

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DO RIO DE JANEIRO



**Cabrini Ferraz de Souza**

**Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente**

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro  
Agosto de 2008

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**

Graduou-se em Química licenciatura e bacharel pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em 2006.

Ficha Catalográfica

Souza, Cabrini Ferraz de

Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente / Cabrini Ferraz de Souza; orientador: Ricardo Queiroz Aucélio. – 2008.

166 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Química)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Fosforimetria em temperatura ambiente. 3. Cromatografia eletrocínética capilar micelar. 4. Picoxistrobina. 5. Piraclostrobina. 6. Enrofloxacina. 7. Substrato de celulose. 8. Modo de empilhamento normal (NSM). 9. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DO RIO DE JANEIRO



Cabrini Ferraz de Souza

**Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para  
determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por  
cromatografia eletrocínética capilar micelar e de  
enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente**

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

**Ricardo Queiroz Aucélio**  
Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof. Renato Camargo Matos**

Departamento de Química - UFJF

**Prof. Aderval Severino Luna**

Departamento de Química - UERJ

**Prof. Arthur de Lemos Scofield**

Departamento de Química - PUC - Rio

**José Eugenio Leal**

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

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2008

Acima de tudo, a Deus,  
por mais uma conquista

Aos meus pais, Manoel (*in memoriam*) e Maria,  
pela dedicação no meu crescimento e formação

Em especial ao meu marido Nilson,  
pelo incentivo, paciência e companheirismo. Amo você!

“Se buscares a sabedoria como a prata e como  
tesouros escondidos a procurares, então,  
entenderás o temor do Senhor e  
acharás o conhecimento de Deus.  
Porque o Senhor dá a sabedoria e da sua  
boca vem a inteligência e o entendimento”  
(Provérbios 2: 4-6).

## Agradecimentos

Ao professor e orientador Ricardo Queiroz Aucélio pela oportunidade, confiança, amizade, incentivo, paciência e pela orientação durante a realização deste trabalho.

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

Aos amigos do LEEA, Eliane, Elaine, Wagner, Selma, Roberta, Maria Rita, Alessandra, Flávia, Adriana, Sônia, Junior, Paulo, Thiago, Diego, Renata Kelly e Marcio, pelas grandes colaborações e ótima convivência no ambiente de trabalho.

A amiga Thaísa pela amizade, apoio e companheirismo durante o curso e a todos os amigos que conquistei.

Aos professores participantes da comissão examinadora.

Aos funcionários do Departamento de Química da PUC - Rio, em especial a Fátima pela ajuda durante todo o período de estudo.

À PUC-Rio pela organização e qualidade do curso oferecido.

A Capes pela bolsa de estudo fornecida.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

## Resumo

Souza, Cabrini Ferraz; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínética capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente.** Rio de Janeiro, 2008. 172p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

No presente trabalho, a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC) e a fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP) foram utilizadas como técnicas analíticas para a determinação de duas estrobilurinas (picoxistrobina e piraclostrobina) e de uma fluoroquinolona (enrofloxacina), respectivamente. As condições ótimas de análise por MECC foram determinadas a partir de um estudo univariado dos seguintes parâmetros experimentais e instrumentais: pH do eletrólito de corrida, concentração do tampão, concentração de surfactante (dodecil-sulfato de sódio – SDS), tipo e quantidade de modificador orgânico, temperatura de trabalho e diferença de potencial aplicada. Depois de definidas as condições ótimas (tampão borato 40 mmol L<sup>-1</sup>, pH=8,5; SDS 30 mmol L<sup>-1</sup>; acetonitrila 15% em volume, 25 °C e 25 kV) foi realizado um estudo para diminuir o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método. Para tal, foi usado o modo de pré-concentração no capilar denominado modo de empilhamento normal (NSM). Nessa abordagem, as soluções de padrões e amostras foram dissolvidas em uma solução de maior impedância (água: borato 40 mmol L<sup>-1</sup> pH=8,5 50:50% v/v). Uma cela de caminho óptico alongado também foi utilizada para a tentativa de aumentar a sensibilidade do método. As curvas analíticas foram construídas com o uso de padrão interno (azoxistrobina) e apresentaram comportamento linear e homocedástico com valores de R<sup>2</sup> próximos a 0,999. Com o modo NSM, os valores de LD ( $x_b + 3s_b$ ) e de LQ ( $x_b + 10s_b$ ) para a picoxistrobina e para a piraclostrobina ficaram na ordem de 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. A precisão do método (repetitividade e reprodutibilidade interna) apresentaram valores entre 5 e 8% para tempo de migração e área dos picos. O método foi aplicado na análise de urina e água de riacho, ambas fortificadas com as estrobilurinas. As amostras de urina foram previamente passadas em coluna de extração em fase sólida (C-18). As recuperações obtidas para a piraclostrobina foram 75 ± 4% para as amostras de urina e 94 ± 10% para as amostras de água de riacho. Para a picoxistrobina os valores de recuperação foram de 109 ± 9% e 102 ± 9% para as amostras de urina e água do riacho respectivamente. As características fosforescentes da enrofloxacina foram estudadas de modo univariado em função de vários

parâmetros experimentais tais como o tipo e quantidade de sal de átomo pesado indutor de fosforescência, presença de surfactante modificador de superfície de celulose, influência de concentração hidrogeniônica na solução do analito e estudo do tempo de exposição ao UV para a formação de fotoproduto de sinal mais estável. As melhores condições para o método fosforescente para enrofloxacin foram obtidas em solução básica (solução acetona: NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> 50:50% v/v) irradiada com UV por 30 min e substrato contendo 80 µg de TINO<sub>3</sub>. O método foi aplicado em formulações farmacêuticas contendo enrofloxacin e que são utilizadas na medicina veterinária (solução e comprimidos). Um método com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) adaptado da literatura foi utilizado para análise das amostras de enrofloxacin, sendo os resultados comparáveis àqueles obtidos por SS RTP. A curva analítica apresentou resposta linear e homoscedástica na faixa de trabalho escolhida com R<sup>2</sup> maior que 0,99. Os valores de LD ( $x_b + 3s_b$ ) e de LQ ( $x_b + 10s_b$ ) foram respectivamente 2,1 and 4,8 ng respectivamente. A precisão (repetitividade e reprodutibilidade interna com troca de analista) do método apresentaram valores entre 2 e 19%. A incerteza de medição do sinal fosforescente foi calculada usando o método sistemático indicado no ISO GUM e valores entre 18 e 26% foram alcançados, com valores de repetitividade com troca de substrato a fonte mais importante de incerteza. No procedimento de validação, os valores de concentração de enrofloxacin encontrados nas amostras de medicamento analisadas por SS RTP e por HPLC foram estatisticamente semelhantes (valor de  $t_{\text{experimental}}$  iguais a 0,48 e 1,04 sendo menor que o valor de  $t_{\text{crítico}}$  igual a 2,23).

## Palavras-chave

Fosforimetria em temperatura ambiente; Cromatografia eletrocinética capilar micelar, Picoxistrobina; Piraclostrobina; Enrofloxacin; Substrato de celulose; Modo de empilhamento normal (NSM).

## Abstract

Souza, Cabrini Ferraz; Aucélio, Ricardo Queiroz **Development and application of analytical methods for the determination picoxystrobin and pyraclostrobin by micellar electrokinetic capillary chromatography and enrofloxacin by room-temperature phosphorimetry.** Rio de Janeiro, 2008. 172p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

In the present work, micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) and solid surface room-temperature phosphorimetry (SSRTP) were used as analytical techniques for the determination of two strobilurins (picoxystrobin and pyraclostrobin) and of one fluoroquinolones (enrofloxacin), respectively. The experimental conditions for MECC have been optimized using an univariate approach for the following experimental and instrumental parameters: pH of the working electrolyte, concentration of the buffer, concentration of surfactant (sodium dodecyl-sulphate - SDS), type and amount of organic modifier, working temperature and applied potential. After defined the best conditions (borate buffer 40 mmol L<sup>-1</sup> pH=8.5; 30 SDS mmol L<sup>-1</sup>; acetonitrile 15% in volume, 25 °C and 25 kV), a study was carried through to improve the limit of detection (LD) and the limit of quantification (LQ) of the method. In order to do that, an on-line analyte pre-concentration called normal stacking mode (NSM) was used. In such approach, the standards and samples have been dissolved in a solution of higher impedance (water: borate 40 mmol L<sup>-1</sup> pH=8.5 50:50% v/v). A high sensitivity detection cell also was used to attempt the increasing of the sensitivity of the method. The analytical curves have been constructed with the use of an internal standard (azoxystrobin) and a linear response and homocedastic behavior were observed with R<sup>2</sup> values of at least 0.999. The NSM mode allowed the values of LD ( $x_b + 3s_b$ ) and of LQ ( $x_b + 10s_b$ ) in the order of 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> for picoxystrobina and pyraclostrobina. The precision of the method (repeatability and intermediate precision) was characterized by values between 5 and 8%. The method was applied in the analysis urine and stream water, both type of samples fortified with the strobilurins. The urine sample was previously passed through a solid phase extraction column (C-18). The recoveries achieved for pyraclostrobina were 75 ± 4% for urine and 94 ± 10% for stream water samples. For picoxystrobin, the recovery values were 109 ± 9% and 102 ± 9% respectively for urine and stream water samples. The phosphorimetric characteristics of enrofloxacin have been studied in an unvaried way for experimental parameters such as the type and quantity of phosphorescence inducer (heavy atom salt), surfactant used as

cellulose surface modifier, influence of the hydrogenionic concentration in the analyte solution and study of the UV exposition time for the formation of a more signal stable photoproduct. The best conditions for the phosphorimetric method for enrofloxacin were the use of basic solution (solution acetone: NaOH 0.05 mol L<sup>-1</sup> 50:50% v/v) irradiated with UV for 30 min and cellulose substrates containing 80 µg of TiNO<sub>3</sub>. The method was applied in pharmaceutical formulations containing enrofloxacin employed in veterinary medicine (solution and pills). A method based on high efficiency liquid chromatography (HPLC), adapted from literature, was used as a reference method and the the results obtained for enrofloxacin was comparable to the ones achieved by SSRTP. The analytical curve presented linear and homocedastic behavior with R<sup>2</sup> values higher than 0.99. The LD ( $x_b + 3s_b$ ) and the LQ ( $x_b + 10s_b$ ) values were 2.1 and 4.8 ng respectively. The precision (repeatability and intermediate precision with change of analyst) of the method presented values between 2 and 19%. The uncertainty of the phosphorescence measurement was calculated using the systematic method indicated in the ISO GUM. Values between 18 and 26% had been achieved, with the repeatability with substrate change the most important source uncertainty. In the validation procedure, enrofloxacin concentration values found in the medicine samples analyzed by SSRTP and HPLC were statistically similar ( $t_{\text{experimental}}$  value of 0.48 and 1.04 smaller than the  $t_{\text{critic}}$  value of 2.23).

## Keywords

Room-temperature phosphorimetry; Micellar electrokinetic capillary chromatography; Picoxystrobin; Pyraclostrobin; Enrofloxacin; Cellulose substrates, Normal stacking mode.

## Sumário

1	Introdução	22
1.1.	Picoxistrobina e Piraclostrobina	22
1.2.	Modo de ação e toxicidade	25
1.3.	Métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina	26
1.4.	Enrofloxacina	29
1.5.	Modo de ação	31
1.6.	Métodos analíticos para determinação de enrofloxacina	32
1.7.	Objetivos	37
1.7.1.	Objetivo geral	37
1.7.2.	Objetivo específico	37
2	Materiais e Métodos	39
2.1.	Reagentes, materiais, soluções	39
2.1.1.	Reagentes e Materiais	39
2.1.2.	Soluções	41
2.1.2.1.	Soluções para os experimentos com fosforimetria	41
2.1.2.2.	Soluções para os experimentos com cromatografia eletrocinética capilar micelar	41
2.1.2.3.	Soluções para os experimentos com cromatografia líquida	41
2.2.	Instrumentação	42
2.2.1.	Eletroforese Capilar	42
2.2.2.	Espectrômetro de Luminescência	43
2.2.3.	Cromátografo de fase líquida de alta eficiência	45
2.2.4.	Equipamentos auxiliares	45
2.3.	Procedimentos	46
2.3.1.	Procedimento para limpeza do material	46
2.3.2.	Procedimentos em cromatografia eletrocinética capilar micelar	47
2.3.2.1.	Uso da cela de caminho óptico alongado	48
2.3.2.2.	Pré-concentração da amostra em linha	48
2.3.2.3.	Preparação das amostras analisadas por cromatografia eletrocinética capilar micelar	49

2.3.3. Procedimentos em fosforimetria na temperatura ambiente e em substrato sólido	50
2.3.3.1. Tratamento do nitrogênio usado na fosforescência	50
2.3.3.2. Tratamento de redução de sinal de fundo do substrato sólido	51
2.3.3.3. Procedimento de medição de fosforescência em substrato sólido	51
2.3.3.4. Preparação das amostras analisadas por fosforimetria	52
2.3.4. Procedimentos em cromatografia líquida de alta eficiência	53
2.3.4.1. Preparação das amostras analisadas por cromatografia líquida	54
3 Eletroforese Capilar	55
3.1. Conceitos Básicos	56
3.1.1. Fluxo eletroosmótico	58
3.2. Instrumentação	61
3.3. Modos de injeção da amostra	62
3.4. Concentração da amostra no capilar	63
3.5. Detecção	66
3.6. Cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC)	67
3.6.1. Micelas	69
3.6.2. Migração em MECC	69
3.6.2.1. Parâmetros de migração	70
3.6.3. Resolução	71
3.6.4. Eficiência	73
3.6.5. Parâmetros experimentais relacionados com a otimização da resolução	74
3.6.5.1. Escolha da micela – Surfactante aniônico	74
3.6.5.2. Concentração e pH da solução tampão	75
3.6.5.3. Temperatura	75
3.6.5.4. Adição de aditivos na fase aquosa	76
3.7. Resultados e Discussão	77
3.7.1. Composição do eletrólito	77
3.7.2. Cella de caminho óptico alongado	89
3.7.3. Pré-concentração da amostra em linha	91
3.7.4. Validação do método	92
3.7.4.1. Linearidade	93
3.7.4.1.1. Linearidade da Picoxistrobina	94
3.7.4.1.2. Linearidade da Piraclostrobina	99
3.7.4.2. Detectabilidade	103

3.7.4.3. Exatidão	104
3.7.4.3.1. Comentário geral	104
3.7.4.3.2. Tratamento nas amostras de urina e água do riacho	105
3.7.4.3.3. Resultados da recuperação	110
3.7.4.4. Precisão	111
3.7.4.5. Precisão do tempo de migração dos analitos picoxistrobina e piraclostrobrina	112
3.7.4.6. Precisão da área do picoxistrobina e piraclostrobrina	114
4 Fosforescência	117
4.1. Fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP)	122
4.2. Parâmetros que afetam o sinal fosforescente	124
4.2.1. Efeito do oxigênio e da umidade	124
4.2.2. Efeito do átomo pesado	125
4.2.3. Efeito do surfactante como modificador de superfície	126
4.2.4. Influência do pH	127
4.3. Resultados e Discussão	128
4.3.1. Características fosforescentes da enrofloxacina	128
4.3.1.1. Estudos preliminares	128
4.3.2. Otimização dos parâmetros experimentais	133
4.3.2.1. Influência da quantidade de sal de átomo	133
4.3.2.2. Concentração de NaOH na solução de analito	134
4.3.2.3. Influência da concentração de SDS no substrato sólido	135
4.3.2.4. Influência do tempo de exposição da enrofloxacina ao UV	136
4.3.3. Validação do método	140
4.3.3.1. Linearidade	141
4.3.3.2. Detectabilidade	143
4.3.3.3. Exatidão	144
4.3.3.4. Precisão	146
4.3.3.5. Incertezas	147
5 Conclusões e trabalhos futuros	155
6 Referências	158
7 Anexos	167

## Lista de figuras

Figura 1: Estrutura dos pesticidas estrobilurinas naturais (adaptado ref. 8).	23
Figura 2: Estrutura das duas estrobilurinas (adaptado ref 8).	24
Figura 3: Estrutura da enrofloxacina	30
Figura 4: Cella com caminho óptico alongado com os aparatos adaptados.	43
Figura 5: Esquema óptico do espectrofotômetro de luminescência.	44
Figura 8: Deposição das soluções no substrato de celulose com auxílio de uma planilha marcada.	52
Figura 9: Esquema da dupla camada elétrica no capilar.	59
Figura 10: Esquema de um instrumento para eletroforese capilar (adaptado da ref 4).	61
Figura 11: Esquema geral do modo de empilhamento de uma amostra aniônica.	64
Figura 12: Esquema representativo da separação por MECC usando micelas aniônicas (adaptado da ref. 48).	68
Figura 13: Esquema da janela de eluição em MECC (adaptado da ref 47).	70
Figura 14: Análise de uma mistura padrão das estrobilurinas ( $1 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ ) pelo método MECC. Eletrólito de trabalho: 30 mmol $L^{-1}$ de SDS, tampão borato 20 mmol $L^{-1}$ , pH 8,5, capilar de sílica fundida de 50 cm x 75 $\mu m$ d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 10 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm.	77
Figura 15: Separação das estrobilurinas em uma mistura padrão ( $1 \times 10^{-5}$ mol $L^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho: 30 mmol $L^{-1}$ de SDS, tampão borato 20 mmol $L^{-1}$ , pH 8,5, capilar de 50 cm x 75 $\mu m$ d.i., Injeção por pressão (50 mbar) por 10 segundos, V= 25 kV, T= 25°C e detecção em 200nm. Variação da porcentagem de metanol (a) 5, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 %. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.	78
Figura 16: Estudo da influência do pH na resolução e tempo de análise. Eletrólito de trabalho: 30 mmol $L^{-1}$ de SDS, tampão borato 20 mmol $L^{-1}$ , capilar de 50 cm x 75 $\mu m$ d.i. Injeção por pressão por 10 segundos, V= 25kV, T= 25°C e detecção em 200 nm. Variação do pH em (a) 8,06, (b) 8,52 (c) 9,08. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.	80

- Figura 17: Comparação entre MeOH e ACN como modificador. Figura A: (a) 5, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 % de ACN. Figura B: (a) 15% de ACN e (b) 20% de MeOH. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,5, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., V= 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm injeção por 10 segundos. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 81
- Figura 18: Variações na concentração do tampão. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Concentração de borato: (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 e (e) 50 mmol L<sup>-1</sup>. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 82
- Figura 19: Variações na concentração do surfactante (SDS). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Concentrações de SDS (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 e (e) 50 mmol L<sup>-1</sup>. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 83
- Figura 20: Variações no potencial aplicado. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Potenciais aplicados: (a) 10, (b) 20, (c) 25 e (d) 30 kV. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 84
- Figura 21: Variações na temperatura de análise. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Temperaturas estudadas: (a) 10, (b) 20, (c) 25 e (d) 30 e (d) 40 °C. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 85
- Figura 22: Variações no tempo de injeção. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Os tempos de injeção variaram em: (a) 5, (b) 7, (c) 10 e (d) 12, (e) 15 e (f) 20 segundos. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 86
- Figura 23: Espectro de absorção dos compostos piraclostrobina (1) e picoxistrobina (2). 89
- Figura 24: Diferença entre o uso da capilar normal e capilar acoplado a cela de caminho óptico alongado; (a) eletroferograma da solução padrão

( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) analisada no capilar normal e (b) eletrogerograma da mesma solução padrão em capilar acoplado a cela de caminho óptico alongado. Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i., injeção por 15 segundos,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^{\circ}\text{C}$  e detecção em  $200 \text{ nm}$ . 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 90

Figura 25: Aplicação da pré-concentração em linha em solução padrão dos pesticidas; (a) eletrogerograma de uma solução padrão dos pesticidas (todos em  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) diluída em acetonitrila: água ultrapurificada 6:94% v/v; (b) eletroferograma no modo pré-concentração em linha da solução padrão dos fungicidas picoxistrobina e piraclostrobina (ambos na concentração  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e padrão interno (azoxistrobina -  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão de acordo com o modo de análise,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^{\circ}\text{C}$  e detecção em  $200 \text{ nm}$ . 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 92

Figura 26: Curva analítica para picoxistrobina por padronização interna.  $S_a$  = área do analito e  $S_{P,I}$  = área padrão interno. 95

Figura 27: Gráfico de resíduo da picoxistrobina por padronização interna. 95

Figura 28 Curva analítica para picoxistrobina sem considerar o padrão interno. 96

Figura 29: Gráfico de resíduos da curva analítica da picoxistrobina sem considerar padrão interno. 97

Figura 30: Curva analítica para piraclostrobina por padronização interna ( $S_a$  = área do analito,  $S_{P,I}$  = área padrão interno). 99

Figura 31: Gráfico de resíduos da curva analítica da piraclostrobina por padronização interna. 100

Figura 32: Curva analítica para piraclostrobina sem considerar o padrão interno. 101

Figura 33: Gráfico de resíduos da piraclostrobina sem considerar o padrão interno. 101

Figura 34: Análise das estrobilurinas em amostra de urina enriquecidas ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (pressão  $50 \text{ mbar}$ , 15 segundos),  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^{\circ}\text{C}$  e detecção em  $200 \text{ nm}$ . (a) Amostra após desproteínação com sulfato de

amônio; (b) desproteínação com ajuste de pH para 7,0 e limpeza da amostra com coluna de sílica e (c) amostra de urina após desproteínação somente com ajuste de pH. 106

Figura 35: Análise das estrobilurinas em solução padrão ( $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos), V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Eletroferogramas de soluções padrão após passar por cartucho de extração C18 e eluido com (a) 1 ml e (b) 1,5 mL de ACN. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 107

Figura 36: Comparação entre solução padrão e amostra de urina. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., os analitos foram injetados por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos), V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. (a) eletroferograma da solução padrão; (b) eletroferograma da amostra de urina após passar por extração em cartuchos C-18 (eluição com 1,0 mL de acetonitrila) e (c) branco da urina após o mesmo tratamento da amostra. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 108

Figura 37: Análise das estrobilurinas em amostras de água do riacho enriquecidas com os fungicidas e solução padrão ( $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., os analitos foram injetados por pressão (50 mbar, 15 segundos), V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. (a) eletroferograma da solução padrão e (b) eletroferograma da amostra de água do riacho fortificada. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 109

Figura 38: Aplicação da pré-concentração em linha em amostra de urina (a) e água do riacho (b) enriquecidas com os fungicidas. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., os analitos foram injetados por pressão (pressão 50 mbar) por 75 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 110

Figura 40: Diagrama modificado de Jablonskii (adaptação da fonte Vo-Dinh, John Wiley & Sons, 1984). Absorção (A), relaxamento vibracional (RV), cruzamento interno (CI), fluorescência (F), cruzamento

intersistemas (CIS), fosforescência (P), estado fundamental ( $S_0$ ), estado excitado singlete ( $S_1$ ) e estado excitado tripleto ( $T_1$ ).	119
Figura 41: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacina ( $5 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ ) com e sem a presença de sais de átomos pesados em acetona/água sem exposição ao UV.	131
Figura 42: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacina ( $5 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ ) em acetona/solução NaOH 0,1 mol L $^{-1}$ sem exposição ao UV.	131
Figura 43: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacina ( $5 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ ) em acetona/água após exposição ao UV.	132
Figura 44: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacina ( $5 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ ) em acetona/solução NaOH 0,1 mol L $^{-1}$ após exposição ao UV.	132
. 132	
Figura 45: Influência da massa de $TiNO_3$ no sinal fosforescente da enrofloxacina (89.8 ng).	134
Figura 46: Influência da basicidade da solução do analito no sinal fosforescente da enrofloxacina (89.8 ng).	135
Figura 47: Estudo do sinal fosforescente da enrofloxacina em função da variação da massa de SDS depositado no substrato de papel na presença de 79,9 $\mu$ g de $TiNO_3$ .	136
Figura 48: Estudo do tempo de irradiação UV no sinal fosforescente da solução da enrofloxacina em meio básico.	138
Figura 49: Cromatograma obtidos para solução de enrofloxacina com eluição isocrática (a) e com eluição com gradiente (b) de fase móvel.	139
Figura 50: Análise das soluções de enrofloxacina irradiada com UV em diferentes tempos. Cromatogramas: (a) 0, (b) 30, (c) 60, (d) 90, (e) 120, (f) 150 e (g) 180 minutos.	140
Figura 51: Curva analítica para enrofloxacina.	141
Figura 52: Gráfico de resíduos da curva analítica para enrofloxacina.	142
Figura 53: Diagrama de causa e efeito para a técnica SS RTP.	151
Figura 54: Gráfico de barras mostrando a contribuição de incerteza de cada componente no nível estudado.	154

