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito do método foram estabelecidos considerando o sinal de fluorescência da solução controle (introdução de nanopartículas sem a presença dos aminoglicosídeos), de modo a se avaliar o desempenho para os aminoglicosídeos neomicina e canamicina.

6.4.1.

Resposta linear

As curvas analíticas, para canamicina e neomicina, foram construídas introduzindo no capilar uma concentração fixa de nanopartículas ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) por um tempo de 20 s. A concentração de nanopartículas utilizadas para a construção da curva analítica foi menor do que nos testes anteriores para melhorar a sensibilidade do método. Diferentes concentrações de canamicina, entre $1,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, foram introduzidas no capilar por um tempo de 20 s. As curvas analíticas foram obtidas construindo o gráfico das áreas dos picos em função das concentrações das soluções. Vale lembrar que foi considerada a área da solução do branco (introdução de uma solução $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de nanopartículas seguida de água ultrapura por 20 s) na determinação do sinal líquido. Para neomicina, o mesmo procedimento foi utilizado, porém a faixa de concentração ficou entre $3,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Na Figura 83 (A e B) são mostradas a curva analítica e o gráfico de resíduo para canamicina e a Figura 84 (C e D) a curva analítica e o gráfico de resíduo para neomicina. Na Tabela 29 estão os valores dos parâmetros das curvas analíticas para canamicina e neomicina. Os eletroferogramas para a curva analítica de canamicina e neomicina são mostrados nas Figura 85 e 86, respectivamente.

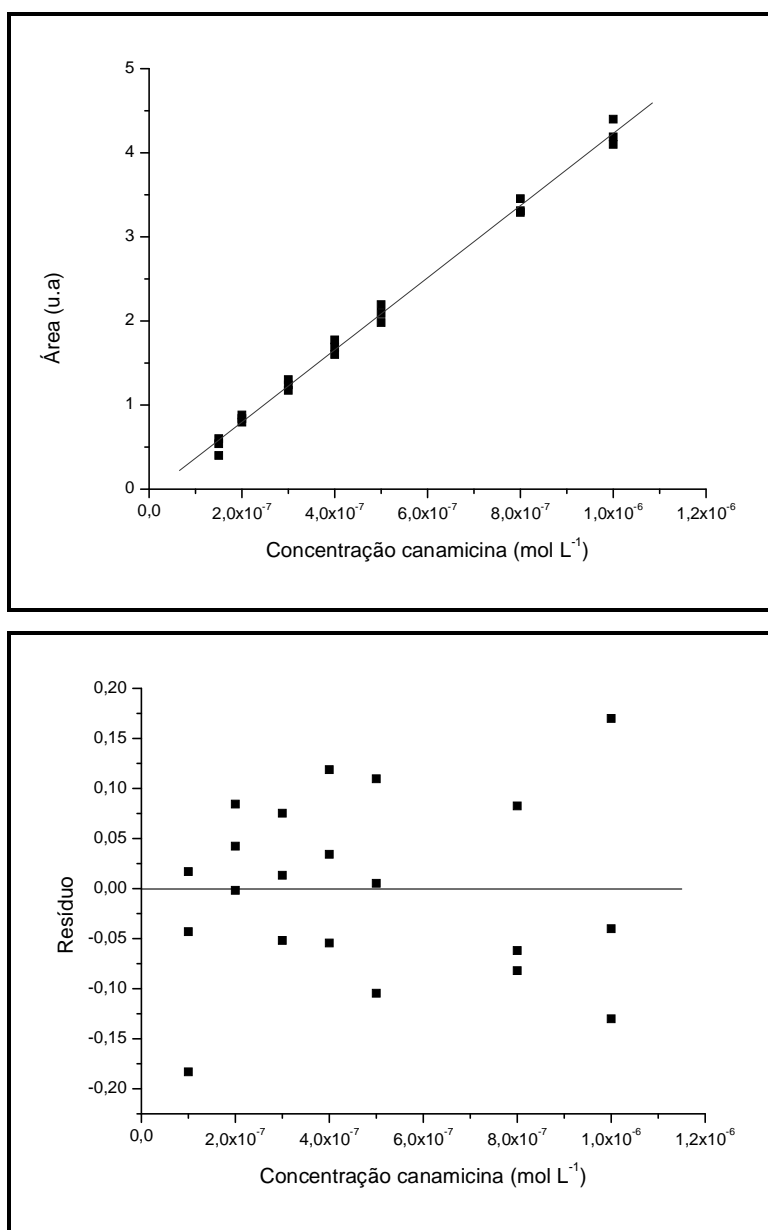


Figura 83: Curva analítica e gráfico de resíduos para canamicina.

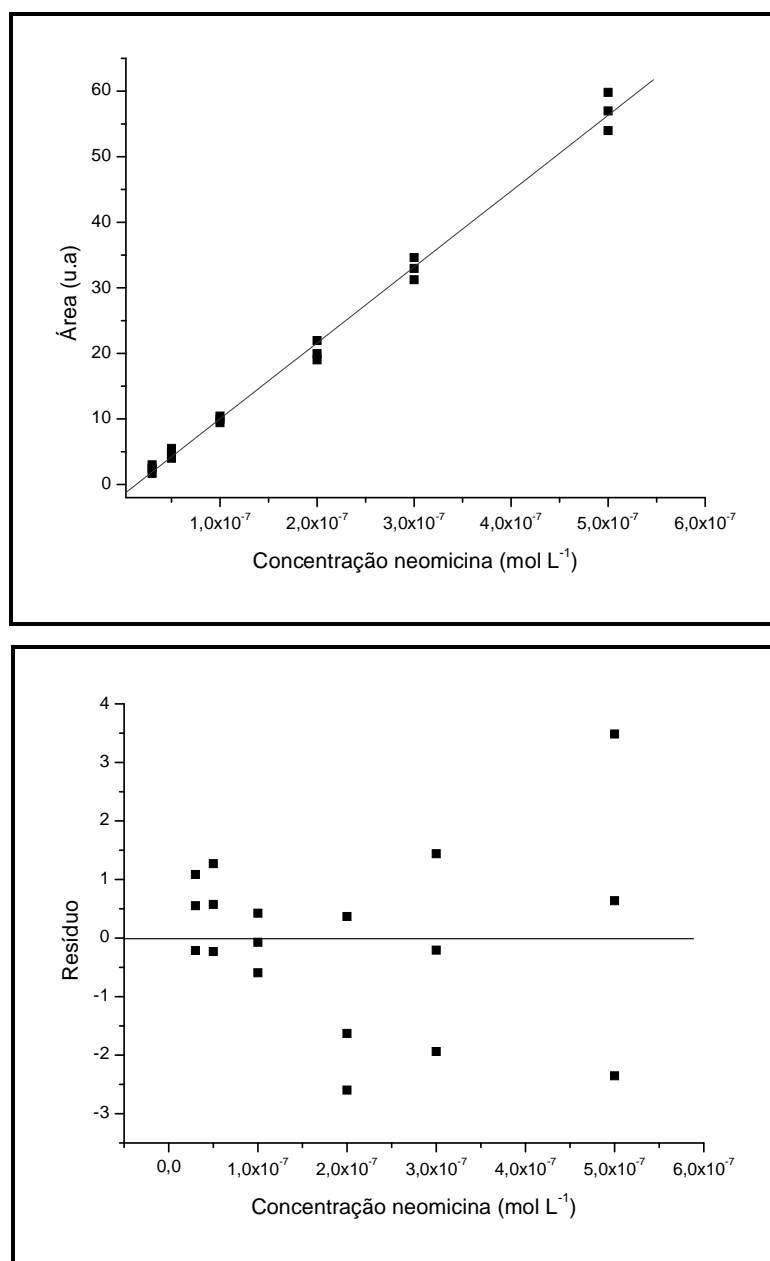


Figura 84: Curva analítica e gráfico de resíduo para neomicina.

Tabela 29: Parâmetros das curvas analíticas para canamicina e neomicina.

| Parâmetros | Canamicina | Neomicina |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Coefficiente angular | $(4,29 \pm 0,68) \times 10^6$ | $(1,16 \pm 0,02) \times 10^8$ |
| Coefficiente linear | $0,060 \pm 0,038$ | $-1,56 \pm 0,56$ |
| R^2 | 0,995 | 0,994 |
| r | 0,998 | 0,997 |
| F_{cal} | 3925 | 2763 |
| t_{cal} | 62,6 | 52,5 |
| p_{cal} | $1,76 \times 10^{-23}$ | $2,38 \times 10^{-19}$ |

$F_{crítico} = 4,381$ e $t_{crítico} = 2,45$ para canamicina.

$F_{crítico} = 4,494$ e $t_{crítico} = 2,57$ para neomicina.

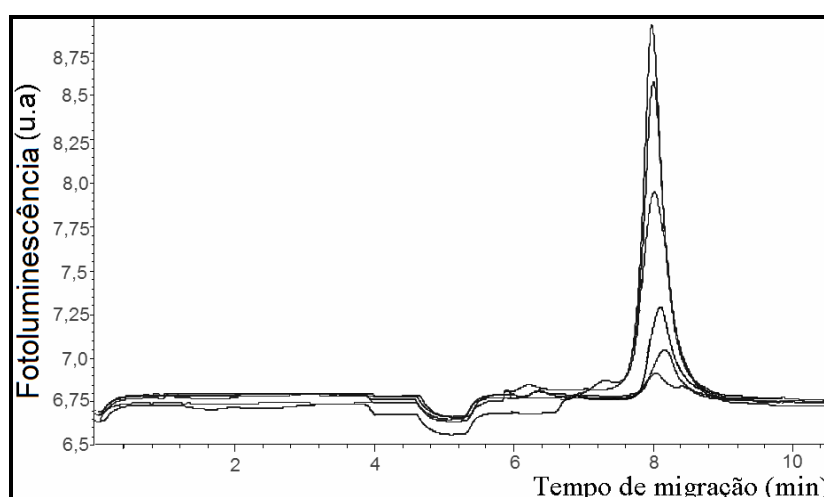


Figura 85: Eletroferogramas de uma curva analítica para canamicina.

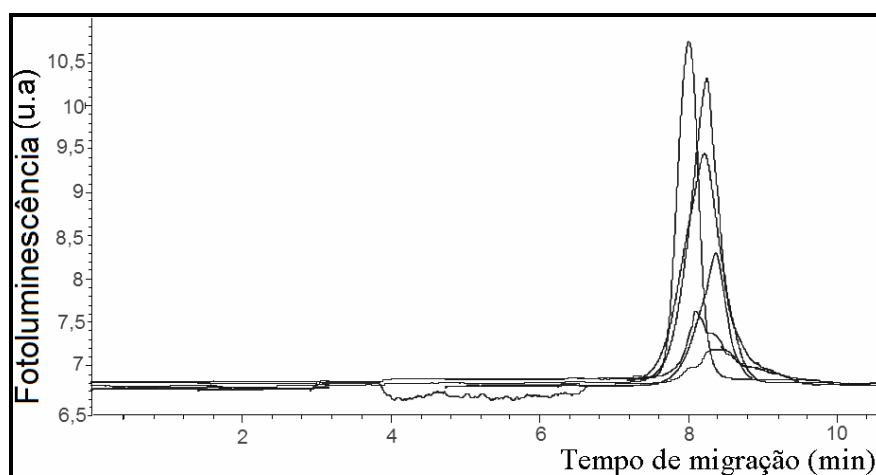


Figura 86: Eletroferogramas de uma curva analítica para neomicina.

O comportamento linear foi indicado, para os dois analitos, pelos valores de coeficientes de correlação (r), de determinação (R^2), superiores a 0,99. Os desvios padrão dos coeficientes lineares indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenada está muito próxima do valor zero, indicando ausência de erro sistemático. Já os desvios padrão dos coeficientes angulares representam a boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições. No caso dos gráficos de resíduos, o padrão de distribuição aponta a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta, confirmando a escolha pelo comportamento linear.

A adequação do modelo para canamicina e neomicina também foram avaliadas pelos testes F e t de student, assim como pelos valores de p. A Tabela 29 apresenta também os valores obtidos para F, t e p. Como o valor calculado de F foi muito superior ao valor crítico, para ambos analitos, podemos dizer que o modelo linear é estatisticamente válido. O teste t de Student trata como hipótese nula (H_0) a suposição de que a área do pico e a concentração de analito não se relacionam linearmente. Em um nível de significância de 5%, o valor calculado de t comprovaria ou rejeitaria esta hipótese. Como mostrado na Tabela 29, os valores de t calculados são bastante superiores ao valor crítico, sendo a hipótese nula rejeitada, resultando em um modelo que relaciona linearmente intensidade de sinal e concentração. Os valores de p são menores do valor de α (significância) para o qual rejeitamos a hipótese nula para ambos os casos. Se $\alpha=0,05$, então, para um valor $p \geq 0,05$ não se rejeita H_0 , caso contrário, rejeita-se H_0 . No caso deste estudo, $p < 0,05$. Assim, temos que, ao nível de 5% de significância, rejeita-se H_0 , resultando em um modelo que relaciona linearmente a área do pico com a concentração do analito. A partir dos diversos testes estatísticos, pôde-se concluir que o método apresenta resposta linear tanto para canamicina quanto para neomicina.

6.4.2.

Limite de detecção de limite de quantificação

Nesse trabalho, o critério utilizado para calcular o LOD, foi através de medições realizadas com a solução controle para determinar os valores de s_b . O

cálculo foi realizado utilizando a Equação 33. Para o LOQ o cálculo foi semelhante utilizando a Equação 35. A tabela a seguir apresenta os valores de LOD e LOQ obtidos para o método. Os valores calculados utilizando o critério $x_b + ns_b$ ($n = 3$ ou $n = 10$) expressam melhor os valores para os limites de detecção e quantificação para esses analitos com a abordagem usada, pois considera a magnitude do sinal de branco.

Tabela 30: LOD e LOQ para canamicina e neomicina

| Parâmetro | Analitos | |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | Canamicina (mol L^{-1}) | Neomicina (mol L^{-1}) |
| LOD ($x + 3s_b$) | $3,8 \times 10^{-8}$ | $1,0 \times 10^{-8}$ |
| LOQ ($x + 10s_b$) | $1,2 \times 10^{-7}$ | $3,0 \times 10^{-8}$ |

6.4.3.

Precisão

A repetibilidade para canamicina e neomicina foi calculada pelo desvio padrão relativo (RSD), para o tempo de migração dos picos, referentes ao aumento de sinal na presença dos analitos, e para as respectivas áreas, após a interação no capilar. Foram realizadas sete medições pela introdução, nas condições estabelecidas, de uma solução contendo nanopartículas e analitos (canamicina ou neomicina).

Neste trabalho foi calculada a precisão intermediária, as medidas foram avaliadas em diferentes dias para um nível de concentração. Uma vez escolhida a fonte de variação, as estimativas das variâncias (no mesmo dia e entre os dias) foram obtidas através da análise de variância (ANOVA). A precisão intermediária é calculada pelo desvio padrão relativo (RSD) com os valores de MQ_{entre} (entre dias).

A repetibilidade do tempo de migração para canamicina e neomicina foi de 2,53 e 0,86% (Tabela 31), esses valores são muitos bons para a técnica de

eletroforese e também para o procedimento de interação. Os resultados obtidos para a precisão intermediária dos tempos de migração (Tabela 31) mostraram que as variações ficaram muito próximas para os dois analitos (aproximadamente 3,4%). Para as áreas, a repetibilidade apresentou também ótimos valores para o método, 3,78% para canamicina e 1,77% para neomicina. Já os valores encontrados para precisão intermediária das áreas foram um pouco maiores, mas ainda satisfatórios para o método, 7,45% e 5,01% para canamicina e neomicina, respectivamente.

O teste F baseado no princípio da ANOVA foi aplicado comparando tanto o tempo de migração quanto as áreas dos picos (Tabela 31). Todos os valores de F_{cal} foram menores que o valor de $F_{critico}$ (4,71). Por esses resultados poderia-se dizer que não existe diferença significativa, com nível de confiança de 95%, entre as médias das áreas e dos tempos de migração realizados em dias diferentes. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios para a técnica.

Tabela 31: Parâmetros de precisão do tempo de migração e área dos analitos.

| Parâmetros | Tempo migração | | Área | |
|----------------------------|----------------|-----------|------------|-----------|
| | Canamicina | Neomicina | Canamicina | Neomicina |
| Repetitividade (%) | 2,5 | 0,9 | 3,8 | 1,8 |
| Precisão intermediária (%) | 3,5 | 3,4 | 7,5 | 5,0 |
| F_{cal} | 3,69 | 1,32 | 2,28 | 1,63 |

Apesar das boas perspectivas da abordagem, testes de recuperação e estudos em matrizes complexas não foram realizados.