## Lista de tabelas

Tabela 1: Resumo do tempo de migração dos analitos na otimização do pH do eletrólito.	79
Tabela 2: Resumo das condições ótimas de trabalho.	87
Tabela 3: Valores médios do tempo de migração e simetria dos analitos na condição ótima.	88
Tabela 4: Parâmetros das curvas analíticas da padronização interna.	96
Tabela 5: Parâmetros das curvas analíticas da padronização sem padrão interno.	97
Tabela 6: Valores da análise da variância (ANOVA) para picoxistrobina.	99
Tabela 7: Parâmetros das curvas analíticas da padronização interna da piraclostrobina.	100
Tabela 9: Valores da análise da variância (ANOVA) para piraclostrobina.	102
Tabela 10: Parâmetros de mérito de sensibilidade para picoxistrobina e piraclostrobina	104
Tabela 12: Recuperação dos pesticidas em diferentes amostras.	111
Tabela 13: Parâmetros da precisão dos tempos de migração do picoxistrobina e piraclostrobina.	114
Tabela 14: Parâmetros da precisão da área para picoxistrobina e piraclostrobina	116
Tabela 15: Fosforescência da enrofloxacina e de seus derivados na presença de diferentes sais de átomos pesados.	130
Tabela 16: Condições experimentais para o método.	140
Tabela 17: Parâmetros da curva analítica da enrofloxacina	142
Tabela 18: Valores da análise da variância (ANOVA) para enrofloxacina.	143
Tabela 19: Parâmetros da sensibilidade da enrofloxacina.	144
Tabela 20: Valores das recuperações encontradas na análise dos medicamentos por SSRTP e HPLC.	145
Tabela 21: Resultado do teste de comparação entre SSRTP e HPLC para enrofloxacina.	145
Tabela 22: Precisão da enrofloxacina.	147
Tabela 23: Valores das incertezas calculadas para os três níveis de concentração	153

## Lista de abreviaturas

A - Absorção  
ACN – Acetonitrila  
AdSV - Voltametria adsortiva  
ANOVA – Análise de variância  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AP – Átomo pesado  
CDs – Ciclodextrinas  
CE – Eletroforese capilar  
CI – Conversão interna  
CIS – Cruzamento intersistemas  
CMC – Concentração crítica micelar  
CZE – Eletroforese capilar por zona  
EKC – Cromatografia eletrocinética  
EOF – Fluxo eletrosmótico  
F - Fluorescência  
FASS - Empilhamento da amostra amplificada por campo  
FQs- Fluoroquinolonas  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência  
IDA – Ingestão Diária Aceitável  
INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial  
LD – Limite de detecção  
LDA – Limite de detecção absoluto  
LEEA – Laboratório de Espectrometria e Eletroquímica Aplicada  
LQ – Limite de quantificação  
LQA – Limite de quantificação absoluto  
MECC – Cromatografia eletrocinética capilar micelar  
MeOH – Metanol  
MQ<sub>dentro</sub> – Mínimos quadrados dentro do grupo  
MQ<sub>entre</sub> – Mínimos quadrados entre grupos  
MRLs – Limite máximo de resíduos  
NSM – Modo de empilhamento normal  
P – Fosforescência

PCR - Regressão de componente principal  
P<sub>mw</sub> – Coeficiente de partição de solutos  
Qol – Inibidores quinonas  
r – Repetitividade  
R - Reprodutibilidade  
REPSM - Modo de empilhamento com polaridade reversa do eletrodo  
RRP – Fosforescência em temperatura ambiente  
Rs – Resolução  
RV – Relaxamento vibracional  
SI – Sistema Internacional  
s<sub>r</sub> – Desvio padrão da repetitividade  
s<sub>R</sub> – Desvio padrão da reprodutibilidade  
SSRTP – Fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido  
U – Incerteza expandida  
u<sub>c</sub> – Incerteza combinada  
UV – Vis – Ultravioleta - Visível  
UV-VIS – Ultravioleta – visível  
 $\lambda_{em}$  – Comprimento de onda de máximo de emissão expresso em nm  
 $\lambda_{ex}$  – Comprimento de onda máximo de excitação expresso em nm

# 1 Introdução

## 1.1. Picoxistrobina e Piraclosbrobina

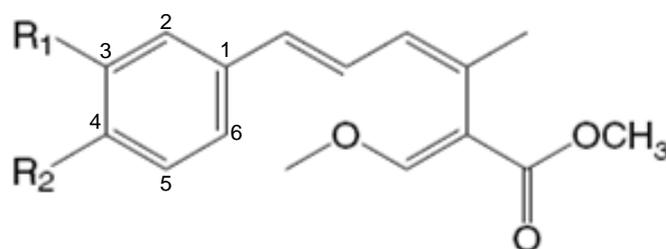
Uma questão recorrente e atual se refere à capacidade dos nossos recursos naturais em sustentar a crescente população humana. No caso da produção de alimentos, o aumento de eficiência passa pela maior produtividade por área plantada e pelo controle de pragas. O uso de cultivares geneticamente modificado e resistente às pragas é ainda controverso e a aceitação dos alimentos transgênicos por parte de população corre o risco de ser limitado por causa da falta de estudos que apontem a ausência de efeitos colaterais decorrentes de seu consumo. A utilização de pesticidas é ainda a estratégia mais difundida para o controle de pragas, sendo essa prática extensiva depois da II Guerra Mundial por causa da introdução do DDT, BHC, aldrina, dietilaldrina, endrina e 2,4-D. O baixo custo e a eficácia dessas substâncias químicas as fizeram muito populares entre os agricultores. Iludidos por uma falsa sensação de segurança, aplicava-se liberadamente esses pesticidas para se obter ambientes livres de pragas. Esse uso indiscriminado teve como consequência o aparecimento de pragas resistentes aos pesticidas, contaminação de várias plantas e animais, intoxicação de trabalhadores rurais e consumidores e o aparecimento de resíduos de pesticidas em lugares inesperados tais como rios, reservatórios de água e poços domésticos<sup>1</sup>. Esse fato resultou em uma reorientação da estratégia de controle de pragas para a obtenção e uso de pesticidas mais específicos e alternativamente, de métodos de cultivo que prescindam do uso dos pesticidas, como exemplo, o uso de feromônios e integração de pestes controle. No entanto, infelizmente, essas estratégias alternativas ainda não suplantam a necessidade de novas formulações de pesticidas para melhorar a produção na agricultura<sup>2</sup>.

As formulações usadas na produção de pesticidas são desenvolvidas com propriedades específicas que são dependentes das estruturas químicas e características físicas dos constituintes. Conseqüentemente, diferentes classes de pesticidas podem ser usadas em combinação e, talvez, em diferentes

momentos do cultivo para aumentar o efeito desejado<sup>3</sup>. Mesmo assim, ainda que usados corretamente, acidentes decorrentes do uso de pesticidas são comuns. Muitas outras classes de pesticidas podem prejudicar o meio ambiente e provocar intoxicações graves nos seres vivos<sup>1</sup>.

Os mais novos pesticidas introduzidos no mercado têm como característica não terem elevada persistência no meio ambiente, mas por causa do grande consumo em plantações o monitoramento destes em alimentos e em bebidas é de especial importância<sup>2</sup>. Muitas dessas novas formulações são fabricadas a partir de pesticidas naturais, como por exemplo, as estrobilinas sintéticas, que foram produzidas a partir de estrobilinas naturais, sendo estes compostos mais facilmente degradados em plantas, animais e água<sup>1,4</sup>.

Os pesticidas (fungicidas) da classe das estrobilinas são substâncias naturais isoladas principalmente de cogumelos (basidiomicetes). Seu nome é derivado dos cogumelos do gênero *Strobilurus*. Estrobilurina-A foi o primeiro pesticida dessa classe e que foi isolado a partir de culturas de líquidos de *Strobilurus tenacellus* por Anke *et al.*<sup>5,6</sup>. A partir desse estudo, muitos outros compostos naturais estrobilinas foram isolados e identificados, sendo os mesmos nomeados em ordem de suas descobertas: estrobilurina-A, estrobilurina-B, estrobilurina-C, estrobilurina-D, etc<sup>7</sup>. Todas as estrobilinas 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. A Figura 1 mostra a estrutura e dois possíveis substituintes do anel (estrobilurina-A e estrobilurina-B).



**Estrobilurina A:  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$**

**Estrobilurina B:  $R_1 = OCH_3$ ;  $R_2 = Cl$**

Figura 1: Estrutura dos pesticidas estrobilinas naturais (adaptado ref.<sup>8</sup>).

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. Pode-se dizer que as estrobilurinas sintéticas são compostos relativamente novos, pois o primeiro foi registrado somente em 1997, e até o momento, apenas oito estrobilurinas foram sintetizados de forma eficiente para uso comercial (azoxistrobina, kresoxim-metil, trifloxistrobina, metominostrobin, fluoxastrobina, piraclostrobina, picoxistrobina e dimoxistrobina). O primeiro da classe a ser sintetizado e registrado foi a azoxistrobina e o mais recente é a dimoxistrobina. A síntese desses pesticidas foi realizada focando principalmente substituições na estrutura (E)- $\beta$ -metoxiacrilato<sup>7</sup>.

Nessa dissertação de mestrado, um método analítico foi desenvolvido para determinar duas dessas estrobilurinas, a picoxistrobina e a piraclostrobina. A piraclostrobina foi descoberta por cientistas da BASF em 2000 e registrada no mesmo ano. Sua estrutura é caracterizada como um derivado do carbamato com o grupo toxicóforo, sendo sua fórmula molecular  $C_{19}H_{18}ClN_3O_4$  e massa molar igual a  $387,8 \text{ g mol}^{-1}$ . Esse composto apresenta solubilidade em água igual a  $1,9 \text{ mg L}^{-1}$  (a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), solubilidade em solventes orgânicos que varia de  $3,7$  (n-heptano) a  $500$  (acetona)  $\text{g L}^{-1}$  e possui valores de log P, em pH  $7,0$  igual a  $3,99$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . A descoberta da picoxistrobina foi anunciada pela agroquímica Zeneca (agora Syngenta-AGC) em 2000 e registrado em 2001. Esse composto possui fórmula molecular  $C_{18}H_{16}F_3NO_4$  e massa molar igual a  $367,2 \text{ g mol}^{-1}$ . A solubilidade em água é igual  $3,1 \text{ mg L}^{-1}$  (a  $20^\circ\text{C}$ ), sua solubilidade em solventes orgânicos, a  $20^\circ\text{C}$ , varia de  $9,6$  (metanol) a  $250 \text{ g L}^{-1}$  (xilol) e possui log P em pH  $7,0$  igual a  $3,60$  a  $20^\circ\text{C}$ . Na Figura 2 são mostradas as fórmulas estruturais desses dois pesticidas e seus respectivos nomes segundo IUPAC.

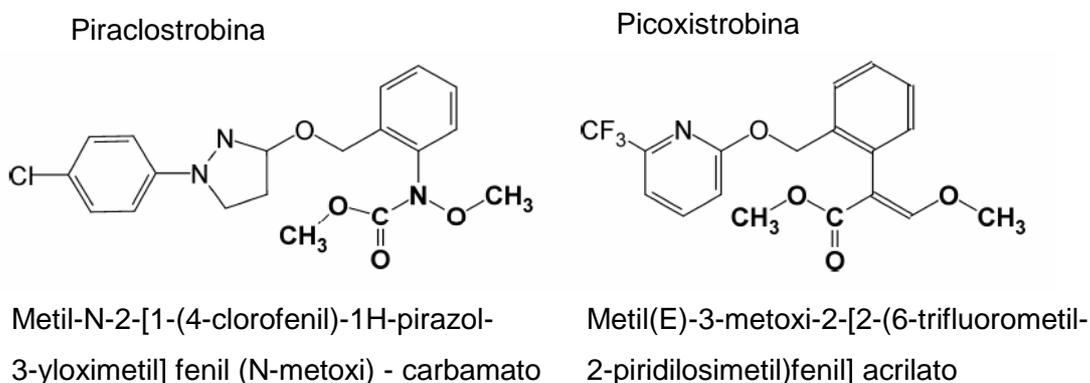


Figura 2: Estrutura das duas estrobilurinas (adaptado ref 8).

## 1.2. Modo de ação e toxicidade

As estrobilurinas inibem a respiração celular ligando-se a um local 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 síntese do ATP (adenosina trifosfato). Como consequência, a produção de energia é parada e o parasito (fungo) morre. Esse modo de ação é diferenciado e tem alvo específico, sendo diferente da inibição do citocromo c, o qual é o mecanismo conhecido de asfixia do cianato e do monóxido de carbono. As estrobilurinas são mais conhecidas como fungicidas inibidores quinonas (Q<sub>o</sub>I), cuja característica importante é a ação rápida e concentrado no primeiro período do ciclo de vida dos fungos, isto é, no estágio de esporos. Por causa desse modo de ação diferenciado, as estrobilurinas são degradadas rapidamente nas plantas e nos compartimentos do meio ambiente (água, solo). 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<sup>7</sup>.

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). A picoxistrobina pode ser usada em lavouras de trigo, centeio, cevada e aveia. Já a piraclostrobina pode ser aplicada em lavouras de soja, uva, batata, tomate, banana, citros e amendoim<sup>7,8</sup>.

Os pesticidas estrobilurinas são considerados como uma família de pesticidas 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 (ingestão oral), de 2.000 a 20.000 mg/kg (exposição cutânea) e de 2.0 a 20.0 mg/L (inalação). Até o ano de 2005 não havia relatos de efeitos teratogênicos e carcinogênicos decorrentes da exposição às estrobilurinas. 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<sup>9</sup>. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de 0,043 mg kg<sup>-1</sup> para a picoxistrobina e 0,040 mg kg<sup>-1</sup> para a piraclostrobina<sup>10</sup>.

### 1.3.

#### **Métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina**

Métodos analíticos têm sido reportados para a determinação simultânea de fungicidas inibidores Q<sub>o</sub>I, grupo na qual as estrobilurinas são uma classe relativamente nova. As técnicas analíticas cromatográficas são as mais utilizadas nas análises de amostras (frutas, vegetais, sucos, vinhos e compartimentos ambientais). Os exemplos mais relevantes são indicados abaixo.

Um dos métodos proposto por Abreu *et al.*<sup>11</sup> possibilitou a determinação de azoxistrobina, kresoxim-metil e trifloxistrobin em uva e em vinho por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção espectrofotométrica em sistema de arranjo de díodos (HPLC-DAD). As estrobilurinas foram detectadas em 207 nm. As amostras passaram por um processo de extração líquido-líquido e *clean-up* (remoção de interferentes) em cartuchos de sílica. O tempo de corrida do método foi de 13 min (modo isocrático usando metanol: água 80: 20% v/v) e a fase estacionária de RP-18. O limite de quantificação (LQ) em uvas e vinhos variou ente 0,219 mg kg<sup>-1</sup> para azoxistrobina e 0,523 mg kg<sup>-1</sup> para kresoxim-metil. Em outro trabalho, Abreu *et al.*<sup>12</sup> validaram o método HPLC-DAD para determinar os pesticidas citados acima além da piraclostrobina, e outros fungicidas como o famoxadone, e fenamidone. O método foi aplicado nas mesmas amostras citadas anteriormente. As amostras passaram por extração líquido-líquido com mistura de acetato de etila: hexano 50:50% v/v. O limite de quantificação (LQ) foi de 0,6 e 0,8 mg kg<sup>-1</sup> para as amostras de uva e vinho respectivamente. Os métodos desenvolvidos por Abreu *et al.*<sup>11,12</sup> foram validados com análises feitas por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa GC-MS.

Taylor *et al.*<sup>3</sup> desenvolveram um método para análise de resíduos de 38 pesticidas (incluindo azoxistrobina, kresomi-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 C-18. O método foi desenvolvido sem nenhum processo de *clean-up* 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<sup>-1</sup>. Para estrobilurinas, os maiores valores de recuperação obtidos entre as diversas amostras analisadas foram de 83% para a azoxistrobina em maçã, 87% para o kresoxim-metil e 76% para a trifloxistrobina em amostra de kiwi. Outro método que utilizou LC-MS-MS foi desenvolvido por Sannino *et al.*<sup>13</sup> para determinação de 24 pesticidas, sendo três estrobilurinas (azoxistrobina, trifloxistrobina e kresxim-metil) que foram 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. Os estudos foram realizados com fortificação das amostras em níveis entre 0,001 – 0,020 e 0,010 – 0,200 mg kg<sup>-1</sup>, e recuperações foram obtidas na faixa entre 76 e 106%. Christensen *et al.*<sup>14</sup> também validou um método para determinação desses mesmas estrobilurinas em amostras de trigo, maçã e uva. O método foi baseado em extração com acetato de etila: ciclohexano e remoção das impurezas por permeação cromatográfica em gel (GPC) seguido por determinação por GC com detecção por captura de elétrons (EC), nitrogênio/fosforo (NP) e espectrometria de massa (MS).

Na literatura podemos encontrar alguns trabalhos analíticos voltados para as estrobilurinas que usam as técnicas baseadas na eletroforese capilar (CE) em seus vários modos de operação, como por exemplo, a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC). Em alguns casos se identifica o uso de pré-concentração dos analitos em linha pelo modo de empilhamento normal. Os autores usam essa estratégia para melhorar a baixa sensibilidade da técnica de detecção fotométrica (detecção em torno de 200 nm). Juan-García *et al.*<sup>15</sup>, por exemplo, comparou dois processos de empilhamento para melhorar a sensibilidade de um método MECC para a quantificação de um grupo de pesticidas (fludioxonila, procimidone, piriproxifena, dinoseb e carbendazima) extraídos de amostras de uvas e alface. Hernández-Borges *et al.*<sup>16,17</sup> 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 *et al.*<sup>2,18,19</sup>, mais recentemente, usaram a MECC e o modo de empilhamento com polaridade reversa do eletrodo (REPSM) para a pré-concentração de pesticidas em extratos de amostras de vinhos<sup>2,18</sup> e tomates<sup>19</sup> (onde apenas a azoxistrobina da família das estrobilurinas estava presente). Em outro trabalho para determinar 11 pesticidas em amostras de água (apenas azoxistrobina estava presente) a técnica MECC também foi utilizada, com a realização de testes com os modos pré-concentração NSM e REPSM, sendo o modo REPSM o que apresentou

maior sensibilidade. Em todos os trabalhos citados os autores afirmaram ter conseguido aumentar a sensibilidade do método consideravelmente quando utilizaram os modos de pré-concentração por empilhamento da amostra. A azoxistrobina é a única estrobilurina analisada até o momento utilizando a técnica MECC<sup>2,18,19</sup>. Os valores de LQ típicos para a azoxistrobina utilizando MECC-REPSM foi de 112 µg L<sup>-1</sup>. Para a determinação da picoxistrobina nenhum método analítico foi desenvolvido até o momento.

#### 1.4. Enrofloxacin

As quinolonas representam um importante grupo de antibióticos sintéticos com ação antibacteriana. O desenvolvimento das quinolonas teve início com a descoberta do ácido nalidíxico em 1962 por Lesher et al<sup>20</sup>, que apresentou atividade apenas contra enterobactérias. Nos anos 70, outras quinolonas como o ácido oxolínico, o ácido pipemídico e a cinoxacina, foram sintetizadas. A inclusão de um átomo de flúor na estrutura do ácido pipemídico levou as quinolonas a serem chamadas de fluoroquinolonas (FQs) e a apresentarem importante propriedade antibactericida. Estudos avaliando a relação entre a estrutura e as atividades das FQs foram feitas por Perterson et al<sup>21</sup>, onde, segundo os autores as substituições nas posições 7 e 8 são importantes para aumentar a potência da atividade antimicrobiana. Desde então numerosas modificações estruturais tem sido feitas no núcleo das quinolonas para aumentar sua atividade, melhorar o desempenho farmacocinético e farmacodinâmico além de melhorar a solubilidade e obter-se um prolongamento da meia vida no soro sanguíneo. Estes compostos têm um grupo carboxílico na posição 3 e suas atividades antimicrobiana variam em função da adição dos grupos 6 – fluoro e 7-piperazina na molécula<sup>22,23</sup>.

As FQs são intensamente usadas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. Sua principal via de eliminação é pela urina, onde aproximadamente 70% das fluorquinolonas excretadas permanecem de forma inalteradas e cerca de 30% na forma de seus metabólitos. As FQs são eficazes nas infecções do trato urinário, no tratamento de diarreia bacteriana, no tratamento de infecções dos tecidos moles, bem como em infecções intrabdominais e das vias respiratórias, incluindo aquelas causadas por microorganismos resistentes a múltiplos fármacos. Além de apresentarem um amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas<sup>22</sup>.

As FQs são atualmente uma das classes de agentes mais importantes no arsenal antimicrobiano, sendo utilizada no tratamento de mais de 800 milhões de pacientes. No início dos anos 70 suas indicações terapêuticas eram somente para o trato urinário e hoje seu uso é recomendado em diversas infecções em todo o corpo. No entanto, as recentes modificações possibilitam uma ótima combinação entre às propriedades antibacterianas e a potência, favorecendo sua ação e minimizando seus efeitos negativos. O modo de ação das FQs é

similar, porém numerosos derivados têm sido sintetizados no esforço de realçar o espectro antimicrobiano e atividade farmacológica além de minimizarem o risco de resistência das bactérias pela droga<sup>22</sup>. Nesse trabalho um método analítico para a determinação de enrofloxacinina será desenvolvido. A estrutura dessa fluorquinolona é indicada na Figura 3.

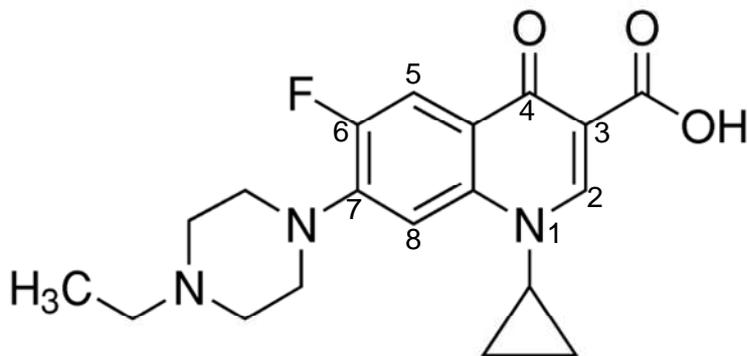


Figura 3: Estrutura da enrofloxacinina

A enrofloxacinina faz parte da terceira geração de fluoroquinolonas<sup>24</sup> e foi sintetizada pelos pesquisadores Grohe e Peterson da Bayer em 1980, sendo desenvolvida exclusivamente para uso em medicina veterinária e introduzida no mercado em 1988<sup>25</sup>. Outras fluoroquinolonas têm licença para uso em animais e humanos (norfloxacinina, ciprofloxacina e ofloxacina)<sup>26</sup>. A enrofloxacinina possui fórmula molecular igual a  $C_{19}H_{22}FN_3O_3$  e massa molar igual a  $359,4 \text{ g mol}^{-1}$ .

## 1.5. Modo de ação

As FQs atuam na inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do DNA bacteriano, ambas são topoisomerasas do DNA bacteriano e são essenciais para sua replicação. As enzimas são a DNA-girase e a topoisomerase IV cujas funções são romper a ligação entre as fitas da dupla hélice de DNA, se posicionar no local da ruptura da fita dupla e reparar simultaneamente esses locais de ruptura. A DNA-girase tem a função de introduzir superespirais negativas (processo que ocorre na direção oposta da fita helicoidal de DNA) na molécula do DNA bacteriano, além de desempenhar pelo menos quatro funções que são: manter o nível de espiralização, facilitar o movimento dos complexos de replicação e transição (removendo os superespirais positivos), remover os “nós” que se formam no DNA bacteriano e ajudar a curvar e dobrar o mesmo. Já a topoisomerase IV tem a principal função de separar o DNA cromossômico replicado nas células-filhas durante a divisão celular<sup>22</sup>.