7 Conclusões

Diferentes aplicações da eletroforese capilar foram estudadas neste trabalho com os métodos desenvolvidos para os fenilestanhos, as estrobilurinas e aminoglicosídeos.

O método para os fenilestanhos (DPT e TPT) foi desenvolvido e validado utilizando a hifenação entre CE e ICP-MS com aplicações em amostras biológicas (urina e sangue humano). Apesar dos métodos já encontrados na literatura para a determinação de OTs essa hifenação não havia sido avaliada para a determinação de fenilestanhos. O objetivo de separar os três fenilestanhos escolhidos para o estudo não foi alcançado, apesar do esforço realizado. Porém a determinação de DPT e TPT pode ser realizada com ótima resolução entre os picos. Os valores de LOD e LOQ obtidos com o método desenvolvidos não apresentaram alta sensibilidade quando comparados ao método de Guo e colaboradores⁶⁷ para TPT e DPT usando CE com detecção por fotometria de absorção. Porém o método desenvolvido apresenta a vantagem da possível análise de amostra de plasma e urina com apenas diluição das amostras. Os valores de LOD e LOQ obtidos estão associados aos pequenos volumes de amostra introduzidos e a necessidade de diluição desse volume pela solução de complementação. Para as amostra de urina um fator de pré-concentração de no mínimo 50 vezes pode ser obtido após SPE com cartuchos C-18, o que é favorável para a sensibilidade do método.

O método MEKC para determinação das sete estrobilurinas também foi desenvolvido e validado. O uso dos planejamentos experimentais foram muito importantes para o ajuste da condição de separação dos analitos. O enriquecimento do sinal pelo processo de *sweeping* foi estudado e a condição obtida foi favorável a melhoria da sensibilidade do método. Os valores de LOQ obtidos atendem aos valores exigidos pela ANVISA para a dose de ingetão diária de estrobilurinas. O método de extração por QuEChERS aplicado nas amostras de sopas infantis foi fundamental para obtenção de um extrato ideal para ser

analisado por MEKC. Apenas a determinação da trifloxistrobina não pode ser realizada nas amostras estudadas. O método desenvolvido mostra que a técnica de CE pelo modo MEKC pode ser aplicado para análise de estrobilurinas em amostras de alimento.

O estudo realizado para determinação de aminoglicosídeos em CE com fotoluminescência induzida por laser após interação com nanopartículas de TGA-CdTe mostrou ser promissor para determinação de canamicina e neomicina em níveis traços. O método é inovador para a determinação desses analitos em CE.

Como trabalhos futuros para os métodos desenvolvidos sugerem-se:

- i. Aplicar uma metodologia para extração e pré-concentração dos fenilestanhos para as amostras de plasmas no método CE-ICP-MS.
- ii. Para a determinação das estrobilurinas por MEKC seria interessante avaliar um novo procedimento de extração e limpeza para a trifloxistrobina, assim como o uso de outro método para pré-concentração *off-line* dos analitos, por exemplo, a aplicação de SBSE ao extrato obtido pelo método QuEChERS.
- iii. Continuar os estudos com os demais aminoglicosídeos para conseguir definir as condições para construção de curvas analíticas.
- iv. Aplicar o método desenvolvido para canamicina e neomicina em amostras reais, por exemplo, em amostra de medicamentos, amostras de fluídos biológicos e/ou amostras ambientais. Para retirar ou minimizar possíveis interferências seria interessante realizar a extração em fase sólida utilizando polímeros molecularmente impressos (MIP) produzidos com o usando aminoglicosídeos como base.

8

Referências

-
1. SANCHES, M. S.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M.; *Pesticidas e seus Respectivos Riscos Associados à Contaminação da Água*, **Revista de Ecotoxilogia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.
 2. Lei 7.802/1989 (Lei Ordinária) 11/07/1989, disponível: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm, acessado dia 28/04/2013.
 3. HOLLAND, P. T.; *Glossary of Terms Relating to Pesticides*, **Pure Applied Chemistry**, v. 68, p. 1167 - 1193, 1996.
 4. SOUZA, A. G.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; A. S. MACHADO, S. A. S.; *Utilização de Técnicas Eletroanalíticas na Determinação de Pesticidas em Alimentos*, **Química Nova**, v. 29, p. 105 - 112, 2006.
 5. PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S.; *Agrotóxicos, Saúde e Ambiente: uma Introdução ao Tema*, p. 21 – 41.
 6. Ministério da Saúde. FIOCRUZ. SINITOX, http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home. Acessado em 30/04/2013.
 7. BELMONTE, R. V.; *O país dos Agrotóxicos, Informativo Extra Classe*, 2012.
 8. TAYLOR, M. J, HUNTER, K, HUNTER, K. H, LINDSAY, D, BOUHELLEC, S. L., *Multi-Residue Method for Rapid Screening and Confirmation of Pesticides in Crude Extracts of Fruits and Vegetables Using Isocratic Liquid*

Chromatography With Electrospray Tandem Mass Spectrometry, **Journal of Chromatography**, v. 982, p. 225-236, 2002.

9. KEITH. S. D., *Pesticidas Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trehds*, **Department of Agriculture Extension Service National Agriculture Pesticide Impact Assessment Program special project**, v. 1121, p. 1 - 7, 2000.

10. RAVELO - PÉREZ, L. M. R.; BORGES, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, M. Á. R., *Multiple Pesticide Analysis in Wine by MEKC Combined with Solid-Phase Microextraction and Sample Stacking*, **Electrophoresis**, v. 28, p. 4072-4081, 2007.

11. TAYLOR, M. J.; HUNTER, K.; HUNTER, K. H.; LINDSAY, D.; BOUHELLEC, S. L.; *Multi-Residue Method for Rapid Screening and Confirmation of Pesticides in Crude Extracts of Fruits and Vegetables Using Isocratic Liquid Chromatography With Electrospray Tandem Mass Spectrometry*, **Journal of Chromatography**, v. 982, p. 225-236, 2002.

12. JEWESS, P.; LEE, P.; NICOLSS, P.; PLIMMER, J., *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides*, **Royal Society of Chemistry** p.1, 1999.

13. ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G, *The Strobilurins – New Antifungal Antibiotics from the Basidiomycete Strobilurus Tenacellus*, **Journal of Antibiotics**, v. 30, p. 806 – 810, 1977.

14. SCHRAMM, G.; STEGLICH, W.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F. *Antibiotics from Basidiomycetes, III. Strobilurin A And B, Antifungal Metabolites from Strobilurus Tenacellus*, **Chemische Berichte**, v. 111, p. 2779 – 2784, 1978.

-
15. BALBA, H., *Review of Strobilurin Fungicides Chemicals*, **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, p. 441 – 451, 2007.
16. KIM, B. S.; HWANG, B. K., *Microbial Fungicides in the Control of Plant Diseases*, **Journal Phytopathology**, v. 155, p. 641 – 653, 2007.
17. FISHEL, F.M., *Pesticide Toxicity Profile: Strobilurins Pesticides*, PI – 67, **U. F. IFAS Extention**, 2005.
18. Índice Monográfico, *Monografia de produtos Agrotóxicos*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA**, P26, P46, P50, P56 e T54.
19. CODEX ALIMENTARIUS, *Pesticide Residues in Food and Feed*, disponível em *CODEX Online Pesticide Details for Trifloxystrobin, Azoxystrobin, Kresoxim-methyl e Pyraclostroin*, www.codexalimentarius.org/pestres/data/pesticides, acessando em 28/04/2013.
20. CHRISTENSEN, H. B.; GRANBY, K.; *Method Validation for Strobilurin Fungicides in Cereals and Fruit*, **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 866-874, 2001.
21. ABREU, S. M.; CORREIA, M.; HERBERT, P.; SANTOS, L.; ALVES, A., *Screening of Graes and Winw for Azoxystrobin, Kresoxim-Methyl and Trifloxystrobin Fungicides by HPLC with Diode Array Detection*, **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 549 - 556, 2005.
22. ABREU, S. M.; CABONI, P.; CABRAS, P.; GARAU, V. L.; ALVES, A., *Validation and Global Uncertainty of a Liquid Chromatographic with Diode Array Detection Method for The Screening of Azoxystrobin, Kresoxim – Methyl, Trifloxystrobin, Famocxadone, Pyraclostrovin and Fenamidone in Grapes and Wine*, **Analytica Chimica Acta**, v. 573, p. 291 – 297, 2006.