As FQs interagem com o complexo formado entre a DNA-girase e o DNA bacteriano ou com um complexo formado entre a topoisomerase IV com o DNA bacteriano para criar modificações conformacionais que resultam na inibição de suas atividades enzimáticas. O novo complexo FQs-enzima-DNA bloqueia progressivamente a sua replicação, inibindo a síntese normal do DNA bacteriano, resultando na morte rápida da célula da bactéria. Nos organismos Gram-negativos, a DNA-girase tende a ser o alvo preliminar das FQs, enquanto que nos organismos Gram-positivos o alvo preliminar tende a ser a topoisomerase IV<sup>22</sup>. A enrofloxacin tem excelente atividade contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos<sup>24</sup>.

As FQs têm grande efeito no tratamento de infecções tanto hospitalares quanto comunitárias. Porém, o desenvolvimento de resistências às FQs tem colocado em risco a utilização clínica desta classe de antimicrobianos, principalmente pelo uso descontrolado de medicamentos tanto em animais quanto no homem. O uso rotineiro desses medicamentos para controle de doenças em animais pode resultar também na presença de resíduos em vários gêneros alimentícios (ovos, leite, carnes, etc) de origem animal que podem induzir resistência patogênica aos antibióticos usados na medicina humana. O nível terapêutico recomendado está na ordem de 5 mg L<sup>-1</sup> para as FQs. A União Européia estabeleceu limites máximos de resíduos (MRLs) para várias

quinolonas (inclusive para enrofloxacina) em diferentes alimentos de origem animal<sup>27</sup>. Para o leite bovino o MRL para enrofloxacina é de 100 mg Kg<sup>-1</sup>.

## 1.6.

### Métodos analíticos para determinação de enrofloxacina

O grande interesse nessa classe de composto levou ao desenvolvimento de vários métodos analíticos que determinam as FQs em diferentes matrizes, como, formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e alimentos de origem animal. Belal *et al.*<sup>28</sup> publicaram uma extensa revisão contendo 270 referências sobre os métodos analíticos para a determinação de quinolonas e FQs, incluindo a enrofloxacina, até o ano de 1999. Dentre os métodos instrumentais revelantes descritos para a determinação da enrofloxacina se encontram a espectrofluorimetria, HPLC-UV-vis, HPLC-Fluorimetria, HPLC-MS, métodos microbiológicos e CE com detecção fotométrica de absorção no UV-vis. Além desses, a partir de 1999 são citados métodos voltamétricos e espectrofotométricos para determinação de enrofloxacina.

Devido ao grande número e variedade de métodos, serão citados apenas alguns exemplos mais recentes para cada técnica analítica, dando mais destaque aos métodos que foram desenvolvidos a partir de 1999, e que por isso não se encontram citados no artigo de revisão de Belal *et al.*<sup>28</sup>.

Navalon *et al.*<sup>29</sup> propuseram dois métodos para determinação de enrofloxacina em formulações comerciais e em urina de cães usando a voltametria adsorviva (AdSV). Em um dos trabalhos, os autores utilizaram a calibração univariada para a análise de enrofloxacina em formulações comerciais e, no outro trabalho, aplicou a regressão de componente principal (PCR) para determinar a enrofloxacina na presença do seu metabólito ciprofloxacina<sup>29</sup>. As faixas lineares de concentração utilizadas foram de 4 – 25 e 18 – 55 ng mL<sup>-1</sup> usando um potencial de -0,3 V e um tempo de 180 e 60 s para acumulação. A primeira faixa de concentração foi usada também para o método onde foi aplicado o PCR. Os limites de detecção para as duas faixas de trabalho foram 1,3 ng mL<sup>-1</sup> e 5,8 ng mL<sup>-1</sup> respectivamente. Para os limites de quantificação foram encontrados os valores de 4,0 e 18,0 ng mL<sup>-1</sup> para as duas faixas de trabalho respectivamente.

O primeiro método utilizando a técnica voltametria para determinação de enrofloxacina (juntamente com a sparfloxacina e fleroxacina) foi desenvolvido em

2000 por Rizk *et al.*<sup>30</sup>, sendo aplicado em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos (urina e sangue). O método usou corrente direta (DC), pulso diferencial (DPP) e corrente alternada (AC<sub>i</sub>). Todas as fluorquinolonas apresentaram pulsos catódicos em tampão Britton-Robinson na faixa de pH entre 4,0 e 11,98. O limite de detecção do método para enrofloxacinina foi igual a  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  para o modo DPP.

Alguns métodos por espectrofotometria de absorção UV-vis são utilizados para determinar a enrofloxacinina em formulações farmacêuticas. Esses métodos apresentam vantagens por serem de baixo custo, simples e disponíveis nas maiorias dos laboratórios. Hassan *et al.*<sup>31</sup> avaliaram o uso de N-bromosuccinimida (NBS) como um reagente analítico para determinação espectrofotométrica de 11 FQs em formulações farmacêuticas. O método envolve a reação das FQs com o NBS e subsequente medição do excesso de NBS através da reação com p-fenilenodiamina (PDA) para gerar um produto de coloração violeta que tem máximo de absorção em 530 nm. Diferentes variáveis que afetam a reação (concentração NBS, concentração de PDA, pH da reação, tempo de reação e diluição em solventes) foram estudados e otimizados. A interferência do ácido ascórbico, que é um excipiente comumente utilizado, foi evitado por uma pré-oxidação com brometo de potássio antes de aplicar o processo analítico. Para a análise da enrofloxacinina os valores de 1,1 e 3,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram encontrados para os limites de detecção e quantificação, respectivamente. Métodos espectrofotométricos com formação de complexos de transferência de carga entre as FQs e diferentes reagentes também são citados para determinação de FQs em formulações farmacêuticas. Mostafa *et al.*<sup>32</sup> desenvolveram um método analítico para determinação da enrofloxacinina, e também de ciprofloxacina e pefloxacina baseado na reação com três diferentes reagentes receptores. A determinação da enrofloxacinina foi realizada com apenas dois dos três receptores testados, o ácido cloranílico (CL), que formou complexo de transferência de carga com comprimento de onda máximo em 520 nm, e o tetracianoetileno (TCNE), que formou um complexo de comprimento de onda máximo em 290 nm. O método foi aplicado em solução oral Enroxil 10%. A faixa de trabalho desse método para a enrofloxacinina foi de 20 a 160  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o método com CL e de 0,2 a 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o método TCNE. Os métodos espectrofotométricos são geralmente aplicados para determinação de FQs isoladas por causa da interferência mútua que ocorre em misturas desses compostos.

A grande maioria dos trabalhos envolvendo as determinações de FQs, principalmente em matrizes complexas (fluidos biológicos e alimentos) ou em amostras contendo misturas de quinolonas, envolve o uso de HPLC ou de CE com diversos modos de detecção (fotometria de absorção e fluorescência). As FQs apresentam intensa fluorescência natural que é decorrente de uma estrutura molecular relativamente rígida contendo um sistema de anéis conjugados ricos em elétrons  $\pi$ , onde se encontram alguns grupos substituintes que favorecem o aumento da eficiência quântica fluorescente (grupos carboxílicos, por exemplo). Essa característica faz com que a detecção fluorimétrica seja preferencial em análises de FQs por HPLC<sup>22</sup>.

O recente trabalho de Uslu *et al.*<sup>33</sup> foi realizado para determinar duas FQs (enrofloxacin e ciprofloxacina) em matrizes de solo. O mecanismo de extração das FQs foi realizado aplicando vórtex, ultrassom e extração em fase sólida. A análise foi realizada por HPLC com detecção por fluorescência. A extração mais eficiente foi encontrada com tampão fosfato em pH 3 em combinação de 50% de acetonitrila com ciclo de extração realizado por quatro vezes. As condições de análise foram: coluna de fase reversa C-18, temperatura de 30°C, eluição isocrática com fase móvel contendo ácido orto-fosfórico: acetonitrila 80:20% v/v e detecção por fluorescência com excitação a 280 nm e emissão a 450 nm.

Herranz *et al.*<sup>27</sup> desenvolveram um método analítico para determinar enrofloxacin, ciprofloxacina e sarafloxacin em ovos, aplicando extração por líquido pressurizado e HPLC com detecção por fluorescência. A extração ótima foi encontrada usando fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH= 3,0): acetonitrila 50:50% v/v. A separação cromatográfica foi conduzida em uma coluna C-18 e com um programa de gradiente com fase móvel contendo ácido ortofosfórico 25 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 3,0): acetonitrila. A detecção foi feita por fluorescência com excitação a 280 e emissão a 440 nm. O limite de decisão e a capacidade de detecção reportada para o método foram estabelecidos dentro da faixa 17-24 ng g<sup>-1</sup> e 30-41 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Outro método que utiliza HPLC com detecção por fluorescência com DAD foi desenvolvido por Marazuela e Moreno-Bondi para determinação de resíduos de ciprofloxacina, enrofloxacin, marbofloxacina, donofloxacin e sarafloxacin em amostra de leite usando a norfloxacina como padrão interno<sup>34</sup>. Extração em fase sólida foi utilizada para clean-up e pré-concentração das amostras. As FQs também foram separadas em fase reversa C18 com uso de programa de eluição em gradiente (mesma combinação de fase móvel utilizada no método citado anteriormente). A detecção por absorção foi fixado em 298 nm para a determinação da marbofloxacina e os comprimentos de

onda fixados para detecção por fluorescência (excitação/emissão) das demais fluorquinolonas foi igual a 280/440. A faixa de trabalho para a enrofloxacin foi entre 8,3-150 ng mL<sup>-1</sup> e o LD igual a 3 ng mL<sup>-1</sup>, o que atende os valores de Limites Máximo de Resíduo (MRLs) estabelecida para esses antibióticos no Conselho de Regulamentação EU 2377/90<sup>35</sup>. As FQs também foram determinadas em amostras de urina no método desenvolvido por Mansilla *et al.*<sup>33</sup>. A técnica HPLC-fluorescência foi utilizada para separação das FQs ( enoxacina, norfloxacin, ofloxacin e enrofloxacin) com método de eluição isocrática usando uma mistura de tetrahidrofurano: tampão fosfato (pH =3,00, 30 mmol L<sup>-1</sup>) na proporção 8:92% v/v como fase móvel. A detecção fluorimétrica foi realizada com excitação a 277 e emissão a 444 nm. O limite de detecção de 15,0 ng mL<sup>-1</sup> foi obtido para determinação da enrofloxacin.

Outra técnica bastante utilizada para determinação de FQs é a CE. Desde 1999 vários métodos analíticos para FQs utilizando essa técnica foram desenvolvidos em seus vários modos de separação (isotacoforese, cromatografia capilar micelar, etc). Vários modos de detecção podem ser utilizados em eletroforese como, detecção UV-vis, espectrometria de massa (MS), detecção amperométrica (AD) e detecção por fluorescência induzida por laser (LIF).

Kowalski e Plenis<sup>36</sup> desenvolveram um método para determinação simultânea de seis quinolonas em amostras de tecidos de aves e suínos usando CE com detecção UV. As amostras foram preparadas por extração em fase sólida em cartuchos de C-18. As curvas de calibração foram lineares na faixa de trabalho entre 10-1000 ng g<sup>-1</sup> para todas as FQs incluindo a enrofloxacin. Os valores dos limites de decisão e capacidade de detecção foram encontrados na faixa entre 3,2-16,9 e 3,5-20,3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, para todas as quinolonas.

Zhao *et al.*<sup>37</sup> desenvolveram um método CE utilizando o modo de separação por cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC) com auxílio de técnica de concentração da amostra no capilar (concentração em linha) para análise de quinolonas em amostras de tecido de porco. Os autores aplicaram o método para determinação de quatro quinolonas entre elas a enrofloxacin. As amostras foram desproteínadas com ácido tricloracético; o eletrólito de trabalho para separação das quinolonas continha 20 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> mais 80 mmol L<sup>-1</sup> de dodecil sulfato de sódio (SDS), com pH ajustado para 9,6; injeção da amostra foi realizada por pressão (15 x 10<sup>2</sup> Pa) por 200 segundos; a voltagem aplicada durante a separação foi de 18 kV; a detecção foi obtida em 278 nm. A

separação foi realizada em um capilar de sílica fundida de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo) e diâmetro 75  $\mu\text{m}$ . O método apresentou um limite de detecção para enrofloxacinina igual a 0,020  $\text{mg L}^{-1}$ . Segundo os autores o método pode ser aplicado para análise de resíduos de quinolonas em diversos alimentos de origem animal.

Hernández *et al.*<sup>38</sup> determinaram a enrofloxacinina além da ciprofloxacina e a flumequina em plasma de porco por eletroforese capilar em zona usando o modo de isotacoforese capilar (ITP-CZE). Segundo os autores, a CZE-ITP é uma técnica que permite aumentar a sensibilidade (em até 40 vezes) quando comparada com CZE. As amostras foram tratadas por meio de extração em fase sólida e o LD para a enrofloxacinina foi 85  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os autores indicaram esta metodologia como alternativa à técnica de HPLC em análises residuais de quinolonas em amostras biológicas.

## **1.7. Objetivos**

### **1.7.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e aplicar dois métodos analíticos distintos. A cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC) foi escolhida como técnica analítica para determinar os pesticidas picoxistrobina e piraclostrobina por ser uma técnica de separação para compostos neutros e por não ter sido aplicada ainda para esses dois compostos específicos. Os pesticidas picoxistrobina e piraclostrobina foram selecionados pela necessidade de desenvolver métodos analíticos capazes de determinar-los em diferentes tipos de amostra principalmente em níveis residuais. A segunda técnica analítica utilizada no trabalho foi a fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP) com o propósito de desenvolver um método analítico para determinar a enrofloxacin em amostras de formulações farmacêuticas.

### **1.7.2. Objetivo específico**

A seguir alguns objetivos específicos da realização desse trabalho serão apontados.

- Desenvolvimento de método analítico utilizando a MECC para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina:
  - i. Conhecer a técnica MECC em termos dos cuidados necessários para possibilitar uso diário com reprodução de resultados, já que esse é o primeiro trabalho de pós-graduação realizado no Laboratório de Espectroanalítica e Eletroanalítica Aplicada (LEEA) utilizando essa técnica.
  - ii. Otimizar as condições instrumentais e experimentais para a separação e determinação dos pesticidas por MECC.
  - iii. Aplicar recursos experimentais e instrumentais para aumentar a sensibilidade do método.
  - iv. Aplicar o método analítico desenvolvido em amostras reais.

- Desenvolvimento de método analítico fosforimétrico para determinação da enrofloxacina:
- i. Dar continuidade ao trabalho realizado por Nava<sup>22</sup> utilizando a SS RTP para desenvolver um método para a enrofloxacina.
  - ii. Estudar as características fosforescentes da enrofloxacina em substrato sólido utilizando vários sais de átomos pesados como indutores de fosforescência.
  - iii. Otimizar, por estudo univariado, as condições experimentais: presença de surfactante modificador de superfície de celulose, influência de concentração hidrogeniônica na solução do analito e estudo do tempo de exposição ao UV para a formação de fotoproduto de sinal mais estável.
  - iv. Validar o método por comparação dos resultados com aqueles obtidos com um método de referência por HPLC.
  - v. Aplicar o método em formulações farmacêuticas (solução e comprimido) contendo a enrofloxacina.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes, materiais, soluções

#### 2.1.1. Reagentes e Materiais

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

Os padrões dos pesticidas: picoxistrobina 99,9%, piraclostrobina 99,9% e azoxistrobina 99,9% foram adquiridos da Riedel-deHaen (Alemanha) e o padrão de enrofloxacina 98% foi adquirido da Fluka (Alemanha). Os sais de átomos pesados (sais com elementos de massa atômica elevada) testados para indução de fosforescência foram: nitrato de tálio (I) 99% da Acros Organics (Nova Jersey, EUA) nitrato de prata (I) 99%, cloreto de cádmio monohidratado 99% e nitrato de chumbo (II) 99% da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes acetonitrila e metanol, ambos de grau HPLC, e acetona P.A. utilizados no preparo das soluções, assim como o ácido bórico, o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), o ácido orto-fosfórico e o hidróxido de sódio, usados para ajuste de pH das soluções, foram todos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

O nitrogênio 99,9% utilizando durante a medição de fosforescência como gás de purga foi adquirido da AGA-Lynde (Rio de Janeiro, Brasil). O substrato sólido utilizado para imobilização de analito durante a medição de fosforescência foi papel de filtro Whatman 42 (Kent, Inglaterra), sendo previamente tratado para a redução do sinal de fundo<sup>39</sup>.

Capilares de sílica fundida para as análises por eletroforese capilar foram adquiridos da Agilent Technologies (Califórnia, EUA) e da Simplus Capillaries (Nova Jersey, EUA). As dimensões dos capilares foram  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno e 50 cm de comprimento total (42,5 cm até o detector). Os capilares da Agilent já estavam prontos para uso. Já os capilares da Simplus Capillaries foram preparados pelo próprio operador com o corte da capilar no tamanho ideal

e remoção do revestimento de poliimida para abrir a janela de detecção e as 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), um kit de detecção de alta sensibilidade (capilares especiais e cela de caminho óptico alongado), alinhadores e cassetes (compartimento que acopla o capilar ao equipamento) foram adquiridos da Agilent Technologies.

As soluções utilizadas em eletroforese capilar e em cromatografia em fase líquida foram previamente passadas por filtros de membrana de PTFE de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  e diâmetro igual a 17 mm (National Scientific, Michigan, EUA). A membrana de PTFE foi previamente molhada com metanol antes da passagem de soluções aquosas. Para os testes em urina<sup>40</sup>, utilizou-se coluna de extração em fase sólida C-18 (500mg, 3 mL) (Varian, Califórnia, EUA) e sulfato de amônio da Vetec.

Uma coluna cromatográfica de fase reversa X-Terra C-18 com base polimérica, 150 mm de comprimento e 4,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio de partícula (Waters, Massachusetts, EUA) foi usada como fase estacionária para os experimentos em cromatografia de fase líquida.

Micropipetas automáticas de volumes reguláveis de 1 a 10  $\mu\text{L}$  da Brand (Wertheim, Alemanha) e da Wheaton (Nova Jersey, EUA) foram utilizadas para a aplicação das soluções de analitos e das soluções de sais de átomos pesados nos substratos de celulose. Micropipetas reguláveis de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  e de 20 a 200  $\mu\text{L}$  Brand (Wertheim, Alemanha) e balões volumétricos de 10,00 mL e 5,00 mL foram utilizados no preparo das soluções. Todas as micropipetas e os balões volumétricos de 10,00 mL foram calibrados em um laboratório integrante da Rede Brasileira de Calibração – RBC (Laboratório de caracterização de fluídos – LCF/PUC-Rio), conforme certificados nos anexos I, II e III. Micro-seringa de vidro (Hamilton, local EUA) de 25  $\mu\text{L}$  foi usada para carregar a alça de amostragem do cromatógrafo.

## **2.1.2. Soluções**

### **2.1.2.1. Soluções para os experimentos com fosforimetria**

Soluções-estoque aquosas dos sais inorgânicos de átomos pesados foram preparadas nas seguintes concentrações: nitrato de tálio  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ , nitrato de chumbo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , nitrato de prata  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e cloreto de cádmio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Quando necessário, as soluções foram diluídas com água ultrapurificada. A solução-estoque de enrofloxacina ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi preparada em acetona P.A e utilizada para obter soluções de menor concentração com a mistura acetona: água 50:50% v/v ou acetona: solução de NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 50:50% v/v.

### **2.1.2.2. Soluções para os experimentos com cromatografia eletrocínética capilar micelar**

As soluções-estoque dos pesticidas (azoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina) foram preparadas em acetonitrila ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e mantidas no escuro sob refrigeração de até  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O método foi desenvolvido utilizando soluções de trabalho preparadas por meio da diluição das soluções estoque dos pesticidas em solução contendo 6%, em volume de acetonitrila e 94% de tampão borato  $40,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH= 8,5).

O eletrólito de corrida foi preparado diariamente pela diluição de soluções-estoque aquosas de SDS ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e de ácido bórico ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) com adição de acetonitrila 15% v/v (modificador orgânico) e ajuste de pH para o valor adequado (pH = 8,5).

### **2.1.2.3. Soluções para os experimentos com cromatografia líquida**

A solução estoque de enrofloxacina ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) preparada em acetona P.A foi diluída ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em metanol e injetada no HPLC para os testes de comparação de métodos<sup>34</sup>. Nos estudos de verificação do comportamento da enrofloxacina após irradiação com UV, a mesma solução de

enrofloxacin foi diluída ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em solução de acetona: NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 50:50% v/v, irradiada com UV e, em seguida, injetada no cromatógrafo.

A fase móvel utilizada foi uma combinação de solvente (acetonitrila) com solução tampão de ácido fosfórico ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em pH ajustado para 3,0 com solução de NaOH, a proporção de cada componente foi determinada nos estudos de ajuste do método. A vazão foi mantida em  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , os sinal fluorescente foi medido em apenas um único canal com o comprimento de onda de excitação/emissão fixos em 280/440 nm. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa X-Terra C-18 com base polimérica, 150 mm de comprimento e  $4,6 \mu\text{m}$  de diâmetro médio de partícula. Um volume de amostra  $5 \mu\text{L}$  foi injetado no sistema.

## **2.2. Instrumentação**

### **2.2.1. Eletroforese Capilar**

Os experimentos com os pesticidas foram realizados em um equipamento comercial Hewlett – Packard (HP) CE – Agilent. O instrumento era equipado com detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos (operação na faixa de 190-600 nm); controlador de temperatura do tipo Peltier; um sistema automático de injeção de amostra e programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent.

As determinações foram conduzidas em um capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total ( $42,5 \text{ cm}$  até o detector) e  $75 \mu\text{m}$  de diâmetro interno, devidamente adaptado ao alinhador e ao cassete que protege o capilar. Os eletroferogramas dos pesticidas foram obtidos com detecção fotométrica ajustada em 200 nm. A voltagem positiva, aplicada durante a corrida, foi de 25 kV e a temperatura mantida constante em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . As injeções das amostras no capilar foram realizadas pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 75 segundos para realizar o modo de pré-concentração no capilar.

Um teste foi realizado com uma cela de caminho óptico alongado (formato em Z) para aumentar o sinal analítico dos pesticidas. Para o uso dessa cela, foi utilizado um kit com todos os aparatos necessários para sua adaptação (Agilent). O kit era constituído de um capilar de sílica fundida dividido em duas partes

(essas partes foram adaptadas a cela), conectores para adaptação do capilar a cela, uma garrafa de ar comprimido e uma solução de Hellmanex 2% v/v foram utilizados para limpeza dos acessórios. A Figura 4 mostra uma foto da cela de caminho óptico alongado e os aparatos necessários para sua instalação.

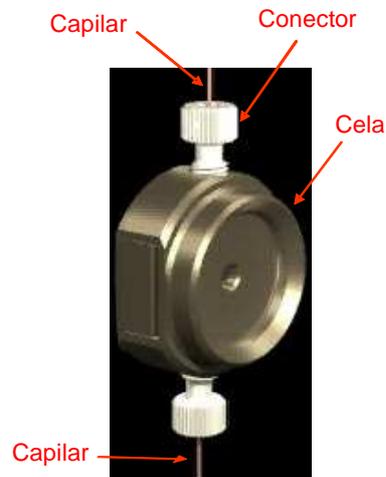


Figura 4: Cella com caminho óptico alongado com os aparatos adaptados.

### 2.2.2. Espectrômetro de Luminescência

Os espectros de fosforescência foram obtidos em um espectrômetro de luminescência da Perkin Elmer modelo LS55 (Perkin-Elmer, Connecticut, USA) tendo uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20 kW com 8  $\mu$ s de duração de pulso como fonte de excitação, um tubo fotomultiplicador sensível ao vermelho como detector e dois monocromadores, do tipo Monk-Gillieson, cobrindo faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão. Bandas espectrais de passagem de entrada e de saída foram ajustadas para 10 nm.