-
23. SANINO, A.; BOLZONI, L.; BANDINI, M., *Application of Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry to the Determination of a New Generation of Pesticides in Processed Fruits and Vegetables*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 1036, p.161-169, 2004.
24. SCHUREK, J.; VACLAVIK, L.; HOOIJERINK, H. (DICK); LACINA, O.; POUSTKA, J.; SHARMAN, M.; CALDOW, M.; NIELEN, M. W. F.; HAJŠLOVA, J.; *Control of Strobilurin Fungicides in Wheat Using Direct Analysis in Real Time Accurate Time-of-Flight and Desorption Electrospray Ionization Linear Ion Trap Mass Spectrometry*, **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9567 – 9575, 2008.
25. FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. de P.; *Development, Validation and Application of a Method Based on DI-SPME and GC-MS for Determination of Pesticides of Different Chemical Groups in Surface and Groundwater Samples*, **Microchemical Journal**, v. 96, p. 139 – 145, 2010.
26. VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; CASTILLO, N. M.; CÓRDOBA, M.H., *Method Development and Validation for Strobilurin Fungicides in Baby Foods by Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 1216, p. 140 – 146, 2009.
27. VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; CASTILLO, N. M.; CÓRDOBA, M.H., *Liquid–Liquid Microextraction Methods Based on Ultrasound-Assisted Emulsification and Single-Drop Coupled to Gas Chromatography–Mass Spectrometry for Determining Strobilurin and Oxazole Fungicides in Juices and Fruits*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 1217, p. 6569–6577, 2010.
28. CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; AGUINAGA, N.; FÉREZ, G.; CÓRDOBA, M.H., *Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Liquid Chromatography for The Analysis of Strobilurin Fungicides in Fruit Samples*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 1217, p. 4529–4534, 2010.

-
29. PACHECO, W. F.; DOYLE, A.; DUARTE, D. R. A.; DE SOUZA, C. F.; FARIAS, P. A. M.; AUCELIO, R. Q.; *Square-Wave Adsorptive Stripping Voltammetry for Trace Determination of Dimoxystrobin and Azoxystrobin in Potatoes and Grapes*, **Food Analytical Methods**, 2009.
30. GRACÍA, A. J.; FONT, G.; PICÓ, Y., *On – Line Preconcentration Strategies for Analyzing Pesticides in Fruits and Vegetables by Micellar Electrokinetic Chromatography*, **Journal of Chromatography**, v. 1153, p. 104-113, 2007.
31. HERNANDEZ, B. J.; CIFUENTES, A.; GARCIA, M. F. J.; RODRIGUES, B. M. A., *Combinig Solid-Phase Microextraction and On-Line Preconcentration – Capillary Electrophoresis Sensitive Analysis of Pesticides in Foods*, **Electrophoresis**, v. 26, p. 980 – 989, 2005.
32. HERNANDEZ, B. J.; CIFUENTES, A.; GARCIA, M. F. J.; RODRIGUES, B. M. A., *Analysis of Pesticides in Soy Milk Combining Soli-Phase Extraction and Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*, **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 948 – 956, 2005.
33. RAVELO - PÉREZ, L. M. R.; BORGES, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, M. Á. R., *Multiple Pesticide Analysis in Wine by MEKC Combined with Solid-Phase Microextraction and Sample Stacking*, **Electrophoresis**, v. 28, p. 4072-4081, 2007.
34. RAVELO - PÉREZ, L. M. R.; BORGES, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, M. Á. R., *Pesticide Analysis in Tomatoes by Solid-Phase Microextraction and Micellar Electrokinetic Chromatography*, **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 151 – 154, 2008.
35. RAVELO - PÉREZ, L. M. R.; BORGES, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, M. Á. R., *Pesticide Analysis in Rose Wines by Micellar*

Electrokinetic Chromatography, **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3240-3246, 2007.

36. SOUZA, C. F. DE; CUNHA, A. L. M. C. DA; AUCELIOR, R. Q.; *Determination of Picoystrobin and Pyraclostrobin by MEKC With On-Line Analyte Concentration*, **Chromatographia**, v. 70, p. 1461 – 1466, 2009.

37 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J.; *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*, **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412 – 431, 2003.

38. PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA R.; *Quechers – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas*, **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

39. ANDERSSON, A.; PÅLSHEDEN, H.; *Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide-residues*, **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, p. 365 - 367, 1991.

40 LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R.; *Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables*, **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 615, 2005.

41. LEHOTAY, S.J.; *Determination of Pesticides Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study*, **Journal of AOAC International**, v. 90, p. 485 – 520, 2007.

-
42. GONZÁLEZ, R. R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; *Multiresidue Method for Fast Determination of Pesticides in Fruit Juices by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled To Tandem Mass Spectrometry*, **Talanta**, v. 76, p. 211 – 225, 2008.
43. ZHANG, F.; WANG, L.; ZHOU, L.; WU, D.; PAN, H.; PAN, C.; *Residue Dynamics of Pyraclostrobin in Peanut And Field Soil by Quechers and LC-MS/MS*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 116 – 122, 2012.
44. GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SILVA, M.S. *Contaminação ambiental por compostos organoestânicos*, **Química Nova**, v. 26, p. 708-716, 2003.
45. K. FENT, *Ecotoxicology of Organotin Compounds*, **Critical Reviews in Toxicology**, v. 26, p. 1-117, 1996.
46. LI – PING YU; *Speciation of Organotin Compounds by Capillary Electrophoresis Coupled with Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry*; **Analytical Letters**, v.40, p. 1879 – 1879, 2007.
47. PELLEGRINO, C.; MASSANISSO, P.; MORABITO, R., *Comparison of Twelve Selected Extraction Methods for the Determination of Butyl- And Phenyltin Compounds in Mussel Samples*, **Trends In Analytical Chemistry**, v. 19, p. 97-106, 2000.
48. BEAUMONT, A. R.; NEWMAN, P. B.; *Ow-Levels of Tributyl Tin Reduce Growth of Marine Microalgae*, **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, p. 457-461, 1986.
49. FERNANDEZ, M. A.; de LUCA, A. W. R.; LIMAVERDE, A. M.; SCOFIELD, A. L.; PINHEIRO, F. M.; RODRIGUES, E., *Imposex and Surface Sediment Speciation: A Combined Approach to Evaluate Organotin*

Contamination in Guanabara Bay, **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 435 – 452, 2005.

50. GODOI, A. F. L., MONTONE, R. C., SANTIAGO-SILVA, M., *Determination of Butyltin Compounds in Surface Sediments From the São Paulo State Coast (Brazil) by Gas Chromatography–Pulsed Flame Photometric Detection*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 985, p. 205 – 210, 2003.

51. UENO D.; INOUE, S.; TAKAHASHI, S.; IKEDA, K.; TANAKA, H.; SUBRAMANIAN, A. N.; FILLMANN, G.; LAM, P. K.; ZHENG, J.; MUCHTAR, M.; PRUDENTE, M.; CHUNG, K.; TANABE, S., *Global Pollution Monitoring of Butyltin Compounds Using Skipjack Tuna as a Bioindicator*, **Environmental Pollution**, v. 127, p. 1 – 12, 2004.

52. ALMEIDA, A. C.; de LUCA, A. W. R.; MAIA, C. B.; MIEKELEY, N.; *Speciation of Organotin Compounds in Sediment Cores From Guanabara Bay, Rio De Janeiro (Brazil) by Gas Chromatography-Pulsed Flame Photometric Detection*, **Applied Organometallic Chemistry**, v. 18, p. 694 - 704, 2004.

53. MARSOT, P.; PELLETIER, E.; ST-LOUIS, R.; *Effects of Triphenyltin Chloride on Growth of the Marine Microalga Pavlova Lutheri in Continuous-Culture*, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, p. 389 - 395, 1995.

54. *Organotins: A threat to Poles eating Baltic Sea fish*. Disponível em: http://assets.panda.org/downloads/TBT-Leaflet_mammalsbirdsfish.pdf. Acessado em 10/05/13.

55. ZACHARIADIS, G. A.; ROSENBERG, E.; *Headspace and Direct Immersion Solid Phase Microextraction Procedures for Selenite Determination in Urine, Saliva and Milk by Gas Chromatography Mass Spectrometry*, **Journal Chromatography Part B.**, v. 77, p. 3210-3214, 2009.

56. ZACHARIADIS, G. A.; ROSENBERG, E.; *Determination of Butyl- and Phenyltin Compounds in Human Urine by HS-SPME After Derivatization With Tetraethylborate And Subsequent Determination by Capillary GC With Microwave-Induced Plasma Atomic Emission And Mass Spectrometric Detection*, **Talanta**, v. 78, p. 570 – 576, 2009.

57. LI, Y.; LI, Y.; LIU, J.; YANG, L.; NIU, X.; LI, Q.; *An HPLC Method for Determination of a New Diorganotin(IV) Benzohydroxamate in Rat Plasma and Its Application to Pharmacokinetic Studies*, **Chinese Journal Chemistry**, v. 26, p. 1630 – 1634, 2008.

58. DUNEMANN, L.; HAJMIRAGHA, H.; BEGEROW, J.; *Simultaneous Determination of Hg(II) and Alkylated Hg, Pb, And Sn Species in Human Body Fluids Using SPME-GC/MS-MS*; **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 363, p. 466–468, 1999.

59. SHOBHA, L K.; TAN, G. H.; TIOH, N.H.; KUMAR DAS, V.G; *Speciation of Phenyltin (IV) Compounds Using High-Performance Liquid Chromatography: Part 1. The Direct Analysis of Mixed Standard Solutions of Tetraphenyltin, Triphenyltin Chloride, Triphenyltin Hydroxide and Triphenyltin Acetate*, **Speciation Analysis**, v. 16, p. 250 – 257, 2002.

60. POBOZY, E.; GLOD, B.; KANIEWSKA, J.; TROJANOWICZ, M.; *Determination of Triorganotin Compounds by Ion Chromatography and Capillary Electrophoresis with Preconcentration using Solid-Phase Extraction*, **Journal Chromatography Part A**, v. 718, p. 329 - 338, 1995.

61. ENCINAR, J. R.; GONZALEZ, P. R.; ALONSO, J. I. G.; SANZ-MEDEL, A.; *Evaluation of Extraction Techniques for The Determination of Butyltin Compounds in Sediments Using Isotope Dilution-GC/ICPMS with Sn-118 and Sn-119-Enriched Species*, **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 270-281, 2002.

-
62. ABALOS, M.; BAYONA, J. M.; COMPAÑO, R.; GRANADOS, M.; LEAL, C.; PRAT, M. D.; *Analytical Procedures For The Determination of Organotin Compounds in Sediment And Biota: a Critical Review*, **Journal Chromatography Part A**, v. 788, p. 1 – 49, 1997.
63. UGARTE, A.; UNCETA, N.; SAMPEDRO, M. C.; GOIOLEA M. A.; GOMES-CABALLERO, A.; BARRIO, R. J; *Solid Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry For The Speciation of Organotin Compounds In Water Samples*, **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, p. 347 – 351, 2009.
64. HAN, F.; FASCHING, J.L.;BROWN, P.R, *Speciation of Organotin Compounds by Capillary Electrophoresis Using Indirect Ultraviolet Absorbance Detection*; **Journal Chromatography Part B**, v. 669, p. 103–112, 1995.
65. LEE, YI.; WHANG, C. W.; *Capillary Electrophoresis of Triorganotin Compounds With Indirect Fluorescence Detection*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 746. p. 269-275, 1996.
66. JONES, T. L. AND RIDDICK; *Separation and Detection of Three Aryltins by Capillary Electrophoresis – UV/Vis Diode Array*; **Journal Capillary Electrophoresis**, v. 4, p. 33 – 37, 1997.
67. GUO, L.; MATYSIK, F. M.; GLASER, P.; *Speciation of Organotin Compounds By Capillary Electrophoresis: Comparison of Aqueous And Mixed Organic-Aqueous Systems*; **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, p. 669 – 676, 2004.
68. WHANG, K. S.; WHANG, C. W.; *Capillary Electrophoresis of Organotins Compounds With Indirect UV Detection*; **Electrophoresis**, v. 18, p. 241 – 246, 1997.

69. HAN F.; FASCHING J. L.; BROWN P. R.; *Speciation of Organotin Compounds by Capillary Electrophoresis Using Indirect Ultraviolet Absorbency Detection*, **Journal of Chromatography Part B.**, v. 669, p. 103-112, 1995.

70. GUI, DI Y.; JIN, H. X.; LIANG, J. X.; GUO, N. C.; FENG, F. F.; *Analysis of Ultratrace Triorganotin Compounds in Aquatic Organisms by Using Capillary Electrophoresis–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, **Talanta**, v. 80 p. 1913–1918, 2010.

71. WAHAJUDDIN; SINGH, S. P. ; JAIN, G. K.; *Determination of Lumefantrine in Rat Plasma by Liquid-Liquid Extraction Using LC-MS/MS With Electrospray Ionization: Assay Development, Validation and Application to a Pharmacokinetic Study*; **Journal of chromatography Part B**, v. 877, p. 1133-1139, 2009.

72. REID, A. M.; BROUGHAM, C. A., FOGARTY, A. M., ROCHE, J. J., *Accelerated Solvent-Based Extraction And Enrichment of Selected Plasticisers And 4-Nonylphenol, And Extraction of Tin From Organotin Sources In Sediments, Sludges And Leachate Soils*; **Analytica Chimica Acta**, v. 634. p. 197-204, 2009.

73. SABER, A. L.; *On-Line Solid Phase Extraction Coupled to Capillary LC-ESI-MS For Determination of Fluoxetine in Human Blood Plasma*; **Talanta**, v. 78, p. 295-299, 2009.

74. ZACHARIADIS, G.A.; ROSENBERG E.; *Determination of Butyl- and Phenyltin Compounds in Human Urine by HS-SPME After Derivatization With Tetraethylborate and Subsequent Determination by Capillary GC With Microwave-Induced Plasma Atomic Emission And Mass Spectrometric Detection*; **Talanta**, v. 78, p. 570-576, 2009.

75. OHHIRA S, MATSUI H; *Gas-Chromatographic determination of inorganic Tin in Rat urine after a single oral-administration of stannous chloride and*

monophenyltin, diphenyltin, and triphenyltin chloride; **Journal of chromatography Part B.**, v. 622, p. 173-178, 1993.

76. OLIVEIRA, A. R. M.; Magalhães, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S.; *Microextração em Fase Líquida (LPME): Fundamentos da Técnica e Aplicações na Análise de Fármacos em Fluidos Biológicos*, **Química Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.

77. SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R. ; ROLIM NETO, P. J.; *Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica*, **Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 30, p. 129 - 135, 2009.

78. BECK, R. C. R.; CARDOSO, S. G.; ATHAYDE, M. L.; CODEVILLA, C.; OLIVEIRA, F. K.; DALMORA, S. L.; *Validação de Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Determinação da Lamivudina e Zidovudina em Comprimidos*, **Química Nova**, v. 30, p. 1225-1228, 2007.

79. BILA, D. M.; *Fármacos no Meio Ambiente*, **Química Nova**, v. 26, p. 523-530, 2003.

80. NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M.; *Resíduos De Antibióticos em Leite Cru de Quatro Regiões Leiteiras no Brasil*, **Ciência Tecnologia Alimentícia**, v. 27, p. 391 - 393, 2007.

81. FERREIRA, R. G.; SPISSO, B. F.; HORA, I. M. C.; MONTEIRO, M. A.M.; PEREIRA, M. U.; COSTA, R. P. C.; CARLOS, B. S.; *Panorama da Ocorrência de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Leite no Brasil*, **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, p. 30 - 49, 2012.