O sistema de detecção do instrumento possibilitou o ajuste temporal de aquisição de sinal (tempos de atraso e de abertura de detecção), discriminando o sinal de maior tempo de vida (fosforescência) do ruído de tempo mais curto (espalhamento e fluorescência). Os valores usados nesse trabalho foram de 3 ms para o tempo de abertura e de 3 ms para o tempo de atraso na detecção. Um esquema simplificado do sistema óptico do equipamento é mostrado na Figura 5.

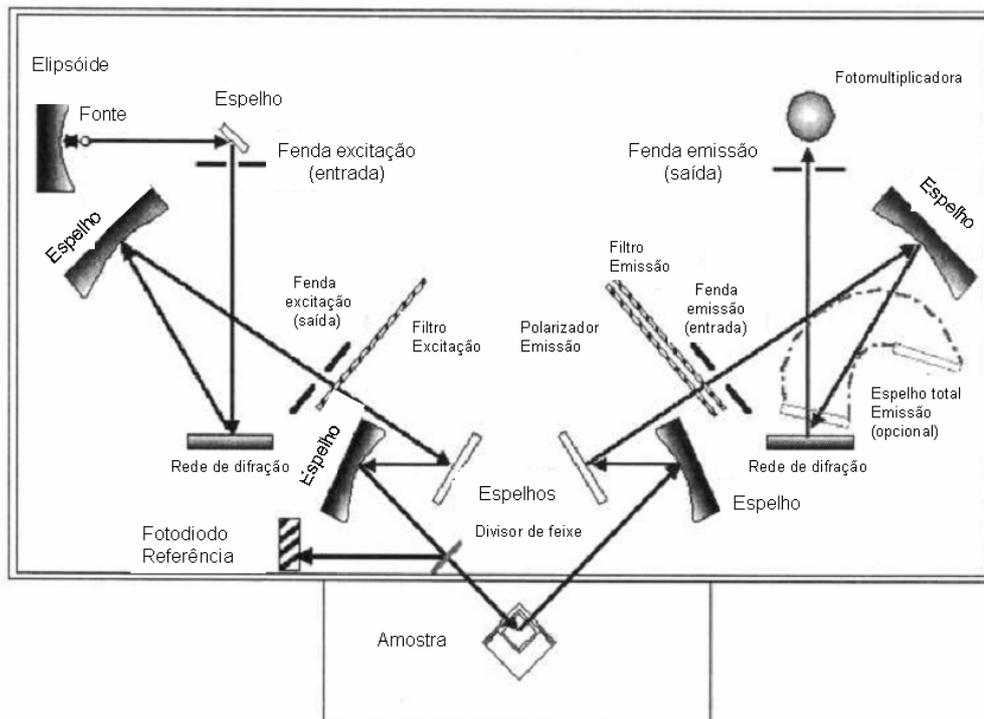


Figura 5: Esquema óptico do espectrofotômetro de luminescência.

As medições dos sinais fosforescentes foram feitas em substrato sólido, sendo utilizado um aparato de superfície sólida (Perkin-Elmer). A amostra em substrato sólido foi acoplada em um suporte metálico (Figura 6a) e em seguida colocada no aparato de superfície sólida que foi previamente acoplado ao compartimento de amostra do espectrofotômetro (Figura 6b). Para manter a atmosfera ao redor do substrato livre de oxigênio, um tubo foi adaptado de modo a manter um fluxo contínuo de nitrogênio sobre a superfície frontal do substrato de celulose (ver detalhe da Figura 6b).

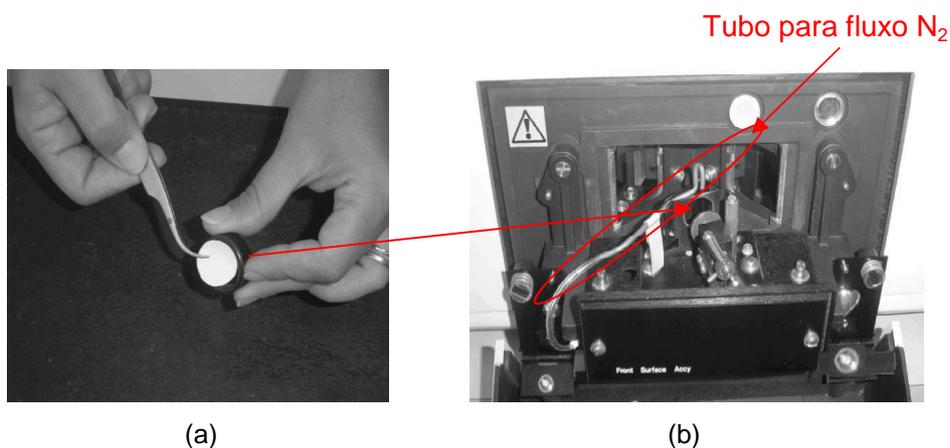


Figura 6: (a) Colocação do substrato de papel no suporte que é acoplado ao (b) aparato de medição em superfície sólida.

### 2.2.3. Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência

Um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência 1525 Binary (Waters, Massachusetts, EUA) foi utilizado nos testes de comparação com o método fosforimétrico. O sistema foi constituído por uma bomba binária, um forno, e um detector de fluorescência (Modelo 2475) que possui uma grade de excitação e de emissão e lâmpada de xenônio de fonte contínua e capacidade de medição de sinal em dois canais, sendo, nesse trabalho, utilizado apenas um único canal com o comprimento de onda de excitação/emissão fixos em 280/440 nm. A injeção foi feita manualmente por meio de um sistema “Reodyne” e alça de amostragem de 5  $\mu$ L. O tratamento dos dados, integração dos picos e resultado final foi processado pelo software Breeze do próprio equipamento.

### 2.2.4. Equipamentos auxiliares

No processo de limpeza das amostras de urina (“clean-up”) foi utilizado uma centrífuga modelo BE 4000 Brushless (Bio-Eng, Rio de Janeiro). As medidas de massa foram realizadas uma balança analítica da marca Shimadzu modelo AUW220D (Shimadzu, Tóquio, Japão) calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro, Brasil). Para auxiliar na dissolução de alguns dos padrões, foi utilizado um banho ultra-sônico (modelo USB124, de potência

40 W, proveniente da CTA do Brasil, São Paulo, Brasil). A degaseificação de solventes para o HPLC foi realizada em um banho ultra-sônico modelo USC 1800 (Unique, São Paulo, Brasil). As medições de pH foram realizadas em um pHmetro modelo MPA 210, versão 2.3 (Tecnocon, 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.

Um sistema de vácuo foi utilizado para a secagem dos substratos de papel, após a deposição das soluções de analito e de átomo pesado. O sistema era constituído de um dessecador de polietileno coberto com papel alumínio, de modo a impedir que os substratos ficassem expostos à luz ambiente. Esse dessecador foi acoplado a uma bomba de vácuo modelo 820 da Fisatom (Brasil), sendo um frasco Erlenmeyer instalado entre o dessecador e a bomba (armadilha de segurança para coletar refluxo de óleo da bomba). O vácuo foi medido por meio de um manômetro, sendo a pressão interna menor ou igual a 25 Pol Hg. Os substratos de papel foram deixados nesse sistema por um período de 2 h antes das medições<sup>40</sup>.

Um reator fotoquímico, construído no próprio laboratório, foi utilizado para tratamento de amostras e substratos de celulose com radiação UV. Esse reator foi montado em carcaça de estufa contendo seis lâmpadas de vapor de mercúrio (de 6 W cada) e dispostas em meia lua na cavidade superior interna do aparato. As lâmpadas de mercúrio utilizadas são comercialmente disponíveis para esterilização bacteriológica com emissão mais intensa em 253 nm e na faixa entre 296-313 nm<sup>45</sup>.

## **2.3. Procedimentos**

### **2.3.1. Procedimento para limpeza do material**

Toda a vidraria foi lavada com água corrente e deixada imersa em solução aquosa de ácido nítrico 10 % v/v por um período mínimo de 24 h. Esse material foi enxaguado com água destilada e posteriormente com água ultrapurificada, seco e mantido em recipientes fechados.

### 2.3.2. Procedimentos em cromatografia eletrocínética capilar micelar

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o da cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC), 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 pré-condicionado. Esse procedimento foi feito no início de cada dia de trabalho e consistiu na passagem de solução de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (10 min), seguida da passagem de água ultrapurificada (10 min) e solução de eletrólito (2 min). Esse pré-condicionamento foi feito pela injeção das soluções com pressão de 50 mbar. 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 ultrapurificada (1 min); (ii) acetonitrila (0,30 min); (iii) água ultrapurificada (1 min); (iv) solução de NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$  (1,5 min) e (v) eletrólito de corrida (2 min). No final de cada dia, foi realizado um procedimento de limpeza do capilar, com a passagem, em seqüência, de acetonitrila (5 min), água ultrapurificada (5 min) e solução de acetonitrila: água 50:50 % v/v (5 min). Após cada dia de trabalho, o capilar foi guardado com as pontas imersas dentro de *vials* de polipropileno contendo solução de acetonitrila: água 50:50% v/v.

O eletrólito de corrida foi preparado diariamente pela mistura de solução de ácido bórico (concentração final no eletrólito de  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ), solução aquosa de SDS (concentração final no eletrólito  $30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e modificador orgânico (15 % em volume de acetonitrila). O pH dessa solução de eletrólito foi ajustada para o valor de 8,5 pela adição de solução aquosa de NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Durante o ajuste de pH com NaOH, a solução foi mantida em constante agitação e o valor de pH monitorado com o pHmetro.

As soluções de trabalho foram preparadas diariamente a partir das soluções-estoque dos pesticidas. Nos estudos para otimização dos parâmetros instrumentais e experimentais, foram usadas soluções de pesticida  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  contendo 6 % de acetonitrila. Os pesticidas foram injetados por pressão de 50 mbar durante 15 s. Quando se realizou pré-concentração em linha, a injeção foi de 75 s. A voltagem aplicada foi de 25 kV e temperatura mantida em  $25^{\circ}\text{C}$ . A

corrente medida nessas condições foi tipicamente em torno de 45  $\mu$ A. Os eletroferogramas foram obtidos com medição de absorvância em 200 nm (comprimento de maior sinal analítico para os pesticidas). Todas as soluções (padrões e eletrólito) foram filtradas em filtros PTFE, previamente condicionado com solvente orgânico, antes de serem levadas ao equipamento de eletroforese capilar.

### **2.3.2.1.**

#### **Uso da cela de caminho óptico alongado**

A cela de caminho óptico alongado foi montada de acordo com informações contidas no manual do fabricante. Um capilar especial de 72 cm de comprimento total foi utilizado. Esse capilar era dividido em duas partes, uma parte maior de 63,5 cm de comprimento (distância até a janela de detecção) e a outra parte menor de 8,5 cm (distância entre a janela e o lado de saída da amostra do capilar). Antes de serem acopladas à cela, as duas partes do capilar foram devidamente ajustadas aos dois pequenos conectores (previamente limpos com ar comprimido). Esses conectores com os capilares foram adaptados à cela, que em seguida foi colocada no cassete (suporte para cela com o capilar) que foi devidamente adaptado ao equipamento de eletroforese capilar. A Figura 4 mostra o capilar acoplado a cela de caminho óptico alongado.

A solução de limpeza Hellmanex II foi devidamente preparada por meio da diluição de 2 mL da solução em 50 mL de água ultrapurificada. Os parafusos e a cela foram imersos nessa solução e deixados no banho ultra-sônico por 15 minutos e em seguida por mais 10 minutos em água ultrapurificada, antes de serem utilizados, para remoção de partículas que pudessem atrapalhar a passagem da solução pela cela de caminho óptico alongado.

Para o uso dessa cela, os procedimentos de condicionamento, pré-condicionamento, posterior limpeza do capilar e de injeção foram realizados da mesma forma como descrito anteriormente.

### **2.3.2.2.**

#### **Pré-concentração da amostra em linha**

O procedimento de pré-concentração de analito em linha, denominado de modo normal de empilhamento (NSM), foi realizado como indicado no trabalho

de Pérez et al<sup>41</sup>. A pré-concentração NSM envolve a utilização de micelas carregadas negativamente, sendo o modo mais simples de pré-concentração de amostra no capilar (on-line).

A pré-concentração da amostra no capilar envolveu a dissolução dos analitos em uma matriz de baixa condutividade em relação ao eletrólito de corrida, permitindo que o processo de acumulação em zona ocorra devido à diferença de campo elétrico entre as zonas de amostra e o eletrólito de trabalho<sup>42</sup>.

A matriz de baixa condutividade onde os analitos foram dissolvidos foi otimizada com propósito de obter maior sinal analítico dos pesticidas. O melhor sinal analítico foi obtido com preparação de amostra em água ultrapurificada: tampão borato (40 mmol L<sup>-1</sup> pH = 8,5) 50:50 % v/v. Após a otimização da matriz, o tempo de injeção da solução foi otimizado (75 s de injeção foi escolhido). Injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar, voltagem aplicada de 25 kV e temperatura mantida em 25 °C foram usadas.

### 2.3.2.3.

#### **Preparação das amostras analisadas por cromatografia eletrocínética capilar micelar**

Na determinação dos pesticidas em urina fortificada, um procedimento prévio de *clean-up* das amostras foi utilizado. O procedimento de remoção das impurezas das amostras de urina foi constituído das seguintes etapas: i) 5 mL de amostra de urina foi enriquecida com os pesticidas nas concentrações desejadas (azoxistrobina foi usado como padrão interno) e levada a balão volumétrico de 10 mL, o volume foi ajustado com solução de acetonitrila: água ultrapurificada 6:94 % v/v; ii) a solução resultante foi centrifugada (3000 rpm por 20 min) para desproteínação; iii) o sobrenadante foi adicionado a coluna de extração em fase sólida C-18, previamente condicionada com 4,0 mL de acetonitrila e 4,0 mL de água; iv) 10 mL de água ultrapurificada foram passados pela coluna para remoção de interferentes; v) os pesticidas foram eluídos com 1,0 mL de acetonitrila para balão volumétrico de 10 mL; vi) o volume foi ajustado com solução de mais baixa condutividade própria para realizar pré-concentração no capilar; vi) a amostra foi passada por filtro de PTFE antes da medição.. O branco da amostra (sem adição dos pesticidas) foi preparado passando pelo mesmo procedimento acima.

As amostras de água foram coletadas no riacho Rainha que passa pelo campus da PUC – Rio, na Gávea. A coleta foi feita em três diferentes pontos e foram fortificadas com os pesticidas de interesse para simular uma amostra de água contaminada. Para analisar essas amostras, não foi necessário nenhum procedimento especial além da filtração prévia em filtros de PTFE.

O procedimento para o preparo das amostras de água do riacho constituiu das seguintes etapas: i) as amostras de água de riacho foram coletadas em tubos limpos, ii) Um volume de 5 mL de cada amostra foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e enriquecido com os pesticidas em concentrações desejadas; iii) o volume foi ajustado com solução de água ultrapurificada: tampão borato ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{pH} = 8,5$ ) 50:50 % v/v; iv) as amostras foram filtradas em filtros de PTFE.

### **2.3.3.**

#### **Procedimentos em fosforimetria na temperatura ambiente e em substrato sólido**

##### **2.3.3.1.**

#### **Tratamento do nitrogênio usado na fosforescência**

Para eliminar o oxigênio durante a medição de fosforescência o nitrogênio de procedência comercial, foi submetido a um processo prévio para eliminação de resíduos de oxigênio utilizando um sistema de desoxigenação baseado na oxidação do íon metavanadato em solução (Figura 7a). O sistema era constituído por dois frascos contendo uma mistura de soluções de metavanadato de amônio (Vetec) e de ácido clorídrico (Merck). No fundo de cada um desses frascos, foi colocada uma pequena massa de amalgama feita com zinco em pó (Vetec) e mercúrio metálico (F. Maia, Brasil)<sup>43</sup>. Após a passagem do gás nitrogênio nestas duas soluções, o fluxo de gás foi direcionado para duas colunas de sílica (Vetec) de modo que percolasse a sílica contra a força da gravidade (Figura 7b), reduzindo sua umidade residual.

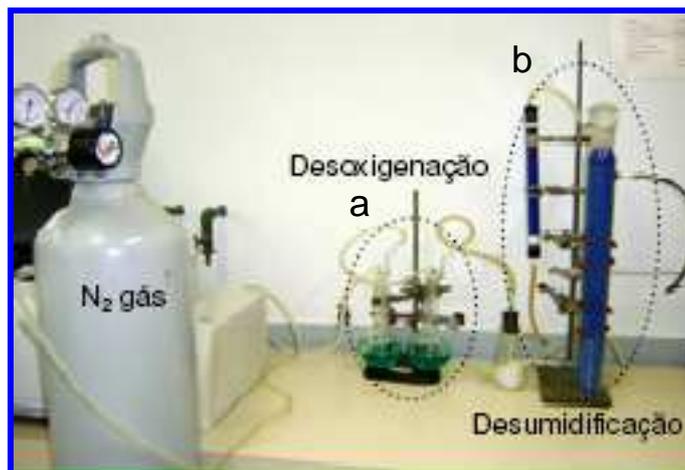


Figura 7: (a) Sistema para desoxigenação e (b) secagem do nitrogênio

### 2.3.3.2.

#### Tratamento de redução de sinal de fundo do substrato sólido

Antes de ser utilizado como substrato sólido, o papel de filtro foi tratado de maneira a remover possíveis componentes que contribuem para o seu sinal fosforescente de fundo. O tratamento do substrato sólido consistiu em duas fases. Na primeira, o papel passou por um sistema de lavagem por extração com água quente em Soxhlet, sendo, posteriormente, seco com uma lâmpada infravermelha de 150 W (Philips, São Paulo, Brasil). Na segunda etapa, o papel (após ser cortado em círculos de aproximadamente 18 mm de diâmetro) foi levado a um reator fotoquímico para ser tratado, por período de 2 h, com radiação UV<sup>44</sup>. Esse procedimento reduziu em até 97% o sinal de fundo original do papel. Detalhes desse procedimento podem ser encontrados na literatura<sup>45</sup>.

### 2.3.3.3.

#### Procedimento de medição de fosforescência em substrato sólido

As medições de fosforescência foram realizadas em amostras depositadas em substrato sólido de baixo sinal de fundo. As soluções de trabalho (amostras, padrões ou branco) e de átomo pesado foram depositadas em volumes de 5  $\mu\text{L}$  com auxílio de micropipeta. As soluções foram depositadas seguindo a seguinte ordem, primeiro a solução de sal de átomo pesado e depois a solução da amostra, padrão ou branco. Quando os testes foram realizados com papel tratado com SDS, uma solução deste surfactante (5  $\mu\text{L}$ ) foi a primeira a ser

adicionada no substrato. As adições foram realizadas no centro do substrato sólido cuja centralização foi feita com o auxílio de uma planilha indicada na Figura 8.

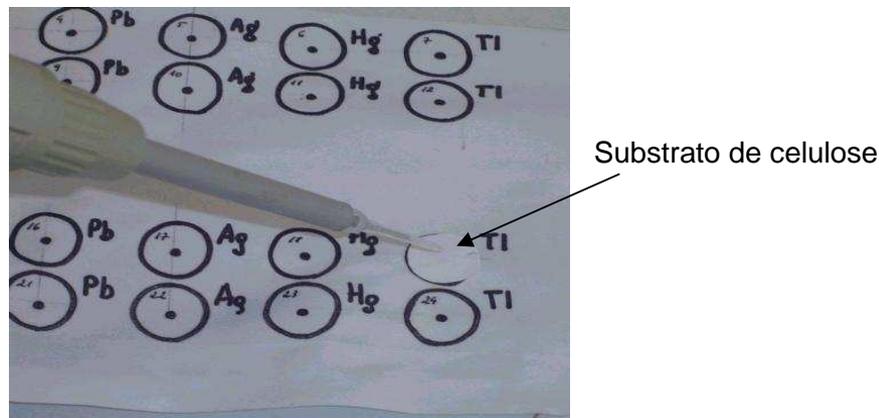


Figura 8: Deposição das soluções no substrato de celulose com auxílio de uma planilha marcada.

Após adição das soluções, os substratos de celulose foram colocados para secar sob vácuo, em um dessecador, por aproximadamente 2 h. No momento das medições, cada substrato foi retirado do dessecador e colocado no suporte para substrato sólido, (Figura 6a), que foi, em seguida, acoplado ao equipamento para realização das medições de fosforescência.

Para se obter sinal fosforescente intenso, a atmosfera ao redor do substrato foi purgada com nitrogênio (seco e desoxigenado) por um período de aproximadamente 2 min antes de medir o sinal, sendo esse fluxo mantido durante todo o tempo de análise.

#### 2.3.3.4.

#### Preparação das amostras analisadas por fosforimetria

O método fosforimétrico foi aplicado em formulações farmacêuticas contendo enrofloxacin e que são utilizadas na medicina veterinária. As formulações foram adquiridas no comércio local nas formas injetável (Flotril - 2,5% m/v de enroloxacin) e comprimido (Baytril– 15 mg de enrofloxacin por comprimido). Esses dois medicamentos possuem apenas a enrofloxacin como princípio ativo além de outros componentes não ativos que fazem parte da matriz dos medicamentos. Em cada comprimido encontramos 60 mg de excipientes e,

na forma injetável, 100 mL de veículo. Na análise do medicamento injetável, seis amostras foram preparadas pela diluição do medicamento (alíquota de 150  $\mu\text{L}$  em balões volumétricos de 10 mL) obtendo-se concentração nominal de enrofloxacin igual a  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (valor baseado no indicado na bula do medicamento). O ajuste de volume foi feito com água: acetona 50:50% v/v. A partir de cada uma dessas soluções, uma nova alíquota de 150  $\mu\text{L}$  foi transferida para balão volumétrico de 5 mL onde o volume da solução foi ajustado com acetona: NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 50:50% v/v. O valor de concentração esperado para enrofloxacin nessas soluções foi  $3,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Essas soluções foram irradiadas por 30 min com radiação UV, para ser, em seguida, adicionada nos substratos de celulose, como já descrito.

As amostras de comprimido foram preparadas pulverizando 10 comprimidos em gral de porcelana. Seis porções do pó obtido foram separadas e pesadas, de modo a que cada porção tivesse massa de aproximadamente 0,015 g (o que equivale a aproximadamente 3,7 mg de enrofloxacin). Essas massas foram tratadas com 10 mL de uma solução acetona: água 50:50% v/v para dissolver o analito. O banho ultra-sônico foi usado nesse momento (5 min de sonicação das soluções). As soluções resultantes foram filtradas em seringa com filtros PTFE e recolhidas em balões volumétricos de 10 mL e o volume ajustado com solução de acetona: água 50:50% v/v. O processo foi ajustado para que a concentração de enrofloxacin nessas soluções ficasse em torno de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada uma das 6 soluções foram coletadas para balões volumétricos de 5 mL ( $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e diluídas em acetona:NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 50:50% v/v em balão volumétrico de 10 mL. As soluções foram irradiadas com UV (30 min), sendo em seguida adicionadas no substrato de celulose.

#### 2.3.4.

#### **Procedimentos em cromatografia líquida de alta eficiência**

O procedimento de análise de amostras contendo enrofloxacin por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi adaptado da literatura<sup>34</sup>. A solução estoque de enrofloxacin ( $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), preparada em acetona, foi diluída em metanol (solvente do método de referência) e em solução de acetona: NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 50:50% v/v para verificar se a introdução da amostra preparada nesse meio básico era viável.

O modo de utilização da bomba foi o isocrático com vazão da fase móvel ajustada em  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila: tampão fosfato ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 18:82% v/v. A temperatura do forno foi mantida em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Amostras e soluções foram injetadas no sistema de injeção por meio de uma micro-seringa de  $25 \text{ }\mu\text{L}$  (para injetar um volume 5 vezes maior que o volume da alça). Antes de iniciar as injeções, a coluna cromatográfica foi condicionada com a fase móvel até a estabilização da pressão. Os solventes (acetonitrila, água ultrapurificada e tampão fosfato) foram previamente desgaseificados em banho de ultra-som por no mínimo 20 min e filtrados em membrana de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ .

As soluções de calibração foram preparadas a partir da solução estoque de enrofloxacinina preparada em acetona. Alíquotas dessa solução foram diluídas em metanol e passadas por filtros para seringa antes de serem injetadas no cromatógrafo.

#### **2.3.4.1.**

##### **Preparação das amostras analisadas por cromatografia líquida**

As amostras de medicamentos foram preparadas da maneira indicada para o procedimento para as análises por fosforimetria. O processo foi idêntico até a preparação das soluções-estoque em torno de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . A partir dessa etapa, acetona: água ou acetona: solução de NaOH para a preparação da soluções não foram usadas. No caso, usou-se metanol como solvente para preparação das soluções de trabalho.

Nos estudos envolvendo o derivado fotoquímico da enrofloxacinina, as amostras preparadas em meio básico e irradiadas com UV foram injetadas ( $5 \text{ }\mu\text{L}$ ) diretamente do cromatógrafo.

### 3 Eletroforese Capilar

O processo de eletroforese é definido como “o movimento ou migração diferenciada de espécies carregadas pela atração ou repulsão em um campo elétrico”. 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<sup>42,46,47</sup>. A eficiência da separação em solução livre, como a realizada por Tiselius, foi limitada pela difusão térmica e por processos de convecção em solução. O calor, gerado uniformemente por efeito Joule através do meio condutor, era dissipado somente pelas extremidades do recipiente, gerando gradientes de temperatura que induziam gradientes de densidade e, por consequência, fluxos convectivos que misturavam as bandas de componentes já separadas<sup>46</sup>.

O uso de tubos capilares solucionou o problema relacionado 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  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento) preenchido com solução de eletrólito. O grande avanço da eletroforese capilar em química analítica se deve, em parte, por sua simplicidade instrumental. No entanto, a característica mais atraente da eletroforese capilar é a variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar, o que permite a separação de uma grande variedade compostos (neutros, positivamente carregados, negativamente carregados). Dentre os vários modos de separação destacam-se: (i) fronteira móvel, (ii) zona (CZE - Capillary Zone Electrophoresis), (iii) micelar, (iii) gel, (iv) isotacoforese, (v) focalização isoelétrica e (vi) eletrocromatografia capilar<sup>42,46</sup>.

### 3.1. Conceitos Básicos

Em termos práticos, o processo de separação por eletroforese capilar ocorre da seguinte maneira: um eletrodo positivo (anodo) e um negativo (catodo) são colocados, cada um, em solução contendo eletrólitos, onde as extremidades do tubo capilar, preenchido com a mesma solução de eletrólito, são mergulhadas. A diferença de potencial aplicada entre as extremidades do capilar provoca a migração de íons (cátions e ânions), presentes na solução dentro da capilar, em direção aos eletrodos de carga oposta<sup>48</sup>.

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

$$v_i = \mu_i E \quad (1)$$

onde  $v$  é a velocidade de migração do íon ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $\mu_i$  é a mobilidade do íon ( $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) e  $E$  é a magnitude do campo elétrico ( $\text{V m}^{-1}$ )<sup>46,48</sup>. A magnitude do campo elétrico é uma função da diferença de potencial aplicada (V) dividida pelo comprimento total do capilar (L):

$$E = \frac{V}{L} \quad (2)$$

Potencial e corrente estão relacionadas pela lei de Ohm ( $V = Ri$ ) onde a resistência “R” é o inverso da condutância “G”. A condutância de um segmento de solução imersa em um campo elétrico “E” é diretamente proporcional à seção de área transversal “A”, perpendicular ao vetor campo elétrico, e inversamente proporcional ao comprimento “L” do segmento. A constante de proporcionalidade é chamada de condutividade,  $k$ , e é uma propriedade intrínseca da solução:

$$G = \frac{kA}{L} \quad (3)$$

Uma vez que a corrente que atravessa a solução é gerada pelo movimento independente de diferentes espécies, a condutividade é de fato uma soma das contribuições de todas as espécies iônicas  $i$ . Cada espécie contribui para a condutividade total de maneira proporcional a sua concentração  $C_i$ , magnitude da carga  $z_i$  e mobilidade  $\mu_i$ :

$$k = F \Sigma (|z_i| \mu_i C_i) \quad (4)$$

onde “F” é a constante de Faraday<sup>46</sup>.

O íon, na presença de um campo elétrico, é inicialmente acelerado até que forças de atrito, entre outras (por exemplo, o retardamento e a relaxação), contrabalançam a 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 a carga do íon  $z_i$ , a carga elementar “e”, e o campo elétrico:

$$|F_{elétrica}| = |z_i| e E \quad (5)$$

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

$$F_{atrito} = 6\pi\eta r_i v_i \quad (6)$$

onde  $\eta$  é a viscosidade do meio,  $r_i$  é o raio iônico efetivo da espécie química iônica e  $v_i$  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:

$$|z_i| e E = 6\pi\eta r_i v_i \quad (7)$$

Para efeito de simplificação, a contribuição das forças de retardamento e relaxação ao movimento final do íon será ignorada. Assim, a mobilidade iônica pode ser aproximada pela combinação das equações 1 e 7<sup>(46)</sup>:

$$\mu_i = \frac{|z_i| e}{6\pi\eta r_i} \quad (8)$$

O produto ( $|z_i|e$ ), carga de cada íon, 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 iônica (eletroforética) podem ser decorrentes de diferenças na razão carga/raio das espécies químicas. Carga alta e pequeno tamanho de íon gera alta mobilidade enquanto que a baixa mobilidade é gerada por pequena carga e grande raio iônico<sup>48</sup>.

Os valores das mobilidades eletroforéticas, usualmente encontradas na literatura, são constantes físicas determinadas para solutos de carga completa e extrapolada para diluições infinitas. Esse valor usualmente difere do que é obtido experimentalmente, sendo essa mobilidade chamada de mobilidade efetiva que é freqüentemente dependente do pH da solução e da composição do tampão de corrida. A diferença entre mobilidade efetiva e a mobilidade absoluta pode ser explicada, usando o exemplo de dois solutos que são ácidos fracos e que tem a mesma mobilidade eletroforética. Pelos valores tabelados, estes solutos seriam inseparáveis já que possuem migração igual. Entretanto essas espécies tem diferentes valores de  $pK_a$  e diferentes mobilidades (absolutas) dependendo do pH (controle de carga)<sup>47</sup>.

### 3.1.1. Fluxo eletrosmótico

Um constituinte fundamental nas operações de CE é o fluxo eletrosmótico (EOF). EOF é o volume de líquido que percorre o capilar em consequência do campo elétrico aplicado sobre a solução que contém uma dupla camada elétrica. Para que ocorra o EOF a parede do capilar precisa estar carregada<sup>42,46,47,48</sup>.

Entre os vários materiais utilizados na fabricação de capilares, a sílica fundida, uma forma pura de dióxido de silício amorfo, tem encontrado maior sucesso. 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<sup>-</sup>), 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*. A dupla camada elétrica é dividida em duas regiões, uma região mais compacta (camada de Stern) formada por íons firmemente ligados a

superfície do capilar (são atraídos por forças eletrostáticas e/ou de coesão), e outra região que contém íons que se difundem para o seio da solução afastando da superfície e formando a camada difusa da dupla camada elétrica. A Figura 9 mostra um esquema da dupla camada elétrica<sup>46</sup>.

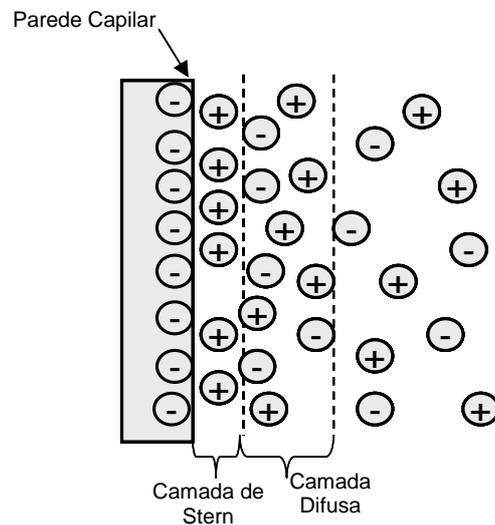


Figura 9: Esquema da dupla camada elétrica no capilar.

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<sup>-</sup>), 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 eletroosmótico<sup>46,47</sup>.

Os contra-íons (cátions em muitos casos), que se aproximam da dupla camada elétrica para manter o balanço de cargas criam um potencial diferente perto da parede do capilar chamado de potencial zeta ( $\zeta$ ). A magnitude do EOF pode ser expressa em termos da velocidade ( $v$ ) ou mobilidade ( $\mu$ ) por:

$$v_{\text{EOF}} = \left( \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) E \quad \text{ou} \quad \mu_{\text{EOF}} = \left( \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \quad (9)$$

onde  $v_{\text{EOF}}$  é a velocidade do EOF,  $\mu_{\text{EOF}}$  é a mobilidade do EOF,  $\zeta$  é o potencial zeta e  $\epsilon$  é a constante dielétrica<sup>47</sup>.

O potencial zeta é proporcional a densidade de carga na parede do capilar, o qual é dependente do pH. Conseqüentemente, a mobilidade do EOF varia de

acordo com o pH do tampão. 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. O potencial zeta também é dependente da força iônica do tampão, pois quando a força iônica aumenta, a dupla camada elétrica pode ser comprimida, o qual resulta em uma diminuição do potencial e reduz a mobilidade do EOF<sup>47,48</sup>.

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. Neste contexto, tiram-se vantagens das alterações de pH, da concentração e força iônica da solução tampão, do tipo e concentração de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, assim como alteração na viscosidade do solvente, constante dielétrica e temperatura. Outra forma efetiva de alterar, ou mesmo inibir o EOF, consiste em modificar a composição química do material do capilar e, portanto sua densidade de carga superficial. Nesse contexto, outros materiais têm sido testados, como vidro e Teflon. Outra possibilidade consiste em alterar a natureza da superfície interna do capilar, através de revestimentos físicos e/ou métodos de derivatização. A aplicação de um campo elétrico externo, transversal ao capilar é mais uma maneira de manipular o EOF<sup>46</sup>.

Quando a  $v_{EOF}$  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  $v_{EOF}$ . O perfil linear implica que o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os solutos, independente da sua posição radial. Esta peculiaridade distingue a eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresenta um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão<sup>46,47</sup>. A existência do fluxo eletrosmótico tem importantes implicações práticas na eletroforese capilar. Esse fluxo de solução contribui significativamente para a automação da técnica, permitindo a introdução de amostra e a detecção diretamente no capilar.

### 3.2. Instrumentação

A instrumentação da eletroforese capilar pode ser explicada e representada de uma maneira bastante simples (Figura 10). O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, tubo capilar (sílica fundida é o material mais comumente empregado), 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  $\mu\text{A}$ . 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<sup>46</sup>.

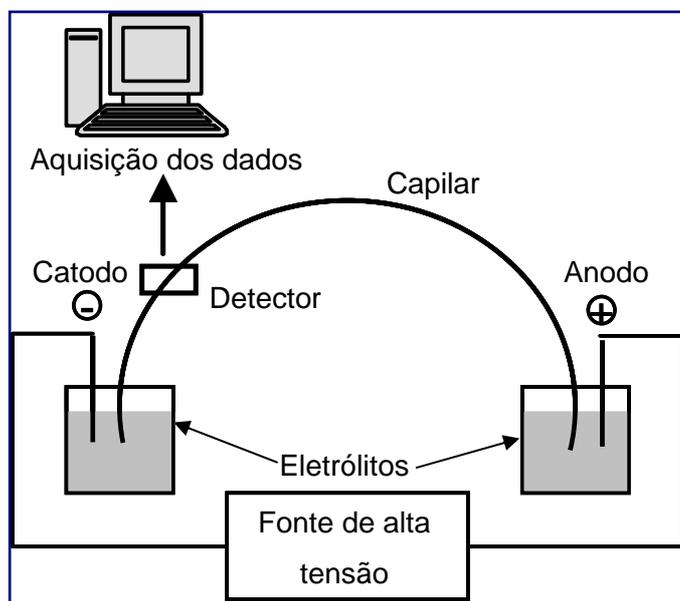


Figura 10: Esquema de um instrumento para eletroforese capilar (adaptado da ref 4).

### 3.3. Modos de injeção da amostra

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. Como regra geral, esse comprimento deve ser inferior a 1 ou 2% do comprimento total do capilar, isso corresponde a alguns milímetros de amostra injetada ou entre 1 e 50 nL de volume de amostra, dependendo do comprimento e diâmetro interno do capilar. Isso se torna uma vantagem quando se dispõe de pequenos volumes de amostra cuja diluição não é possível<sup>47</sup>. Sobrecarga de amostra dentro do capilar pode ter dois efeitos significantes, ambos prejudiciais para a resolução. Injeção de grandes quantidades de amostra causa difusão descontrolada da zona de amostra ampliando assim a largura dos picos, e poderá causar também a heterogeneidade do campo elétrico ao longo do capilar e distorcer o formato dos picos devido à diferença de condutividade entre o tampão de corrida (eletrólito de corrida) e a zona de amostra<sup>42</sup>.

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 eletrocínéticos ou hidrodinâmicos. Na injeção eletrocínética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do compartimento do capilar por um período de tempo conhecido, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. Gradiente de pressão 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<sup>46</sup>.

A injeção hidrodinâmica (usada nesse trabalho) introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra. O volume de injeção (da ordem de nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão (eletrólito de corrida) e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocínética porque é baseada estritamente na transferência de volume (a reprodutibilidade de área é de aproximadamente 1% do desvio padrão relativo). Entretanto, pode ocorrer um alargamento significativo da zona, como resultado do perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de eletroforese de zona

em solução livre e micelar, particularmente quando a concentração da amostra está dentro dos limites de sensibilidade do detector. Na injeção eletrocinética, a amostra é introduzida no capilar como resultado da combinação entre as velocidades eletroforéticas e eletroosmótica. Assim sendo, a quantidade de material injetado é função da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e meio condutor, assim como da magnitude do EOF. Uma importante consequência da aplicação deste modo de injeção é a amostragem não representativa, já que os componentes da amostra têm diferentes mobilidades. A injeção eletrocinética é mais aplicada em eletroforese capilar em gel, onde a injeção de volumes é impossível<sup>46</sup>.

### **3.4. Concentração da amostra no capilar**

Uma das principais desvantagens da eletroforese capilar é em relação a sua baixa sensibilidade, resultante das pequenas dimensões da coluna de separação (capilar) e de amostra. Existem duas formas de se obter melhores sensibilidades, uma é melhorar 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 no capilar denominada “empilhamento”<sup>42</sup>.

Empilhamento (stacking) é o nome dado ao método que realiza a concentração da amostra dentro do capilar durante ou imediatamente após a injeção da amostra. Esse método é baseado na diferença da intensidade do campo elétrico entre a zona de amostra e o eletrólito de corrida. O fenômeno de empilhamento de amostras em eletroforese capilar foi provavelmente sugerido pela primeira vez por Tiselius e colaboradores em 1965 com o uso da eletroforese em gel de poliacrilamida<sup>49, 50</sup>.

Na literatura diferentes técnicas para realizar o “empilhamento” têm sido discutidas. Geralmente essas técnicas podem ser divididas em duas de acordo com o movimento da zona de amostra no eletrólito de corrida: (i) empilhamento por fronteira móvel, onde toda a zona de amostra migra com mesma velocidade e (ii) empilhamento por fronteira estacionária, onde a fronteira entre uma amostra preparada em eletrólito de baixa concentração (baixa condutividade) e o eletrólito de corrida de maior concentração (alta condutividade) permanece

estável durante o processo de eletroforese<sup>42</sup>. A concentração da amostra no capilar pode ser feita tanto por injeção hidrodinâmica (gravidade ou pressão) quanto por eletrocínética (diferença de potencial)<sup>49</sup>.

O empilhamento da amostra amplificada por campo (FASS, acrônimo de Field Amplified Sample Stacking) é um exemplo do segundo tipo de empilhamento que pode ser aplicado em CZE. Esta abordagem foi introduzida por Chien and Burgi em 1991<sup>51,52,53</sup> após Mikkers *et al.*<sup>53</sup> terem estabelecido seus princípios teóricos em 1979. Esta técnica permite injetar no capilar grande volume de amostra quando comparada com o modo convencional de CZE<sup>51</sup>. No modo FASS um grande plug de amostra contendo íons preparados em solução de baixa condutividade é injetado hidrodinamicamente para dentro do capilar cheio com eletrólito de corrida de alta condutividade. A diferença de potencial é então aplicada para que ocorra a eletroforese. Devido à diferença de condutividade entre os meios (eletrólito de corrida e amostra) dentro do capilar, a força do campo elétrico será maior na região da amostra do que no resto do capilar. Os íons inseridos na região de baixa condutividade irão sofrer uma intensa força de campo elétrico e irão mover com maior velocidade do que os íons inseridos na região de alta condutividade (Figura 11a). Quando os íons atingem a região de baixo campo elétrico (região do eletrólito de corrida) sua velocidade diminui, ocorrendo assim o empilhamento dos íons no tampão de corrida<sup>42</sup> (Figura 11b). O modo de concentração no capilar descrito acima é também denominado modo de empilhamento normal (NSM) sendo o mais simples dos métodos de empilhamento por campo amplificado. Uma limitação desse modo está na quantidade de amostra que pode ser injetada no capilar sem perder a resolução da separação. A concentração do limite de detecção com o uso do modo NSM pode ser reduzida em pelo menos uma ordem de grandeza<sup>49</sup>.

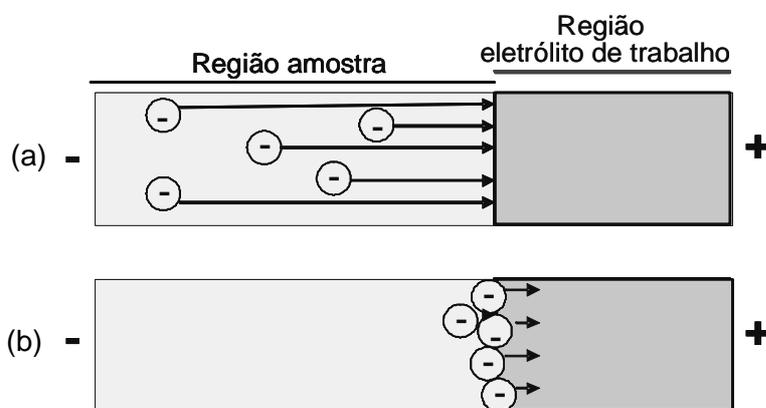


Figura 11: Esquema geral do modo de empilhamento de uma amostra aniônica.

Para que o limite de detecção alcance valores de concentração menores, se faz necessária a aplicação de outros modos de empilhamento, como por exemplo, o modo de empilhamento onde se aplica inversão da polaridade do eletrodo (REPSM, acrônimo de Reverse electrode polarity stacking mode). Pelo modo REPSM fatores de concentração maiores que 100 são obtidos<sup>49</sup>. No modo REPSM uma grande quantidade de amostra é injetada para dentro do capilar, para manter a eficiência da separação e minimizar a dispersão da zona de amostra, a matriz de baixa condutividade precisa ser retirada de dentro do capilar logo após o processo de empilhamento, isso ocorre pela aplicação de um potencial de polaridade inversa ao potencial de separação. A remoção da matriz é necessária para que a força do campo elétrico e a  $v_{EOF}$  sejam uniformes durante o processo de eletroforese. O processo de remoção da matriz do capilar envolve as seguintes etapas: (i) Primeiro o capilar é preenchido com o eletrólito de corrida e então os analitos dissolvidos em matriz de baixa condutividade são injetados hidrodinamicamente; (ii) Imediatamente após a injeção da amostra, a polaridade dos eletrodos é invertida, como a parede de sílica está carregada negativamente, íons da amostra carregados negativamente irão parar (empilhamento) na parte de trás da zona do tampão (eletrólito de corrida) e irão migrar em direção ao lado da injeção (eletrodo negativo) sob orientação do campo elétrico invertido; (iii) Quando a matriz da amostra foi quase completamente retirada do capilar, a qual pode ser monitorada pelo valor da corrente elétrica, a polaridade dos eletrodos é retomada. A matriz é retirada nesse processo pelo EOF; (iv) Ocorre então a separação e detecção dos analitos negativos que foram concentrados<sup>42</sup>.

Os fenômenos descritos acima são válidos para os analitos que possuem cargas, pois os analitos neutros não possuem mobilidade eletroforética. Para resolver este problema o empilhamento tem que ser realizado com a presença de micelas aniônicas, que interagem com as moléculas neutras que podem assim sofrer o processo de concentração no capilar<sup>51</sup>.

Em um capilar de sílica fundida o EOF migra em direção ao catodo (pólo negativo) e as micelas migram para o anodo (pólo positivo), geralmente, um forte EOF carrega as micelas carregadas negativamente em direção ao catodo (em pH maior que 5). A oposição das micelas ao EOF promove uma situação ideal para o empilhamento de moléculas neutras<sup>42</sup>. Na literatura podemos encontrar muitos trabalhos que fazem aplicações de empilhamento com o uso de micelas para pré-concentrar analitos neutros a fim de obter valores cada vez melhores de

sensibilidade para aplicação de metodologias analíticas baseadas na técnica de eletroforese capilar para uma miríade de novos analitos<sup>51,54,55</sup>.

Neste trabalho foi utilizado como modo de separação das moléculas neutras das estrobilurinas a MECC e o modo de empilhamento foi feito pelo modo NSM.

### 3.5. Detecção

A busca por melhorias no sistema de detecção em CE é um tema de intensa pesquisa, sendo as maiores dificuldades relacionadas com as pequenas dimensões do capilar e de volume de amostra. Um grande número de métodos de detecção que são utilizados em HPLC foram adaptados para CE, após pequenas modificações para se adaptar as dimensões dos capilares<sup>46,47</sup>.

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, onde a janela óptica é feita diretamente no capilar. Desse modo, a detecção ocorre em um momento onde a separação de espécies ainda está ocorrendo, ao contrário da cromatografia líquida, onde o processo de separação termina quando as espécies deixam a coluna cromatográfica. 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 dever 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 detecção<sup>47</sup>. No caso da sensibilidade, a dimensão do capilar impõe um fator limitante na lei de Beer-Lambert ( $A = \epsilon bc$ , onde "A" é absorvância, " $\epsilon$ " 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 à detectabilidade.

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 em CE no eletrólito de corrida). A lei de Beer-Lambert é beneficiada quando se trabalha com analitos com valores de  $\epsilon$  da ordem de  $10^4$  a  $10^5$  L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. 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. Valores típicos para limites de detecção com CE com detecção fotométrica na região do UV-Vis ficam na ordem de  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.<sup>42</sup>.

### 3.6. Cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC)

Como foi mencionado, na CE vários modos de separação podem ser efetuados com apenas pequenas mudanças de condições, particularmente no eletrólito de corrida. O modo de separação deve ser escolhido de acordo com as características químicas dos analitos, em especial, se ele possui ou não carga quando em solução. Nesse trabalho a cromatografia eletrocinética capilar micelar (MECC) foi escolhida como modo de separação para as estrobilurinas.

Os métodos eletroforéticos em solução livre (CZE) são limitados a separação de compostos que contém carga ou apresentam grande diferença em suas massas moleculares. MECC é o único modo de CE que é capaz de separar tanto os compostos neutros quanto os carregados sendo introduzida por Terabe *et al.* em 1984<sup>42,56</sup>.

A cromatografia eletrocinética (EKC) pertence a uma família de técnicas de separação com eletromigração que envolve fenômenos eletrocinéticos (eletroforese e eletroosmose) 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 *et al.*<sup>54</sup> 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. MECC é um caso especial de EKC, na qual a fase secundária é uma fase micelar dispersa no capilar<sup>56</sup>.

Em MECC, 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 que as micelas representam a fase pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletroose. Solutos neutros com diferentes coeficientes de partição ( $P_{mw}$ ) entre a fase aquosa (eletrólito) e a fase micelar podem ser separados<sup>42,56</sup> (Figura 12). Em MECC 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 ( $t_{mc}$ ). MECC 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. MECC 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 solvente<sup>42</sup>.