-
82. STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES S.V.; BAUMANN, W.; *Polar Drug Residues in Sewage And Natural Waters in The State of Rio de Janeiro, Brazil*, **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135, 1999.
83. BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; *Fármacos no Meio Ambiente*, **Química Nova**, v. 26, p. 523 – 530, 2003.
84. FARIAS, A. X., *Avaliação da Qualidade do Leite, Quanto à Presença de Resíduos de Antibióticos*. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 59, p. 428-430, 2004.
85. KOIDE, E. M.; GIROTO, J. M. *Verificação da Presença de Resíduos Antimicrobianos em Leite in Natura na Região dos Campos Gerais - Paraná*. **Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 59, p. 436-438, 2004.
86. KANG'ETHE, E. K.; ABOGE, G. O.; ARIM, S. M.; KANJA, L. M.. OMORE, A. O.; MCDERMOTT, J. J.; *Investigation Of The Risk Of Consuming Marketed Milk With Antimicrobial Residues In Kenya*, **Food Control**, v. 16, p. 349-355, 2005.
87. HILLERTON, J. E.; HALLEY, B. I.; NEAVES, P.; ROSE, M. D.; *Detection of Antimicrobial Substances in Individual Cow and Quarter Milk Samples Using Delvotest Microbial Inhibitor Tests*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 704-711, 1999.
88. Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa Nº 51 DE 18/09/2002.
89. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, *Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal*, **PAMVET**, 2009.

-
90. STEAD, D. A.; *Current methodologies for the analysis of aminoglycosides*, **Journal of Chromatography Part B**, v. 747, p. 69-93, 2000.
91. OKUDA, T.; ITO Y.; UMEZAWA, H.; HOOPER, I. R.; *Biosynthesis and Mutasynthesis of Aminoglycoside Antibiotics*, in *Aminoglycoside Antibiotics*, , Springer-Verlag, Berlin, 1982, p. 111.
- 92 GONZALEZ, L. S.; SPENCER J. P.; *Aminoglycosides: A practical review*, **American Family Physician**, v. 58, p. 1811-1820. 1998.
93. MAYERHOFER G., SCHWAIGER-NEMIROVA I., KUHN,T.; GIRSCH, L.; ALLERBERGER, F.; *Detecting Streptomycin in Apples From Orchards Treated for Fire Blight*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 1076 - 1077, 2009.
94. ALMEIDA, M. P.; REZENDE, C. P.; SOUZA, L. F.; BRITO, R. B.; *Validation Of a Quantitative and Confirmatory Method for Residue Analysis of Aminoglycoside Antibiotics in Poultry, Bovine, Equine and Swine Kidney Through Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, **Food Additives and Contaminants Part A**, v. 29, p. 517-525.
95. CRUZ, M. S.; BRACELO, D.; *Determination of Antimicrobial Residues and Metabolites in the Aquatic Environment by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 973-985, 2006.
96. . LOFFLER, D.; TERNES, T. A; *Analytical Method for the Determination of the Aminoglycoside Gentamicin in Hospital Wastewater Via Liquid Chromatography Electrospray-Tandem Mass Spectrometry*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 1000, p. 583-588, 2003.

-
97. GEORGE J. KALOYANIDES and ENRIQUE PASTORIZA-MUNOZ, *Aminoglycoside Nephrotoxicity*, **Kidney International**, v. 8, p. 571 -582, 1980
98. CROES, S.; KOOP, A. H.; STEPHAN, A.; VAN, G. C.; , CEES, N. A.; *Efficacy, Nephrotoxicity And Ototoxicity of Aminoglycosides, Mathematically Modelled For Modelling-Supported Therapeutic Drug Monitoring*, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 90 – 100, 2012.
99. ALMENARA, F. S.; RIBEIRO, L.; MATSUNO, R. M. S.; LOPES, R. M. G.; OLIVEIRA, T. S.; PEREIRA, D. M.; *Ototoxicidade do Aminoglicosídeo*, **Revista Científica Eletônica De Medicina Veterinária**, v. 11, 2008.
100. MAFALDA, C. S. A.; SOARES, S. O.; LOPES, J. A.; *A Near-Infrared Spectroscopy Method To Determine Aminoglycosides In Pharmaceutical Formulations*; **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, p. 184–192, 2011.
101. AHMAD, A. S.; HODA, M. D. N.; AHMAD, M.; ISLAM, F.; QURESHI, S. Z.; *A Simple And Selective Kinetic Spectrophotometric Method For The Determination Of Kanamycin Using Acetylacetone-Formaldehyde Reagent In N,N '-Dimethylformamide Medium*, **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, p. 870-874, 2006.
102. RIZK, M.; ELSHABRAWY, Y.; ZAKHARI, N. A.; TOUBAR, S. S.; CARREIRA, L. A.; *Fluorimetric Determination of Aminoglycoside Antibiotics Using Lanthanide Probe Ion Spectroscopy*, **Talanta**, v. 42, p. 1849 – 1856, 1995.
103. ALWARTHAN, A. A.; ALTAMRAH S. A.; AKEL, A. A.; *Flow-Injection Determination of Kanamycin by Inhibition of the Lucigenin-H₂O₂-Co²⁺ System*, **Analytica Chimica Acta**, v. 292, p. 201-208, 1994.

104. MAYS, D. L.; VANAPELDOORN, R. J.; LAUBACK, R. G., *High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Kanamycin*, **Journal of Chromatography**, v. 120, p. 93 - 102, 1976.

105. WANG L. F.; PENG J. D.; *Analysis of Kanamycin in Human Plasma, by Fluorescence Detection of the 9-Fluorenylmethyl Chloroformate Derivative*, **Chromatographia**, v. 69, p. 519-522, 2009.

106. KIM, B. H.; KIM Y. K.; OK, J. H.; *Development Of Liquid Chromatographic Method For The Analysis Of Kanamycin Residues In Varicella Vaccine Using Phenylisocyanate As A Derivatization Reagent*, **Journal of Chromatography Part B**, v. 752, p. 173-177, 2001.

107. MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A.; *Direct Determination Of Kanamycin In Raw Materials, Veterinary Formulation And Culture Media Using A Novel Liquid Chromatography-Evaporative Light Scattering Method*, **Analytica Chimica Acta**, v. 547, p. 64-72, 2005.

108. WANG, X. Y.; ZOU, M. J.; XU X.; LEI, R.; LI, K. A.; LI, N.; *Determination Of Human Urinary Kanamycin In One Step Using Urea-Enhanced Surface Plasmon Resonance Light-Scattering Of Gold Nanoparticles*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p. 2397 – 2403, 2009.

109. FLURER, C. L.; *The Analysis Of Aminoglycoside Antibiotics By Capillary Electrophoresis*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 809 – 816, 1995.

110. HOFFSTETTER-KUHN, S.; PAULUS, A.; GASSMANN, E.; WIDMER, H. M., *Influence of Borate Complexation on The Electrophoretic Behavior of Carbohydrates in Capillary Electrophoresis*, **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1541 – 1547, 1991.

-
111. KAALE E.; SCHEPDAEL, A. V.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J.; *Development And Validation of a Simple Capillary Zone Electrophoresis Method For The Analysis of Kanamycin Sulfate With UV Detection After Pre-Capillary Derivatization*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 924, p. 451– 458, 2001.
112. LONG, Y. H.; HERNANDEZ, A.; KAALE, E.; SCHEPDAEL, A. V.; ROETS, E.; CALULL, M.; HOOGMARTENS, J.; *Determination Of Kanamycin In Serum By Solid-Phase Extraction, Pre-Capillary Derivatization And Capillary Electrophoresis*, **Journal of Chromatography Part B**, v. 84, p. 255 - 264, 2003.
113. KHALEDI, M. G, *High-Performance Capillary Electrophoresis – Theory, Techniques, and Applications*, **Chemical Analysis**, v. 146, 1998.
114. TAVARES, M. F. M., *Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos*, **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173 – 181. 1996.
115. HEIGER, D., *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*, **Hewlett-Packard**, Publicação número 5968-9963E, 2000.
116. NURSTEN, R. M. A., *Capillary Electrophoresis for Food Analysis – Method Development*, **Royal Society of Chemistry**, 2000.
117. FARIA, A. F.; OLIVEIRA, M. A. L.; SOUZA, M. V. N.; *Desenvolvimento, Otimização e Validação de Metodologias por Eletroforese Capilar para Análise de Fármacos Utilizados no Tratamento da Tuberculose*, **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Juiz de Fora, 195 páginas, 2010.
118. FARIA, A. F.; SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V.; OLIVEIRA, M. A. L.; *Simultaneous Separation of Five Fluoroquinolones Antibiotics by Capillary Zone Electrophoresis*, **Analytical Chimica Acta**, v. 579, p. 185 – 192, 2006.

-
119. SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M., *Terminologia Para Técnicas Analíticas De Eletromigração Em Capilares*, **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.
120. TAVARES, M. F. M., *Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar*, **Química Nova**, v. 20, p. 493 – 511, 1997.
121. PYELL, U., *Electrokinetic Chromatography, Theory, Instrumentation e Applications*, **Wiley**, 2006.
122. TERABE, M. F. M.; QUIRINO, J. P.; INOUE, N., *Reversed Migration Micellar Electrokinetic Chromatography with Off-Line and On-Line Concentration Analysis of Phenylurea Herbicides*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 892, p. 187 – 194, 2000.
123. TERABE S, KIM J. B., *On-Line Sample Preconcentration Techniques In Micellar Electrokinetic Chromatography*, **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p.1625–1643, 2003.
124. TURIEL E.; FERNANDEZ P., *On-Line Concentration In Micellar Electrokinetic Chromatography For Triazine Determination In Water Samples: Evaluation Of Three Different Stacking Modes*, **Analyst**, v. 125, p. 1725–1731,2000.
125. BURGI D.S.; CHIEN R.L., *Optimization In Sample Stacking For High-Performance Capillary Electrophoresis*, **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2042–2047, 1991.
126. QUIRINO J.P.; TERABE S., *Sweeping Of Analyte Zones In Electrokinetic Chromatography*, **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 1638–1644, 1999.

-
127. QUIRINO J.P., KIM J.BB; TERABE S., *Sweeping: Concentration Mechanism And Applications To High-Sensitivity Analysis In Capillary Electrophoresis*, **Journal of Chromatography Part A.**, v. 965, p. 357–373, 2002.
128. COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S.; *Determinação Simultânea de Ânions por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações*, **Química Nova**, v. 20, p. 512 - 518, 1997.
129. CHEN , S.; CHEN, M.; CHANG, H.; UAN-TSUNG, *Light-Emitting Diode-Based Indirect Fluorescence Detection For Simultaneous Determination Of Anions And Cations In Capillary Electrophoresis*, **Journal of Chromatography A**, v. 1017, p. 215–224, 2003.
130. VO-DINH, T. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis, Chemical Analysis Series*, **Journal Wiley and Sons**, v. 68, 1984.
131. HURTUBISE, R., *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*. **VCH Publishers: New York**, 1990.
132. N. RAGOZINA, M. PÜTZ, W. FAUBEL, U. PYELL, *Indirect laser-induced fluorescence detection for capillary electrophoresis using a frequency-doubled diode laser*, **Electrophoresis**, v. 24, p. 567-574, 2003
133. S.-J. CHEN, M.-J. CHEN, H.-T. CHANG, *Light-emitting diode-based indirect fluorescence detection for simultaneous determination of anions and cations in capillary electrophoresis*, **Journal of Chromatography Part A**, v. 1017, p. 215-224, 2003.
134. W. G.. KUHR, E. S. YEUNG, *Indirect fluorescence detection of native amino acids in capillary zone electrophoresis*, **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1832 - 1834, 1988.

-
135. T.-C. CHIU, M.-F. HUANG, C.-C. HUANG, M. M. HSIEH, H.-T. CHANG, *Indirect fluorescence of aliphatic carboxylic acids in nonaqueous capillary electrophoresis using merocyanine 540*, **Electrophoresis**, v. 23, p. 449-455, 2002.
136. YU BAI, FUYOU DU, YOUYOU YANG, YU BAI, HUWEI LIU; *In-capillary non-covalent labeling and determination of tomato systemin with quantum dots in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*, **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 2893 – 2900, 2011.
137. GUAN-HUA CHEN, JUAN SUN, YONG-JIA DAI, MIN DONG, *Determination of Nicotinyl Pesticide Residues in Vegetables by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with Quantum Dot Indirect Laser Induced Fluorescence*, **Electrophoresis**, v. 33, p. 2192 – 2196, 2012.
138. EFROS, A. L. Efros, *Interband Absorption of Light in a Semiconductor Sphere*, **Soviet Physics Semiconductors-USSR**, v. 16, p. 772-775, 1982.
139. I.L. MEDINTZ, H.T. UYEDA, E.R. GOLDMAN, H. MATTOUSSI, *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*, **Nature Materials**, v. 4, p. 435-446, 2005.
140. K. HANAKI, A. MOMO, T. OKU, A. KOMOTO, S. MAENOSONO, Y. YAMAGUCHI, K. YAMAMOTO, *Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, p. 496-501, 2003.
141. F.B. WU, D.W. ZHANG, S.Z. SHANG, Y.M. ZHU, S.L. ZHUANG, J. XU, *Developing Quantum Dot Phosphor-Based Light-Emitting Diodes for Aviation Lighting Applications*, **Journal of Nanomaterials**, v. 12, p. 1-5, 2012.
142. I.J. SLIPPER, P. BHUJVAL, S. RAJARAM, M.E. FAVRETTO, D. DOUROUMIS, *A Facile Synthesis Route of Size Tunable CdS Quantum Dots with*

High Photoluminescence Yield, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 5899-5902, 2010.

143. M.T. FREDERICK, E.A. WEISS, *Relaxation of Exciton Confinement in CdSe Quantum Dots by Modification with a Conjugated Dithiocarbamate Ligand*, **Nano**, v. 4, p. 3195-3200, 2010.

144. J.H. WANG, Y.Q. LI, H.L. ZHANG, H.Q. WANG, S. LIN, J. CHEN, Y.D. ZHAO, Q.M. LUO, *Bioconjugation of concanavalin and CdTe quantum dots and the detection of glucose*, **Colloids and Surfaces Part A**, v. 364, p. 82-86, 2010.

145. L.L. CHEN, Y. JIANG, C. WANG, X.M. LIU, Y. CHEN, J.S. JIE, *Green Chemical Approaches To Znse Quantum Dots: Preparation, Characterisation And Formation Mechanism*, **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 5, p. 106-117, 2010.

146. K. KANG, K. DANESHVAR, R. TSU, *Size Dependence Saturation And Absorption Of Pbs Quantum Dots*, **Microelectronics Journal**, v. 35, p. 629-633, 2004.

147. K.A. HIGGINSON, M. KUNO, J. BONEVICH, S.B. QADRI, M. YOUSUF, H. MATTOUSSI, *Synthesis And Characterization Of Colloidal Beta-Hgs Quantum Dots*, **Journal of Physical Chemistry Part B**, v. 106, p. 9982-9985, 2002.

148. K.T. YONG, H. DING, I. ROY, W.C. LAW, E.J. BERGEY, A. MAITRA, P.N. PRASAD, *Imaging Pancreatic Cancer Using Bioconjugated InP Quantum Dots*, **Nano.**, v. 3, p. 502-510, 2009.

149. Z.Y. YIN, X.H. TANG, J.X. ZHANG, J.H. ZHAO, S. DENY, H. GONG, *Photoluminescence Of Inas Quantum Dots Embedded In Graded Ingaas Barriers*, **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, p. 1947-1955, 2009.

150. P.T. JING, J.J. ZHENG, M. IKEZAWA, X.Y. LIU, S.Z. LV, X.G. KONG, J.L. ZHAO, Y. MASUMOTO, *Temperature-Dependent Photoluminescence of CdSe-Core CdS/CdZnS/ZnS-Multishell Quantum Dots*, **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 13545-13550, 2009.

151. R. ULBRICHT, J.J.H. PIJPERS, E. GROENEVELD, R. KOOLE, C.D. DONEGA, D. VANMAEKELBERGH, C. DELERUE, G. ALLAN, M. BONN, *Loosening Quantum Confinement: Observation of Real Conductivity Caused by Hole Polarons in Semiconductor Nanocrystals Smaller than the Bohr Radius*, **Nano Letters**, v. 12, p. 4937-4942, 2012.

152. S. WANG, *Fundamentals of Semiconductor Theory and Device Physics*, Prentice Hall, 1989.

153. K.E. KNOWLES, M.T. FREDERICK, D.B. TICE, A.J. MORRIS-COHEN, E.A. WEISS, *Colloidal Quantum Dots: Think Outside the (Particle-in-a-)Box*, **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, p. 18-26, 2012.

154. R.S. CHOUHAN, A.C. VINAYAKA, M.S. THAKUR, *Thiol-Stabilized Luminescent Cdte Quantum Dot As Biological Fluorescent Probe For Sensitive Detection Of Methyl Parathion By A Fluoroimmunochemical Technique*, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1467-1475, 2010.