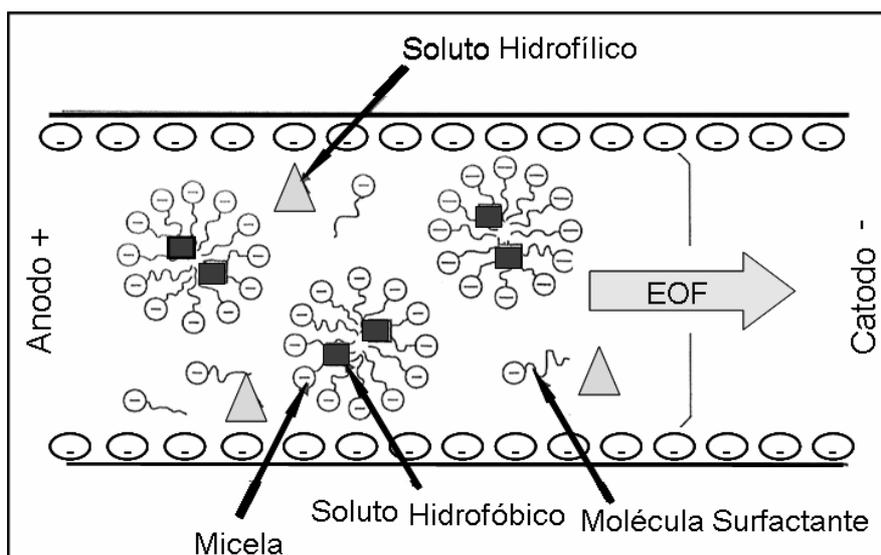


Figura 12: Esquema representativo da separação por MECC usando micelas aniônicas (adaptado da ref. 48).

### 3.6.1. 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 surfactantes 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 crítica micelar (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 hidrofílico<sup>42</sup>.

Os surfactantes que apresentam altos valores de CMC são inadequados para MECC, 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)<sup>46</sup>.

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, com isso sua velocidade de migração é diferente da solução eletrolítica o que favorece a interação analito-micela<sup>46</sup>. Para o sucesso da separação é necessário que essa interação seja diferente para os diversos solutos.

### 3.6.2. Migração em MECC

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  $v_{EOF}$  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 define uma janela de eluição em MECC. 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 eletroosmótica. 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 MECC 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 capilar<sup>42</sup> (Figura 13).

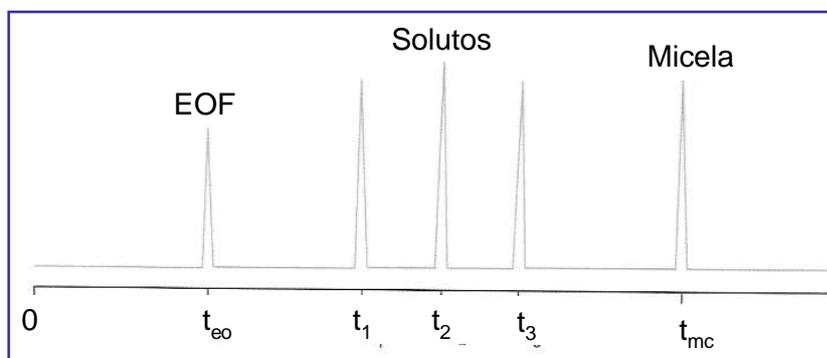


Figura 13: Esquema da janela de eluição em MECC (adaptado da ref 47).

### 3.6.2.1. Parâmetros de migração

O fator de retenção em MECC ( $k'$ ) é definido como a razão do número de moles de soluto na fase pseudo-estacionária (micela),  $n_{mc}$ , pelo número de moles na fase aquosa,  $n_{aq}$ <sup>46, 56</sup>.

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad (10)$$

O fator de retenção em MECC para analitos neutros pode ser determinado pelo tempo de migração usando<sup>46</sup>:

$$k' = \frac{t_r - t_{eo}}{t_{eo} \left[ 1 - \left( \frac{t_r}{t_{mc}} \right) \right]} \quad (11)$$

onde  $t_r$  é o tempo de migração do analito.

Esta expressão é muito similar a 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 MECC 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.

### 3.6.3. Resolução

A resolução  $R_s$  em MECC é dada por:

$$R_s = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \left[ \frac{1 - (t_{eo} / t_{mc})}{1 + (t_{eo} / t_{mc}) k'_1} \right] \quad (12)$$

onde  $N$  é o número de pratos teóricos,  $k'_1$  e  $k'_2$  são os fatores de retenção dos analitos 1 e 2, respectivamente e  $\alpha$  é o fator de seletividade dado por  $k'_1/k'_2$ .

A equação 12 difere da equação de resolução para cromatografia convencional apenas pela inclusão do último termo, o qual 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<sup>42,56</sup>.

Em cromatografia, a resolução aumenta com o aumento do fator de retenção. Em MECC, 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 eletrosmóptica 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 à  $t_r$  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 eletrosmótica ( $v_{osm}$ ) e eletroforética da micela ( $v_{eM}$ ). 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  $k'$ <sup>46</sup>.

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

$$k' = \beta K \quad (13)$$

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 MECC, a situação é diferente, o solvente orgânico afeta não só  $K$ , mas também  $\beta$ . 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 ampliar 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 análise.

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

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_{mc}}{t_{eo}} \quad (14)$$

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 MECC, esse número é pequeno em relação ao número de pratos considerado. Com outras técnicas que não tem a limitação da janela de eluição esse número de solutos separados seria maior<sup>46</sup>.

#### 3.6.4. Eficiência

Eficiência é a média de 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 podem ser obtido<sup>56</sup>.

Em MECC, 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 MECC. 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 MECC. 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 homogênea 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 MECC. 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 dispersão<sup>46</sup>.

### **3.6.5. Parâmetros experimentais relacionados com a otimização da resolução**

A escolha de vários constituintes químicos que devem estar presentes na análise por MECC influenciam na resolução da separação dos analitos. As escolhas do surfactante e do modificador adicionado ao eletrólito de corrida são os mais importantes parâmetros para aumentar a resolução. Outro parâmetro que afeta a resolução é a temperatura<sup>56</sup>. Alguns parâmetros experimentais estudados neste trabalho serão discutidos mostrando a importância de cada um na resolução.

#### **3.6.5.1. Escolha da micela – Surfactante aniônico**

Para a separação de analitos neutros, a micela usada em MECC deve ser iônica. O que mais se utiliza são surfactantes iônicos ou mistura de surfactantes iônicos e não iônicos. Os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes na molécula dos surfactantes têm influência direta na seletividade em MECC. O surfactante mais comum em MECC é o SDS, que foi utilizado neste trabalho. A micela de SDS é muito utilizada por ter formato esférico, com os grupos polares ficando na parte externa da micela e os grupos alquila constituindo o núcleo hidrofóbico. Quando um analito é incorporado na micela, três tipos de interações são possíveis: (i) o analito é adsorvido na superfície da micela por interação

eletrostática ou de dipolo; (ii) o analito comporta-se como um co-surfactante por partição na formação da micela; ou (iii) o analito é incorporado dentro do núcleo da micela. O efeito da estrutura molecular do surfactante na seletividade da separação pode deferir de acordo com o tipo de interação envolvida. O grupo hidrofílico, ou iônico, é geralmente mais importante na determinação da seletividade que o grupo hidrofóbico, mais analitos interagem com a superfície da micela. A diferença de seletividade em MECC entre vários surfactantes aniônicos é primariamente devido a interações de hidrogênio e um pouco de interações dipolar<sup>56</sup>.

### **3.6.5.2. Concentração e pH da solução tampão**

Em geral, a concentração do tampão, na qual a fase pseudo-estacionária é dissolvida não tem influência significativa na resolução, no entanto, o pH do tampão é um importante fator na manipulação da resolução de analitos ionizáveis. Um analito ionizado com a mesma carga da micela poderá ser incorporado dentro da micela de forma menos intensa do que um analito não ionizado. O fator de retenção de um ácido é a média dada pelo fator de retenção de sua forma não dissociada com o fator de retenção de sua forma dissociada. Assim, o coeficiente de distribuição, tempo de migração e resolução podem ser alterados por mudanças no pH para analitos ionizáveis. Se a amostra compreende somente analitos neutros, o pH do tampão terá pouco efeito na seletividade. A consideração que deve ser feita é selecionar um pH onde as moléculas de surfactantes estejam ionizadas (as micelas irão migrar em uma taxa diferente a do EOF) e que o EOF seja suficiente. O pH irá influenciar no tempo de migração das micelas e precisa ser otimizado para verificar a influência no tamanho da janela de migração<sup>48,56</sup>.

### **3.6.5.3. Temperatura**

O coeficiente de distribuição é dependente da temperatura, e seu aumento causa a redução do tempo de migração, pois o coeficiente de distribuição é diminuído. O aumento da temperatura também resulta em aumento da velocidade do EOF e das micelas na mesma proporção devido à redução da

viscosidade do eletrólito de separação. Existe também a dependência do coeficiente de distribuição (partição) dos solutos em função da temperatura. Conseqüentemente, a temperatura pode afetar a resolução. Embora, se a temperatura não tem um impacto significativo na seletividade e resolução tem forte efeito no tempo de migração. No entanto é importante manter a temperatura sempre constante para reprodutibilidade dos resultados<sup>56</sup>.

#### **3.6.5.4.**

##### **Adição de aditivos na fase aquosa**

Vários modificadores de fase móvel utilizados para cromatografia líquida são aplicados a MECC. Entre os aditivos mais utilizados temos solventes orgânicos, ciclodextrinas (CDs), reagente íon-par e uréia<sup>56</sup>. Nesse trabalho foi adicionado ao eletrólito de trabalho apenas solvente orgânico.

Solventes orgânicos miscíveis em água como metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) podem ser utilizados em MECC. Estes solventes orgânicos reduzem o fator de retenção e alteram a seletividade da separação. Quando esses solventes são adicionados na solução do eletrólito de trabalho alteram a polaridade da fase aquosa do eletrólito causando um aumento na atração do analito para essa fase. A alta concentração de solvente orgânico pode dividir a estrutura da micela, assim, é recomendado que a fração de volume não exceda 20% da composição. A adição de solvente orgânico na solução micelar reduz a  $V_{EOF}$  e, desse modo, estende a janela de migração aumentando a resolução. Um estudo para escolher a porcentagem de solvente deve ser realizado<sup>48,56</sup>.

### 3.7. Resultados e Discussão

#### 3.7.1. Composição do eletrólito

O primeiro estudo foi realizado com intuito de separar três estrobilurinas (azoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina) utilizando o método MECC, uma vez que os analitos são neutros em solução.

Em experimentos preliminares, usando  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  tampão borato (pH 8,5), observou-se que somente a interação analito-micela de SDS não era suficiente para que ocorresse a separação de componentes (Figura 14). Essas condições iniciais foram escolhidas com base nos procedimentos descritos na literatura para separação de outras espécies neutras por CE. Como a resolução pode ser melhorada pela adição de outras substâncias (aditivos) no tampão de análise, o solvente orgânico metanol foi testado, variando sua proporção entre 5 e 20%, em volume. A separação efetiva dos analitos ocorreu somente após a adição de 20 % de metanol ao eletrólito de trabalho (Figura 15). Uma porcentagem maior de solvente foi evitada por causa do possível efeito deletério na formação das micelas<sup>55</sup>.

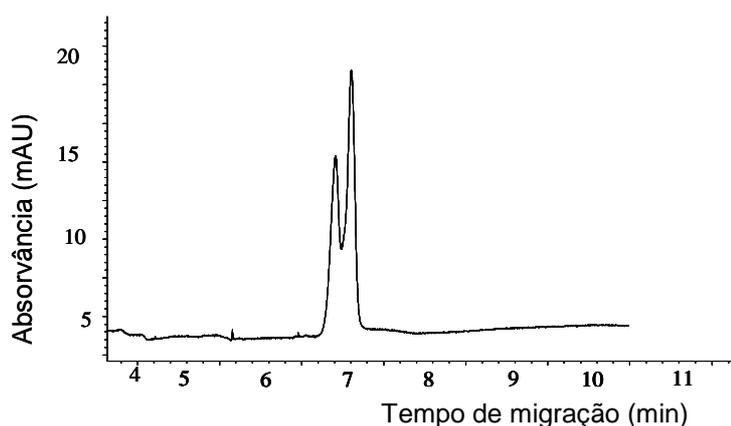


Figura 14: Análise de uma mistura padrão das estrobilurinas ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) pelo método MECC. Eletrólito de trabalho:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,5, capilar de sílica fundida de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$  d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 10 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de  $25^{\circ}\text{C}$  e detecção em 200 nm.

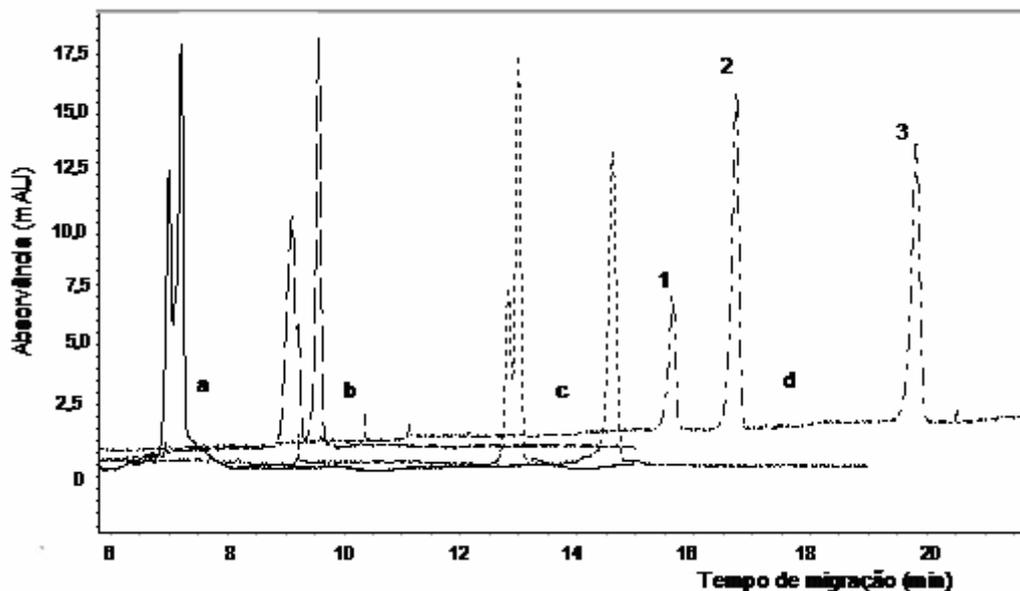


Figura 15: Separação das estrobilurinas em uma mistura padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,5, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  d.i., Injeção por pressão ( $50 \text{ mbar}$ ) por 10 segundos,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em  $200\text{nm}$ . Variação da porcentagem de metanol (a) 5, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 %. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

Verificadas as condições iniciais de contorno da solução de eletrólito, um estudo univariado dos parâmetros experimentais e instrumentais foi realizado para otimizar a separação desses analitos. O tempo de análise, representado pelo tempo de migração do último pico, e a resolução entre os picos foram as respostas avaliadas na escolha da condição experimental final.

O melhor pH do eletrólito de trabalho foi determinado através de um estudo com diferentes tampões em uma faixa de pH entre 6,00 e 10,0 usando variações de uma unidade. Os tampões utilizados foram: citrato (pH = 6,01), fosfato (pH = 6,02; 7,05; e 8,05) e borato (pH = 8,02; 9,08; 10,1). Os outros parâmetros foram mantidos constantes,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS e 20% de metanol. Como referência, foi utilizado o resultado obtido no estudo preliminar. Esse estudo mostrou que o melhor tampão realmente foi o borato nos pH 8,02 e 9,08. Na Tabela 1, esses resultados são resumidos.

Tabela 1: Resumo do tempo de migração dos analitos na otimização do pH do eletrólito.

Tampões	Tempo de migração (minutos)						
	Citrato		Fosfato		Borato		
pH	6,01	6,02	7,05	8,05	8,02	9,08	10,1
Analitos							
Azoxistrobina	X	X	17,5	19,0	16,0	13,5	14,0
Picoxistrobina	X	X	X	X	16,5	14,0	15,5
Piraclostrobina	X	X	X	X	19,7	16,0	18,7

X = não apareceu o pico referente ao analito durante um tempo de análise de 30 minutos.

Um ajuste fino de pH foi feito para o tampão borato, agora com variações, dentro da faixa entre 8,0 e 9,1, agora variando os valores de pH em intervalos menores. A separação dos três picos foi possível em todos os pHs testados dentro da faixa do tampão borato, mas um maior tempo de análise foi obtido com pH = 8,06. Entre pH 8,52 e pH 9,08 foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os tempos de separação dos picos, assim como nos tempo de análise (Figura 16). Assim, o pH em torno de 8,5 foi escolhido para os próximos testes. É importante salientar que durante o estudo com diferentes valores de pH, um condicionamento do capilar com solução eletrolítica em questão foi realizada antes da injeção no sentido de estabilizar o sistema.

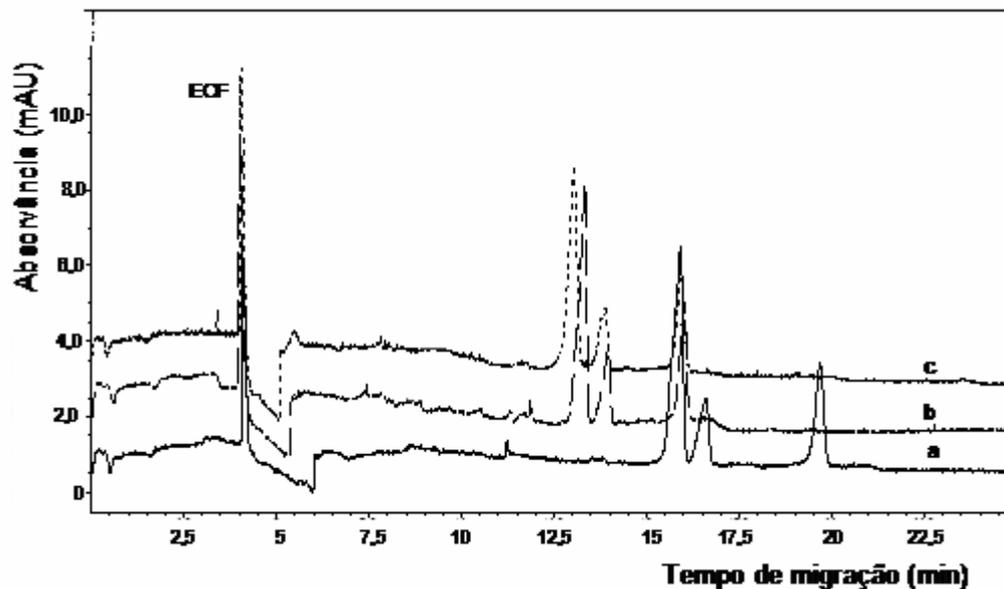


Figura 16: Estudo da influência do pH na resolução e tempo de análise. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup>, capilar de 50 cm x 75 µm d.i. Injeção por pressão por 10 segundos, V= 25kV, T= 25°C e detecção em 200 nm. Variação do pH em (a) 8,06, (b) 8,52 (c) 9,08. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

A presença de metanol no eletrólito de corrida mostrou ser importante na separação dos picos, mas outro solvente orgânico foi testado, a acetonitrila (ACN), para verificar qual seria a resposta em relação à resolução dos picos e tempo de análise. A faixa percentual de acetonitrila adicionada na solução do eletrólito de trabalho foi igual à faixa utilizada para o teste do metanol (5 – 20% v/v). A Figura 17a mostra que com 15% v/v de ACN na solução eletrolítica é possível a separação dos três picos de interesse. Com o solvente ACN o tempo de separação entre os picos do azoxistrobina e picoxistrobina foi maior e um menor tempo de análise foi obtido quando comparado ao resultado obtido com metanol (Figura 17b). A adição de solvente orgânico na solução eletrolítica altera a janela de migração e a resolução entre os picos. A concentração de 15% v/v de ACN na solução do eletrólito de trabalho foi a quantidade de modificador orgânico presente nos próximos testes.

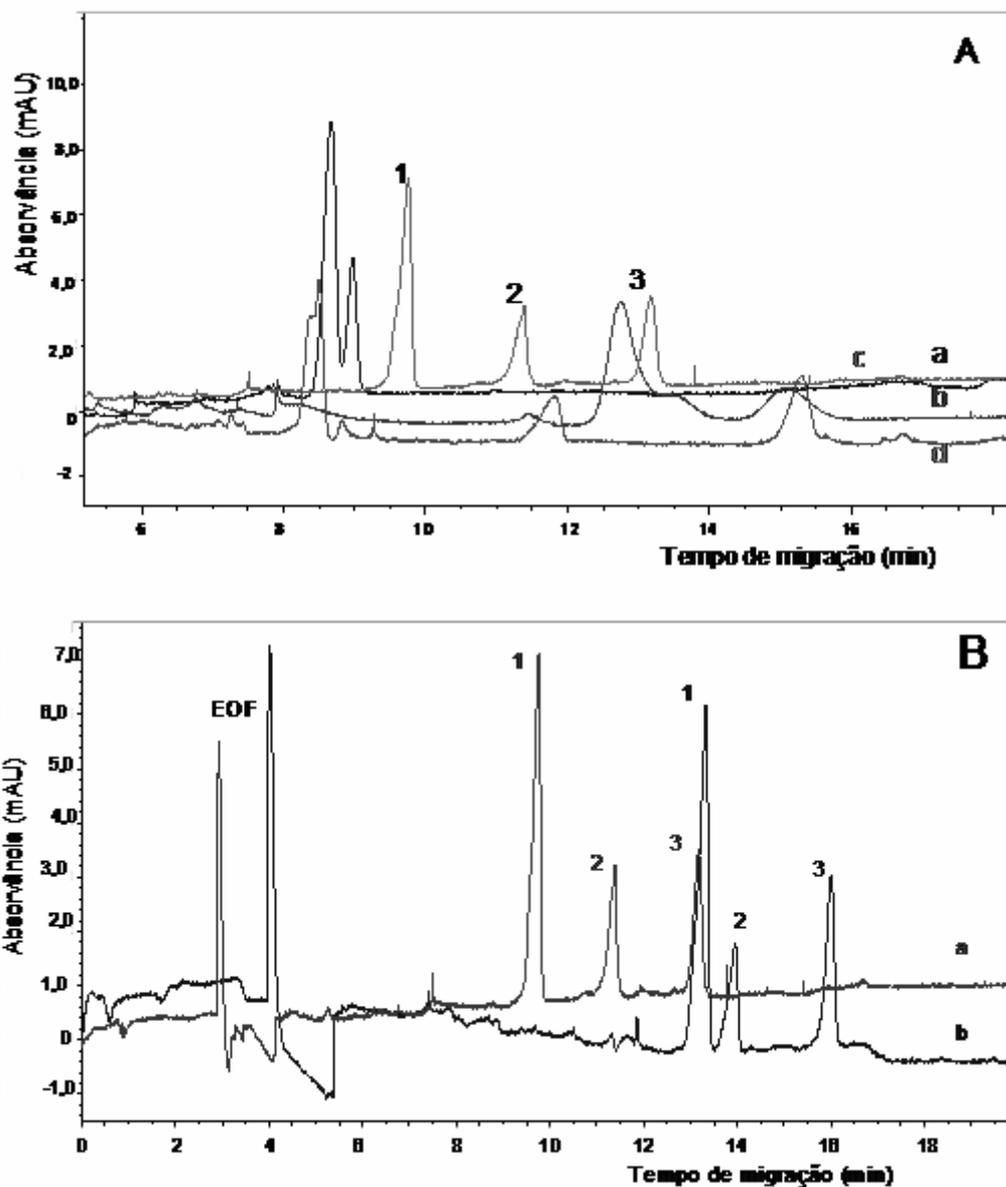


Figura 17: Comparação entre MeOH e ACN como modificador. Figura A: (a) 5, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 % de ACN. Figura B: (a) 15% de ACN e (b) 20% de MeOH. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,5, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., V= 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm injeção por 10 segundos. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

Em outro experimento, avaliou-se a influência da concentração do tampão borato no eletrólito de trabalho. O resultado obtido mostra que a concentração do tampão não tem grande influência na resolução dos picos e também no tempo de análise. A concentração de 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato foi escolhida para os próximos testes apenas por ter apresentado uma pequena melhora no formato dos picos (Figura 18).

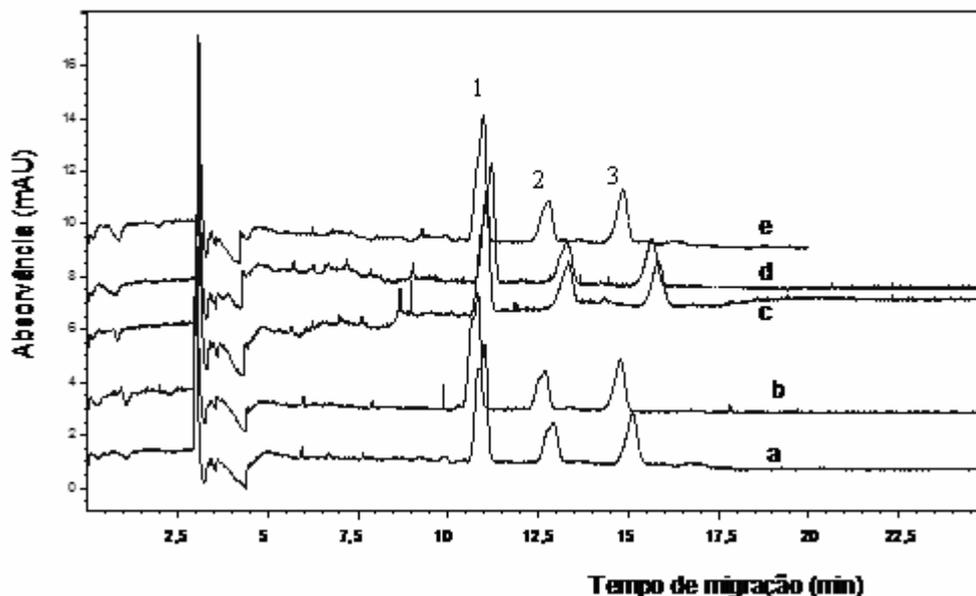


Figura 18: Variações na concentração do tampão. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Concentração de borato: (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 e (e) 50 mmol L<sup>-1</sup>. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

O efeito da concentração do surfactante (SDS) foi otimizado numa faixa entre 10-50 mmol L<sup>-1</sup> (faixa de concentração acima da CMC – 8,2 mmol L<sup>-1</sup> - do surfactante em água). O aumento da concentração de surfactante aumentou a janela de migração, melhorou a resolução e alterou a eficiência dos picos. Um aumento na concentração de SDS na solução eletrolítica provocou um aumento significativo no tempo de migração e um alargamento dos picos, diminuindo a eficiência da separação. Com uma concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup>, o tempo total da análise foi de aproximadamente 30 minutos, já com a concentração de 30 mmol L<sup>-1</sup> a análise teve um tempo total de aproximadamente 17 minutos, uma redução de 13 minutos, o que é mais viável para uma análise de rotina. Com a concentração de 30 mmol L<sup>-1</sup>, a eficiência dos picos foi melhor (Figura 19). Um dos efeitos de alargamento dos picos com o aumento da concentração de SDS está relacionado com o efeito de transferência de massa intermicelar do soluto, esse processo é lento e em concentrações maiores de surfactante a distância entre as micelas é ainda menor o que dificulta a eluição do soluto pelo capilar<sup>46</sup>. A concentração de 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS foi escolhida para os próximos testes.

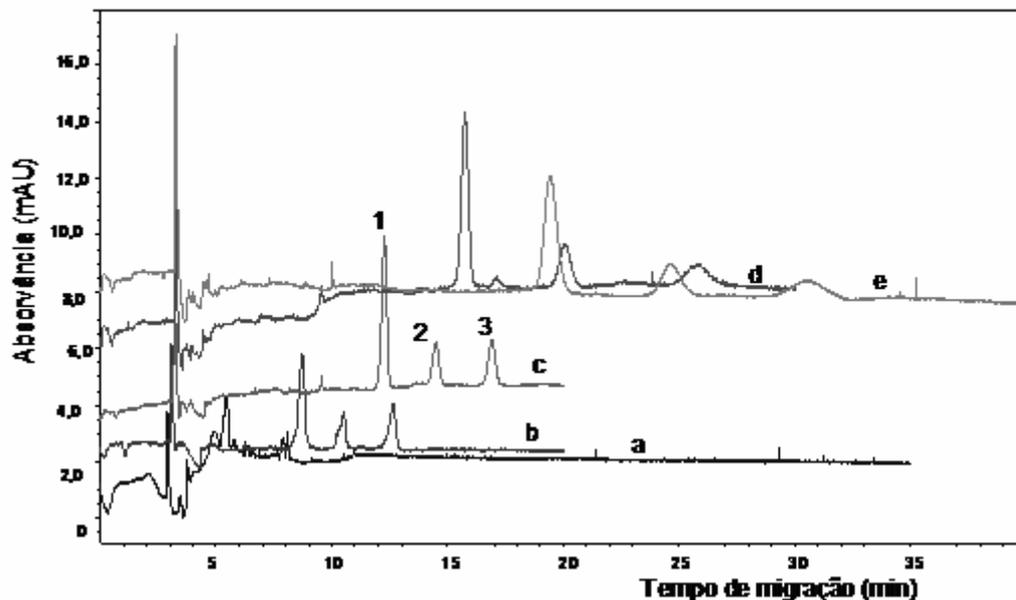


Figura 19: Variações na concentração do surfactante (SDS). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Concentrações de SDS (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 e (e) 50 mmol L<sup>-1</sup>. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

Os parâmetros instrumentais como temperatura, diferença de potencial e tempo de injeção da amostra também foram otimizados. A força do campo elétrico é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada (Equação 2) e EOF é diretamente proporcional a força do campo elétrico, sendo assim um aumento do potencial aplicado irá proporcionar maior intensidade do EOF e menor tempo de migração dos analitos, porém reduzindo a resolução entre os picos devido a diminuição da janela de detecção. A variação do potencial foi realizada entre os valores de 10 e 30 kV. A Figura 20 mostra que com o aumento da voltagem ocorreu realmente diminuição do tempo de migração do ultimo pico, mas também uma pequena redução entre os tempos de migração. Um potencial de 25 kV foi tomado como ótimo para os demais testes devido ao tempo de análise ser menor em relação à voltagem de 20 kV e melhor resolução quando comparada a 30 kV. A voltagem de 30 kV é a limite do equipamento, e o uso contínuo de altas voltagens pode afetar os constituintes do eletrólito e analitos na solução.

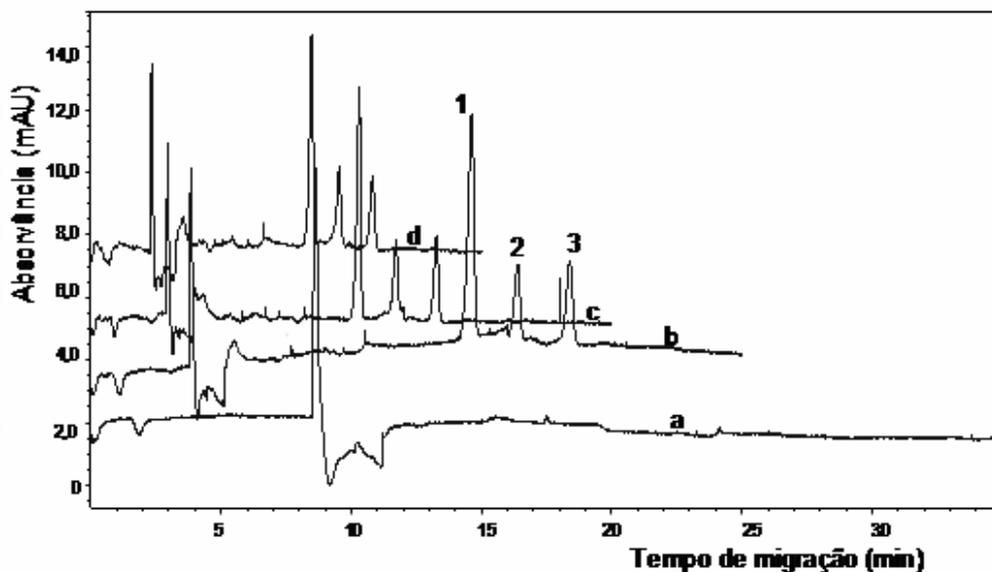


Figura 20: Variações no potencial aplicado. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 μm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Potenciais aplicados: (a) 10, (b) 20, (c) 25 e (d) 30 kV. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

O próximo parâmetro avaliado foi a temperatura, que deve ser mantida constante durante a análise. O aumento da temperatura leva a redução da viscosidade do tampão, com isso a velocidade do EOF e das micelas aumentam na mesma proporção. O tempo de migração dos picos será menor, mas pode afetar também a resolução. O estudo foi realizado na faixa entre 10 e 40°C. Os picos dos três analitos apareceram em todas as temperaturas estudadas, mas com temperatura de 40°C foi possível observar uma pequena deformidade nos mesmos. A temperatura de 25°C foi escolhida para o trabalho, por causa da separação entre os picos e também para garantir a estabilidade dos compostos em solução (Figura 21).

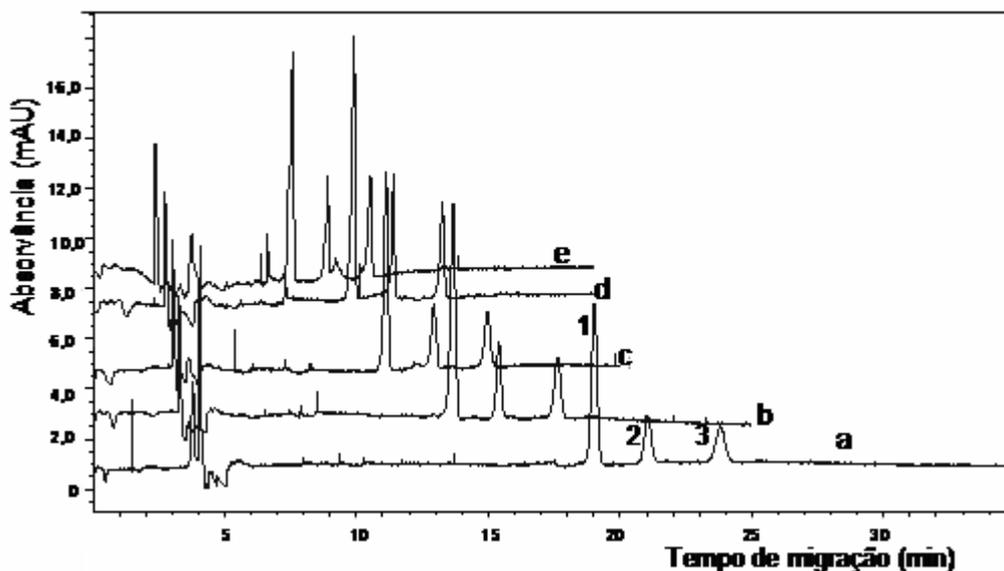


Figura 21: Variações na temperatura de análise. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Temperaturas estudadas: (a) 10, (b) 20, (c) 25 e (d) 30 e (e) 40 °C. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

O volume de amostra dentro do capilar é um fator crítico em CE. Um grande volume de amostra pode ampliar a largura dos picos e impedir a homogeneidade do campo elétrico ao longo do capilar<sup>42</sup>. O volume de amostra injetado depende, entre outros fatores, do tempo de injeção. Foi realizado um estudo para verificar o máximo de tempo que a amostra poderia ser injetada sem prejudicar a eficiência dos picos. O teste foi feito dentro da faixa entre 5 e 20 s. Apesar da área dos picos serem maiores com 20 s de injeção o tempo de 15 s foi escolhido como ideal para o método devido a melhor eficiência dos picos (Figura 22).

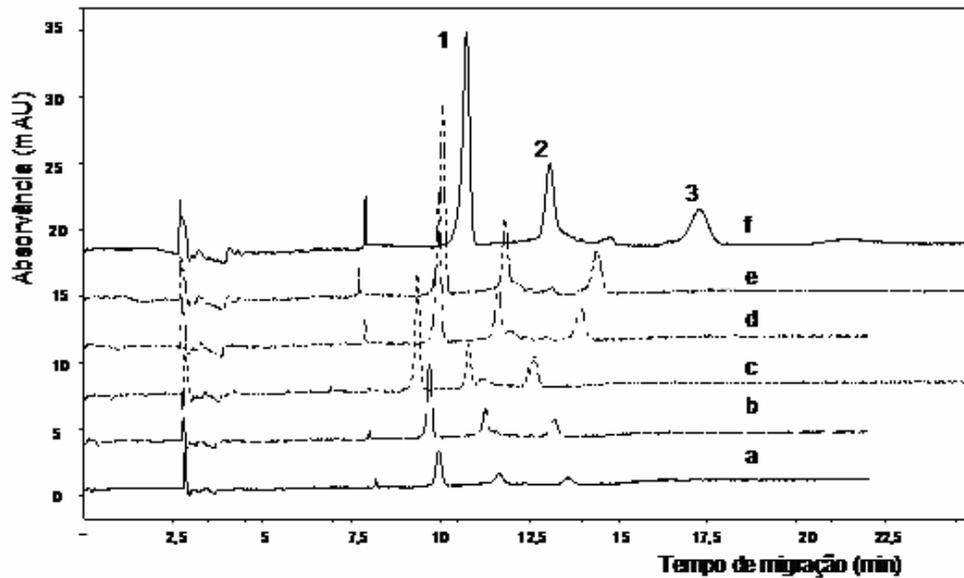


Figura 22: Variações no tempo de injeção. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Os tempos de injeção variaram em: (a) 5, (b) 7, (c) 10 e (d) 12, (e) 15 e (f) 20 segundos. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

Assim sendo, as condições de trabalho foram estabelecidas e são resumidas na Tabela 2. Vale lembrar que essas condições são aquelas que serão utilizadas nos trabalhos sem pré-concentração no capilar. Quando se utiliza a pré-concentração em linha pequenos ajustes de condição devem ser realizados.

Tabela 2: Resumo das condições ótimas de trabalho.

Parâmetros	Condição ótima
Tampão	40 mmol L <sup>-1</sup> de Borato
Surfactante	30 mmol L <sup>-1</sup> de SDS
Modificador orgânico	15% v/v de ACN
pH	8,50
Potencial	25 kV
Temperatura	25°C
Pressão injeção	50 mbar
Tempo de injeção	15 segundos
Tamanho capilar	50 cm comprimento total (42,5 cm até o detector)
Diâmetro interno do capilar	75 µm

A Tabela 3 apresenta os valores médios de tempos de migração, simetria e resolução obtidos com as condições escolhidas. Picos simétricos são obtidos quando a mobilidade dos analitos dentro do capilar é próxima a mobilidade do tampão. Outro fator que influencia na simetria é a concentração do tampão, se a concentração dos analitos é alta em relação aos íons do tampão o campo elétrico no capilar pode ser distorcido o que leva a picos irregulares. Para obter melhores resolução e formato do pico, a concentração do tampão deve ser aproximadamente 100 vezes maior que a concentração de analito injetada<sup>48</sup>. Na Tabela 3 os valores de simetria dos picos ficaram em torno de um valor ideal (1,0), o que indica um bom resultado ao longo das análises. A resolução foi calculada pela Equação 14, onde utilizou o critério da largura do pico a meia altura<sup>57</sup>.

$$R = 1,176 \left\{ \frac{(t_1 - t_2)}{w_{1(1/2)} + w_{2(1/2)}} \right\} \quad (15)$$

onde:  $t_1$  e  $t_2$  são os tempos de migração dos analitos 1 e 2,  $w_{1(1/2)}$  e  $w_{2(1/2)}$  são as larguras dos picos 1 e 2 calculadas a meia altura e 1,176 é o fator de multiplicação.

A resolução entre os picos referentes à azoxistrobina e picoxistrobina foi de 6,07 e entre os picos do picoxistrobina e piraclostrobina a resolução foi de 7,32, esses valores indicam uma resolução excelente entre os picos, pois o valor considerado como ótimo é igual a 1,5<sup>57</sup>.

Tabela 3: Valores médios do tempo de migração e simetria dos analitos na condição ótima.

Analitos	Tempo de migração (minutos)	Simetria	Resolução	
			1 e 2	2 e 3
1	10,5 ± 0,4	1,05 ± 0,09	6,07 ± 0,43	7,32 ± 0,43
2	11,4 ± 0,4	1,15 ± 0,10		
3	12,9 ± 0,5	1,03 ± 0,11		

Analitos: (1) Azoxistrobina; (2) Picoxistrobina e (3) Piraclostrobina. Resolução: 1 e 2 = resolução entre azoxistrobina e picoxistrobina; 2 e 3 = resolução entre picoxistrobina e piraclostrobina.

Depois de estabelecidas as condições de trabalho, foi feito um estudo para otimizar as condições de condicionamento e pré-condicionamento do capilar no início de cada dia e entre corridas para que um número máximo de análises sucessivas fosse realizado. Esses condicionamentos são fundamentais para se garantir a reprodução dos resultados e a capacidade do sistema em obter a separação de componentes. De fato, um dos problemas mais críticos da CE vem da falta de manutenção das condições de separação por períodos de tempo mais longos. A principal causa disso são as mudanças na dupla camada do capilar, alterações na solução causada pela aplicação de potencial elevado, entupimentos, criação de bolhas dentro do capilar. Testes foram realizados através da realização de eletroferogramas sucessivos de uma mesma amostra. O resultado foi avaliado como repetitividade das áreas dos picos e dos tempos de migração. Pequenos ajustes foram feitos, como por exemplo, alteração dos tempos de condicionamento do capilar com NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) e eletrólito de trabalho, como também a substituição dos *vials* contendo a solução eletrolítica utilizada na aplicação do potencial. O potencial aplicado várias vezes na mesma solução pode alterar a composição química dos constituintes do eletrólito. Os resultados mostraram que no início de cada dia o capilar deve passar por um sistema de condicionamento com as seguintes etapas: (ii) passagem de uma

solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> por 10 min, a solução é mantida dentro do capilar por 2 min; (ii) injeção de água no capilar por 10 min; (iii) injeção de solução eletrolítica por 2 min. Entre cada corrida, um pré-condicionamento do capilar foi necessário com as seguintes etapas: (i) injeção de água por 1 min; (ii) injeção de ACN por 0,3 min; (iii) injeção de água por 1 min; (iv) injeção de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) por 1 min e (v) injeção de solução eletrolítica por 2 min. Com tal procedimento aplicado entre corridas, foi possível realizar um total de oito eletroferogramas consecutivos com desvio padrão relativo percentual de aproximadamente 8% para as áreas dos picos e 5% para os tempos de migração. Depois das oito análises, foi necessário trocar os *vials* com as soluções eletrolíticas. No final do dia o capilar passou por um procedimento de limpeza com i) 5 min com água ultrapurificada; ii) 5 min com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> e iii) 5 min com solução água ultrapurificada:ACN 50:50% v/v, o capilar foi mantido com as extremidades imersas nesta solução para evitar entupimento entre dias de análise.

### 3.7.2. Cela de caminho óptico alongado

A absorvância das estribulirinas foi medida em 200 nm, como mostrado nos espectros de absorção dessas substâncias (Figura 23) o relativo fraco sinal analítico das estribulirinas estimulou a busca de abordagens para o aumento da sensibilidade. Com esse aumento de sinal a resposta de uma sensibilidade maior para o método seria alcançada, evitando a aplicação de método de pré-concentração off-line, o que muitas vezes é demorado, podendo, ao longo do processo, provocar interferências. Em busca do aumento da sensibilidade, o uso da cela de caminho óptico alongado foi testado.

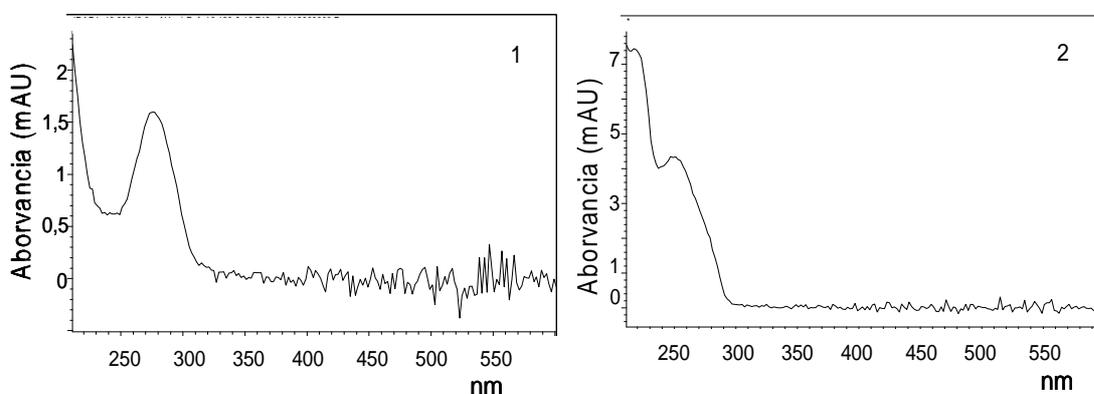


Figura 23: Espectro de absorção dos compostos piraclostrobina (1) e picoxistrobina (2).

Os testes com a cela de caminho óptico estendido indicaram realmente que a amplificação de sinal da ordem de dez vezes poderia ser alcançada, como pode ser verificado na Figura 24, onde as soluções-padrão contendo os analitos estão na mesma concentração ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). No entanto, o aumento do tempo de migração para 40 min e a dificuldade do uso dessa cela impediu o seu uso rotineiro nesse trabalho. O aumento do tempo de migração foi decorrente tamanho do capilar do kit de alta sensibilidade (72 cm de comprimento até a janela de detecção). Já a dificuldade de uso esteve relacionada com a montagem trabalhosa do aparato e a difícil adaptação da cela no capilar. Nesse caso, as extremidades do capilar precisam ser perfeitamente ajustadas dentro da cela para que a amostra passe pelo caminho óptico alongado. Esse ajuste requer muito cuidado e trabalho para que a cela possa ser utilizada em análise de rotina.

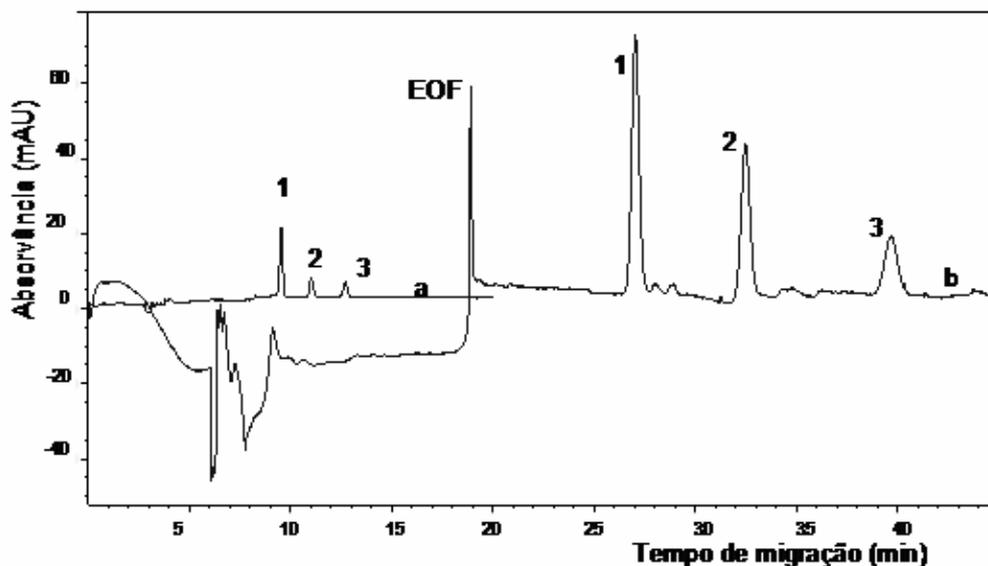


Figura 24: Diferença entre o uso da capilar normal e capilar acoplado a cela de caminho óptico alongado; (a) eletroferograma da solução padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) analisada no capilar normal e (b) eletroferograma da mesma solução padrão em capilar acoplado a cela de caminho óptico alongado. Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  d.i., injeção por 15 segundos,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em  $200 \text{ nm}$ . 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

### 3.7.3. Pré-concentração da amostra em linha

O procedimento de pré-concentração de analito em linha, foi realizado como indicado no trabalho de Pérez *et al*<sup>41</sup>. A pré-concentração NSM envolve a utilização de micelas carregadas negativamente, sendo o modo mais simples de pré-concentração de amostra no capilar (on-line). A pré-concentração da amostra no capilar envolveu a dissolução dos analitos em uma matriz de baixa condutividade em relação ao eletrólito de corrida, permitindo que o processo de acumulação em zona ocorra devido à diferença de campo elétrico entre as zonas de amostra e o tampão<sup>41</sup>.