155. Y.F. LIAO, W.J. LI, S.L. HE, *Properties Of Cdse Quantum Dots Coated With Silica Fabricated In A Facile Way*, **Nanotechnology**, v. 18, 2007.

156. A. DAZZAZI, Y. COPPEL, M. IN, C. CHASSENIEUX, P. MASCALCHI, L. SALOME, A. BOUHAOUSS, M.L. KAHN, F. GAUFFRE, *Oligomeric And Polymeric Surfactants For The Transfer Of Luminescent Zno Nanocrystals To Water*, **Journal of Materials Chemistry Part C**, v. 1, p. 2158-2165, 2013.

157. O. CARION, B. MAHLER, T. PONS, B. DUBERTRET, SYNTHESIS, *Encapsulation, Purification And Coupling Of Single Quantum Dots In Phospholipid Micelles For Their Use In Cellular And In Vivo Imaging*, **Nature Protocols**, v. 2, p. 2383-2390, 2007.

158. Z.Y. WU, Y.L. ZHAO, F.P. QIU, Y.P. LI, S.W. WANG, B.H. YANG, L. CHEN, J.H. SUN, J.Y. WANG, *Forming Water-Soluble Cdse/Zns Qds Using Amphiphilic Polymers, Stearyl Methacrylate/Methylacrylate Copolymers With Different Hydrophobic Moiety Ratios And Their Optical Properties And Stability*, **Colloids and Surfaces Part A**, v. 350, p. 121-129, 2009.

159. P. YANG, M. ANDO, T. TAGUCHI, N. MURASE, *Highly Luminescent CdSe/CdxZn1-xS Quantum Dots with Narrow Spectrum and Widely Tunable Wavelength*, **Journal of Physical Chemistry Part C**, v. 115, p. 14455-14460, 2011.

160. <http://www.evidenttech.com/> acesso feito em 10/05/2013.

161. Z. HENS, I. MOREELS, *Light Absorption By Colloidal Semiconductor Quantum Dots*, **Journal of Materials Chemistry**, v. 22 , p. 10406-10415, 2012.

162. B.L. WEHREBERG, C.J. WANG, P. GUYOT-SIONNEST, *Interband And Intraband Optical Studies Of Pbse Colloidal Quantum Dots*, **Journal of Physical Chemistry Part B**, v. 106, p. 10634-10640, 2002.

163. F. DONG, K.W. HU, H.Y. HAN, J.G. LIANG, *A Novel Method For Methimazole Determination Using Cdse Quantum Dots As Fluorescence Probes*, **Microchimica Acta**, v. 165, p. 195-201, 2009.

164. A.H. GORE, U.S. MOTE, S.S. TELE, P.V. ANBHULE, M.C. RATH, S.R. PATIL, G.B. KOLEKAR, *A Novel Method For Ranitidine Hydrochloride Determination In Aqueous Solution Based On Fluorescence Quenching Of*

Functionalised Cds Qds Through Photoinduced Charge Transfer Process: Spectroscopic Approach, **Analyst**, v. 136, p. 2606-2612, 2011.

165. X.H. JINYUN PENG, *A Simple Fluorescence Quenching Method For Roxithromycin Determination Using Cdte Quantum Dots As Probes*, **Journal of Luminescence**, v. 131, p. 952-955, 2011.

166. M. HU, H.L. YU, F.D. WEI, G.H. XU, J. YANG, Z. CAI, Q. HU, *Citrate-Capped Mn-Modified Cdse/Cds Quantum Dots As Luminescent Probes For Levodopa Detection In Aqueous Solution*, **Spectrochimica Acta Part A**, v. 91, p. 130-135, 2012.

167. ASSIS, R. A.; MIEKELEY, N., *Aperfeiçoamento e aplicações de uma metodologia para análise de especiação de arsênio por eletroforese capilar com detector de ICPMS*. Rio de Janeiro, 2006. 159 p. **Tese de Doutorado** - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

168 MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. W.; *Inductively Coupled Plasmas in Atomic Spectrometry*, **VCH**: New York, 1992.

169 BOUMANS, P. W. J. M.; *Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry*; **John Wiley & Sons**, Inc.: New York, 1987.

170 L. LI, H.F. QIAN, N.H. FANG, H.C. REN, *Significant enhancement of the quantum yield of CdTe nanocrystals synthesized in aqueous phase by controlling the pH and concentrations of precursor solutions*, **Journal of Luminescence**, v. 116, p. 59-66, 2006.

171 **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005**. Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração.

172. Orientação Sobre Validação de Método Analíticos, Documento Orientativo do INMETRO, DOQ-CGDRE-008, Revisão 04, p.1 – 19, 2011.

173. RIBANI, M.; BOTTODI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*, **Química Nova**, v. 27, p. 771 – 7780, 2004.

174. CITAC/EURACHEM, *Guide to Quality in Analytical Chemistry*, 2002.

175. CHUI, Q. S. H.; ZUCHINI, R. R.; LICHTIG, J. *Qualidade De Medições Em Química Analítica. Estudo de Caso: Determinação de Cádmio por Espectrofotometria de Absorção Atômica com Chama*, **Química Nova**, v. 24, p.374 380, 2001.

176. CRUZ, M. H. C de La.; RODRIGUES, J. M.; COUTO, P. R. G.; CUNHA, V. S.; BREMSER, W.; *Estimativa da Incerteza de Medição em Análise Cromatográfica: Abordagem Sobre a Quantificação de Carbamato de Etila em Cachaça*, **Química Nova**, v. 33, p. 578-1584, 2010.

177. AOAC International – Peer Verified Method Program – Manual on Policies and Procedures, 1998.

178. INMETRO, *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição – GUM – Avaliação de dados de medição*, 1ª edição brasileira da 1ª Edição do BIPM de 2008: Evaluation of measurement data – Brasil, 2012.

179. FREITAS, S. M., *Metodologia Estatística para Validação de Métodos Analíticos Aplicáveis á Metrologia em Química*, **Pós-Graduação em Metrologia Qualidade e Inovação, PUC-RJ**, 2003.

180. ARNOLD, C. G.; WEIDENAHUPT, A.; DAVID, M. M.; MULLER, S. R.; HADERLEIN, S. B.; SCHWARZENBACH, R. P.; *Aqueous Speciation and 1-Octanol-Water Partitioning of Tributyl- and Triphenyltin: Effect of pH and Ion*

Composition. Environmental Science and Technology., v. 31, p. 2596 – 2602, 1997.

181. OLIVEIRA, E. C.; *Comparação das diferentes técnicas para a exclusão de “Outlires”- Enqualab*, p. 1-5, 2008.

182. PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B.; OLIVA, J.; BARBA, A.; *Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection*, **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1697 – 1714, 2007.

183. KHAN, S.; AUCELIO, R. Q.; *Photoluminescent semiconductors nanoparticles as optical probes for the determination of captopril, histamine, aminoglycosides and thyroxine. Tese de Doutorado*, Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2013.

184. AUCELIO, R. Q.; CORDOVÉS, A. I. P.; LIMA, J. X.; FERREIRA, A. B. B.; GUAS, A. M. E.; SILVA, A. R.; *Determination of Lapachol in the presence of Other Naphthoquinones using 3MPA-CdTe Quantum Dots Fluorecent Probe*, **Spectrochimica Acta Part A**, v. 100, p. 155 – 160, 2013.

185. ZHAO, J.; WU, L.; WU, Y.; ZOU, K.; LIANG, X.; *Synthesis of Luminescent ZnS Quantum Dots and the Application for Selective Cu²⁺ Probe in Physiological Solution*, **Integrated Ferroelectrics**, v. 129, 2011.

186. M.F. GUI, L.J. BAO, Y.S. XIA, C. WEI, S.Z. ZHANG, C.Q. ZHU, *Indication of intracellular physiological pH changes by L-cysteine-coated CdTe quantum dots with an acute alteration in emission color*, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 30, p. 324-327, 2011.

187. M.Y. GAO, S. KIRSTEIN, H. MOHWALD, A.L. ROGACH, A. KORNOWSKI, A. EYCHMULLER, H. WELLER, *Strongly photoluminescent*

CdTe nanocrystals by proper surface modification, **Journal of Physical Chemistry Part B**, v. 102, p. 8360-8363, 1998.