A matriz de baixa condutividade onde os analitos foram dissolvidos foi otimizada com propósito de obter maior sinal analítico dos pesticidas. Os testes foram realizados dissolvendo a amostra em diferentes proporções de tampão borato e de água ultrapurificada. O maior sinal analítico foi obtido com preparação da amostra em tampão borato/água ultrapurificada (40 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,5) 50:50 % v/v. Após a otimização da matriz, o tempo de injeção da solução foi otimizado e o máximo de tempo de injeção que permitiu compromisso entre o melhor formato dos picos e maior sinal foi com 75 s. Com esse procedimento, o sinal analítico teve um aumento em área de aproximadamente 5 vezes em relação ao padrão injetado em modo normal. O tempo de migração dos analitos foi menor quando aplicado o modo de pré-concentração em linha (Figura 25).

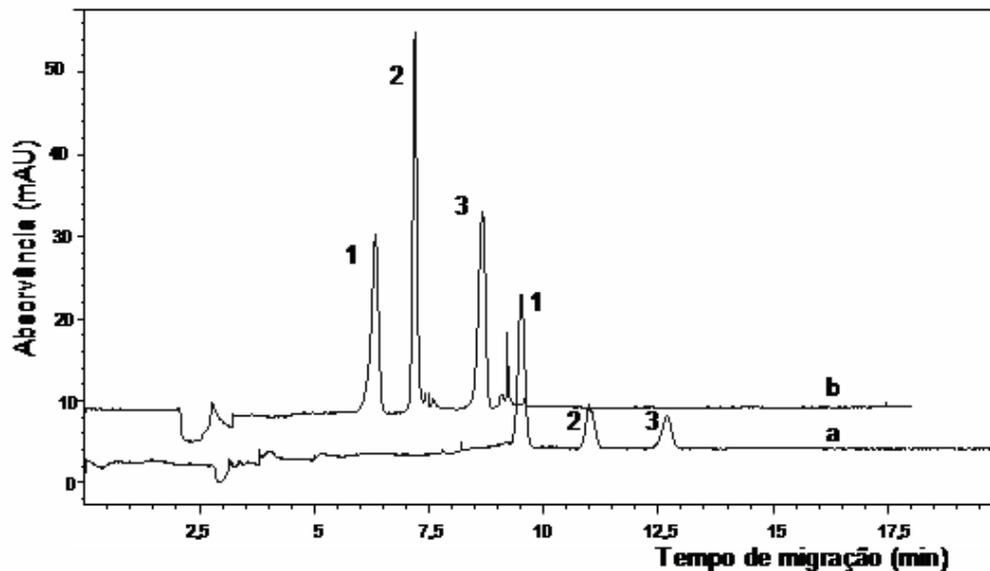


Figura 25: Aplicação da pré-concentração em linha em solução padrão dos pesticidas; (a) eletroferograma de uma solução padrão dos pesticidas (todos em  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) diluída em acetonitrila: água ultrapurificada 6:94% v/v; (b) eletroferograma no modo pré-concentração em linha da solução padrão dos fungicidas picoxistrobina e piraclostrobina (ambos na concentração  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e padrão interno (azoxistrobina -  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão de acordo com o modo de análise,  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em  $200 \text{ nm}$ . 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

### 3.7.4. Validação do método

Todo método analítico desenvolvido em um laboratório deve passar por processo de validação para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e adequados à qualidade pretendida. A validação de um método analítico é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. A ABNT, diz que a validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que o método atende os requisitos para uma aplicação ou uso específico<sup>58,59,62</sup>.

A orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos elaborada pelo INMETRO sugere que, quando aplicável, as seguintes características de desempenho sejam investigadas: especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção e

quantificação, exatidão e tendência, precisão, robustez e incerteza de medição<sup>59</sup>. Alguns parâmetros de validação para o método na determinação dos pesticidas picoxistrobina e piraclostrobina serão discutidos. A azoxistrobina foi utilizada como padrão interno para se tentar a melhoria do desempenho do método.

#### **3.7.4.1. Linearidade**

A linearidade de resposta para um método analítico é observada quando seus resultados são diretamente proporcionais às concentrações do analito nas amostras. A linearidade pode ser um comportamento natural do sistema ou pode ser forçada por meio de padronização interna, quando interferências de matriz ou variações na resposta causadas por variações de condições instrumentais de análise são observadas. A resposta linear é representada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real e pode ser observada graficamente através da curva analítica. Os parâmetros da curva (Equação 16) podem ser obtidos pela regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados (quando a variância é homogênea ao longo dos pontos amostrados - homoscedasticidade)<sup>59</sup> onde:

$$Y = aX + b \quad (16)$$

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

A padronização interna consiste na adição nas amostras e nas soluções-padrão de analito de quantidades conhecidas e constantes de uma substância denominada de padrão interno. Nesses casos, estabelece-se uma relação entre a resposta dos analitos nas amostras e nos padrões, sendo a relação de resposta mais comum a razão entre os sinais do analito e do padrão interno de concentração conhecida. O método de padronização interna é bastante útil, especialmente por compensar o efeito de pequenas mudanças em variáveis experimentais, oscilações de condição instrumental e perdas em processos de pré-concentração<sup>62</sup>. Para que essa estratégia funcione, o padrão interno deve ser uma substância com propriedades físicas e químicas semelhantes aos dos analitos de interesse, de modo a sofrer as mesmas variações de comportamento

do analito. Devem também ser espécies químicas que não deveriam ser encontradas na amostra.<sup>60</sup> O uso de uma estrobilurina (azoxistrobina) como padrão interno de outras (picoxistrobina e piraclostrobina) é interessante do ponto de vista do comportamento das espécies químicas, mas pode ser inconveniente do ponto de vista da ausência nas amostras. Assume-se aqui que as amostras para os quais esse método de padronização interna for utilizado deve ser necessariamente aquele onde a azoxistrobina é conhecidamente ausente.

De um modo geral, a linearidade de um método é avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Entretanto, também é necessário avaliar a homogeneidade das variáveis. Esta pode ser avaliada através de alguns testes estatísticos, como por exemplo, os testes  $t$  de Student, a prova  $F$  de Fischer, o intervalo de confiança do coeficiente angular e também pelo gráfico de resíduos<sup>61</sup>. A linearidade dos compostos picoxistrobina e piraclostrobina foi avaliada sem e com padronização interna.

#### **3.7.4.1.1. Linearidade da Picoxistrobina**

Na construção da curva analítica da picoxistrobina tanto com resposta não compensada como por resposta padronizada com padrão interno, as faixas lineares ficou no intervalo entre  $5,45 \times 10^{-7}$  a  $1,09 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Quando do uso da padronização interna, a azoxistrobina foi adicionada às soluções-padrões na concentração de  $1,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. A Figura 26 e a Figura 28 representam duas curvas analíticas da picoxistrobina obtidas em dias diferentes, para a padronização interna e sem considerar o padrão interno, respectivamente. Cada ponto da curva foi medido em triplicata.

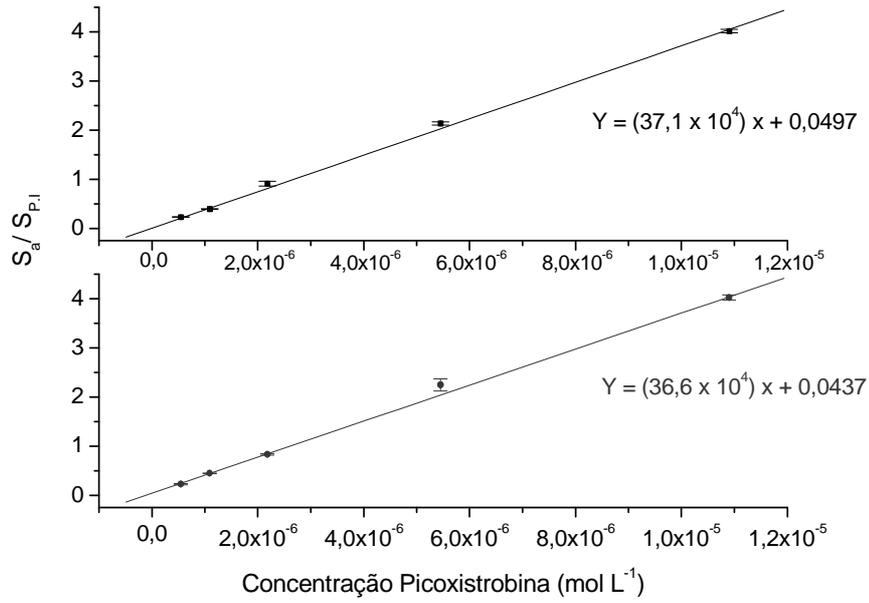


Figura 26: Curva analítica para picoxistrobina por padronização interna.  $S_a$  = área do analito e  $S_{p,i}$  = área padrão interno.

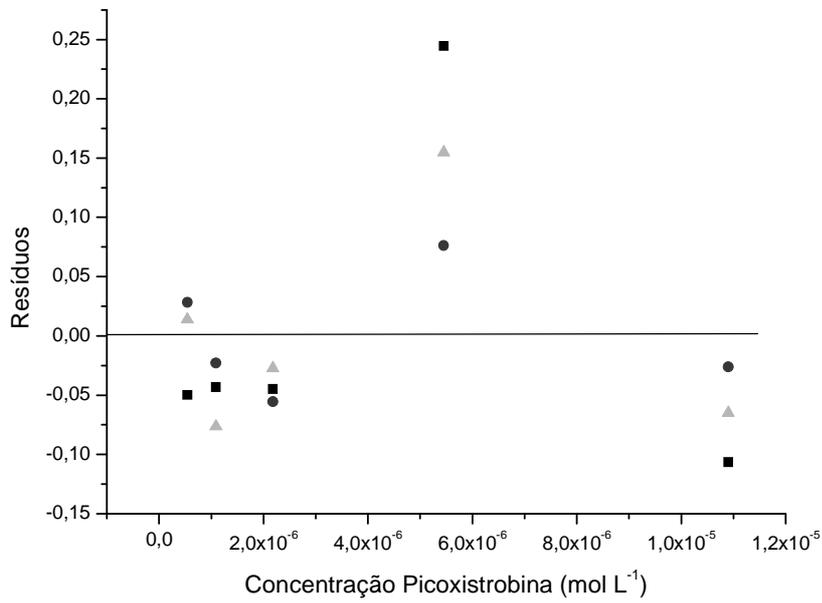


Figura 27: Gráfico de resíduo da picoxistrobina por padronização interna.

Tabela 4: Parâmetros das curvas analíticas da padronização interna.

Parâmetro	Curva 1	Curva 2
Coefficiente angular	$(36,6 \pm 0,6) \times 10^4$	$(37,1 \pm 0,9) \times 10^4$
Coefficiente linear	$(4,37 \pm 1,03) \times 10^{-2}$	$(4,97 \pm 1,88) \times 10^{-2}$
$R^2$	0,998	0,998
$R^2_{adj}$	0,998	0,995

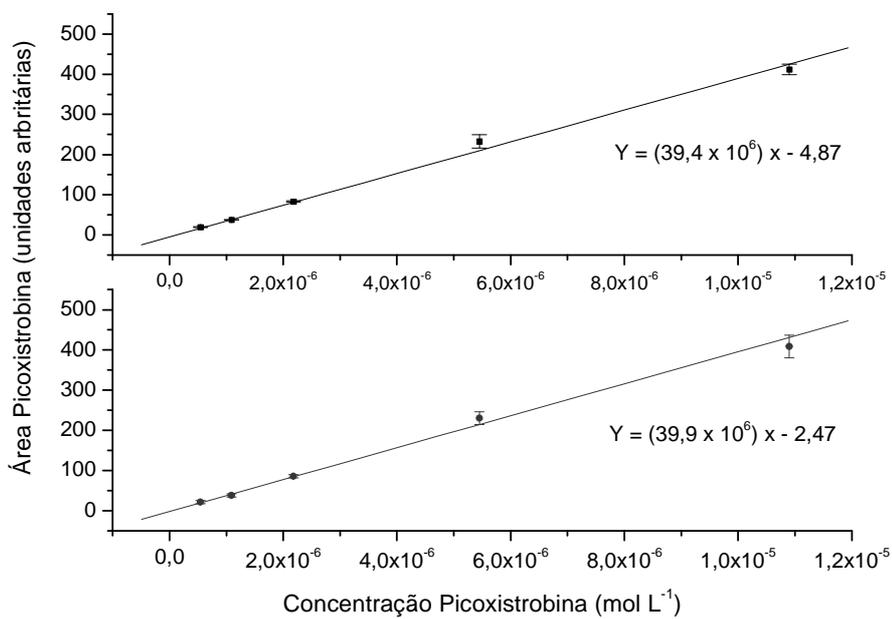


Figura 28 Curva analítica para picoxistrobina sem considerar o padrão interno.

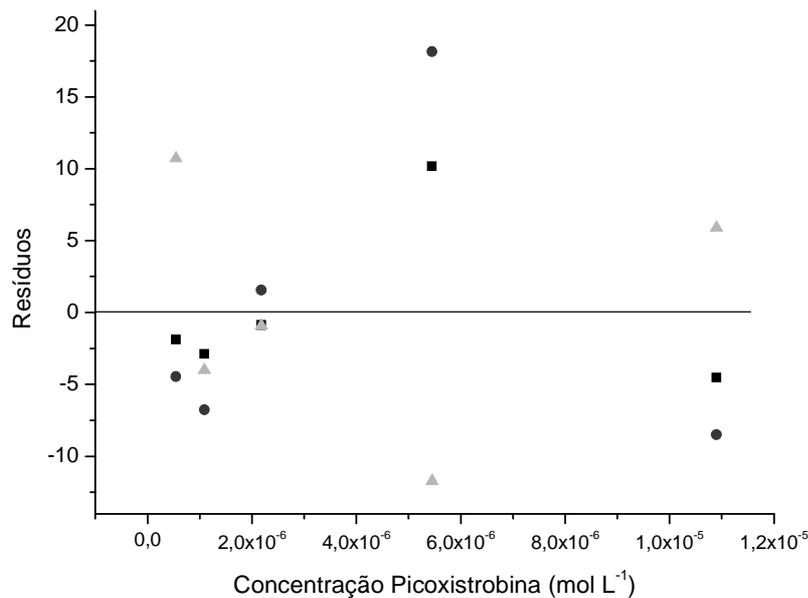


Figura 29: Gráfico de resíduos da curva analítica da picoxistrobina sem considerar padrão interno.

Tabela 5: Parâmetros das curvas analíticas da padronização sem padrão interno.

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Coefficiente angular	$(39,4 \pm 1,57) \times 10^6$	$(39,9 \pm 1,8) \times 10^6$
Coefficiente linear	$-5,84 \pm 1,80$	$-2,47 \pm 2,31$
$R^2$	0,994	0,998
$R^2_{adj}$	0,992	0,993

Nos dois casos (com e sem padronização interna), o comportamento linear foi indicado pelo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pelo coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ), superiores a 99% (Tabelas 4 e 5). Os desvios padrões 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 padrões dos coeficientes angulares representam à boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições. No caso dos gráficos de resíduos (Figura 27 e 29), o padrão de distribuição para o processo padronizado pode indicar falta de ajuste linear. Isso pode ser facilmente visto na curva, onde o ponto de concentração  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (meio da curva) está acima da melhor reta da regressão. No entanto, os coeficientes apontam valores próximos da unidade, fazendo-se aceitável assumir o risco de

considerar a resposta como linear. Adicionalmente, na ausência de padronização interna, o gráfico de resíduos aponta a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta, confirmando esta escolha pelo comportamento linear.

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 Equação 17.

$$F = MQ_{reg} / MQ_{res} \quad (17)$$

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-se a hipótese nula de não existência de relação linear, ou seja, se aceita a equação da regressão linear. Os resultados dos testes do picoxistrobina podem ser encontrados na Tabela 6. Como o valor calculado ( $F_{calc} = 1944$  e  $839$  na presença de padrão interno e  $F_{calc} = 529$  e  $606$  por padronização externa) foi muito superior ao valor crítico ( $F_{critico} = 10,3$ ) podemos dizer que o modelo linear é estatisticamente válido.

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. Como mostrado na Tabela 6, os valores de *t* calculados ( $t = 44,1$  e  $29,0$  para o picoxistrobina na padronização interna e  $t = 23,0$  e  $24,6$  para a padronização externa) são bastante superiores ao valor crítico ( $t_{0,05,4} = 2,776$ ), 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  $\alpha$  (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, no 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 a padronização interna quanto externa da picoxistrobina.

Tabela 6: Valores da análise da variância (ANOVA) para picoxistrobina.

Padronização interna	Curva 1	Curva 2
$F_{cal}$	1944	839
$t_{cal}$	44,1	29,0
$P_{cal}$	$2,57 \times 10^{-5}$	$9,04 \times 10^{-5}$
Padronização externa		
$F_{cal}$	529	606
$t_{cal}$	23,0	24,6
$P_{cal}$	$1,80 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-4}$

### 3.7.4.1.2. Linearidade da Piraclostrobina

As curvas analíticas para a piraclostrobina foram construídas da mesma forma anterior. A faixa linear ficou no intervalo entre  $4,90 \times 10^{-7}$  a  $1,12 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. O padrão interno (azoxistrobina) foi adicionado às soluções padrões na concentração de  $1,05 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. A Figura 30 e a Figura 32 representam duas curvas analíticas do piraclostrobina obtidas em dias diferentes, usando ou não a padronização interna. Cada ponto da curva foi medido em triplicata.

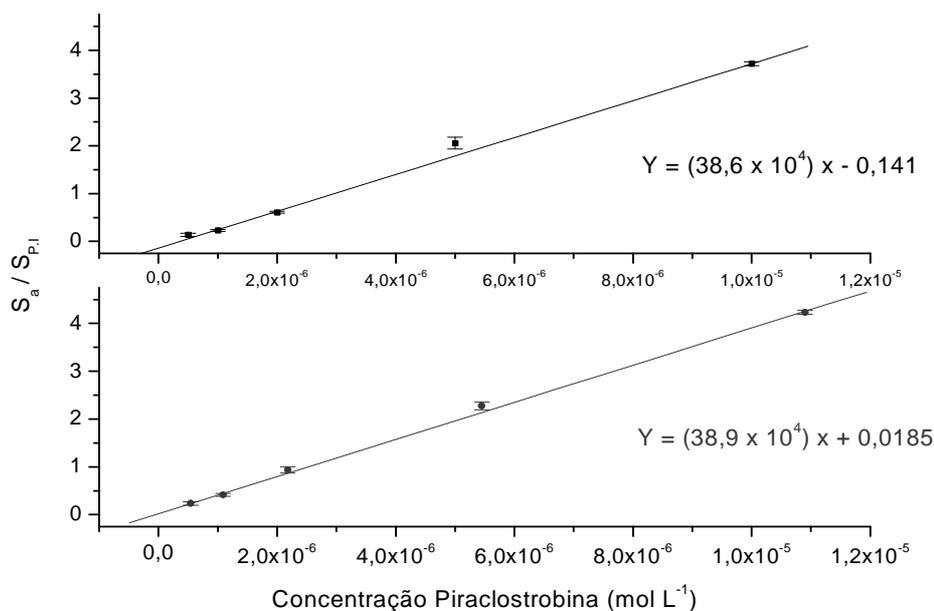


Figura 30: Curva analítica para piraclostrobina por padronização interna ( $S_a$  = área do analito,  $S_{P,I}$  = área padrão interno).

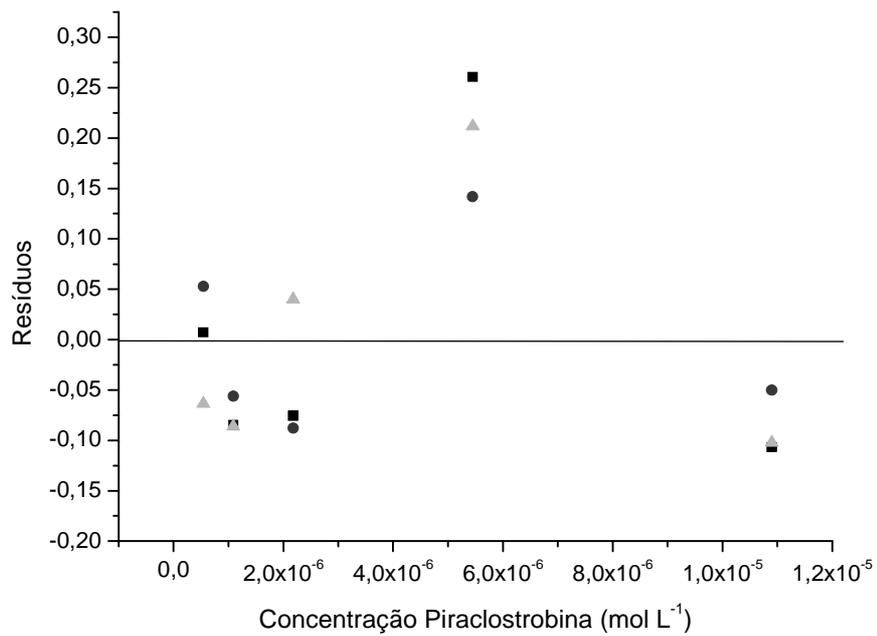


Figura 31: Gráfico de resíduos da curva analítica da piraclostrobina por padronização interna.

Tabela 7: Parâmetros das curvas analíticas da padronização interna da piraclostrobina.

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Coefficiente angular	$(38,6 \pm 1,0) \times 10^4$	$(38,9 \pm 0,6) \times 10^4$
Coefficiente linear	$-0,141 \pm 0,032$	$(1,85 \pm 3,36) \times 10^{-2}$
$R^2$	0,994	0,998
$R^2_{adj}$	0,992	0,998

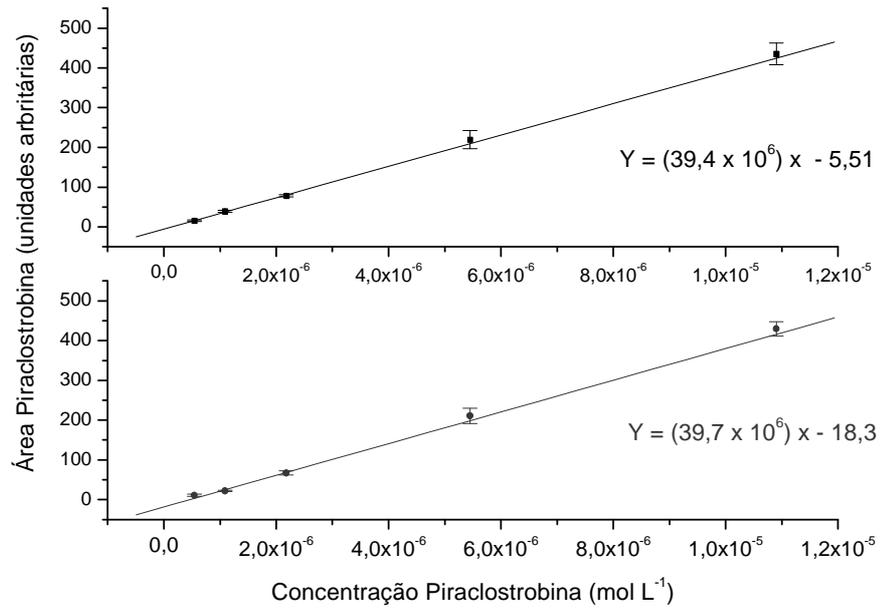


Figura 32: Curva analítica para piraclostrobina sem considerar o padrão interno.

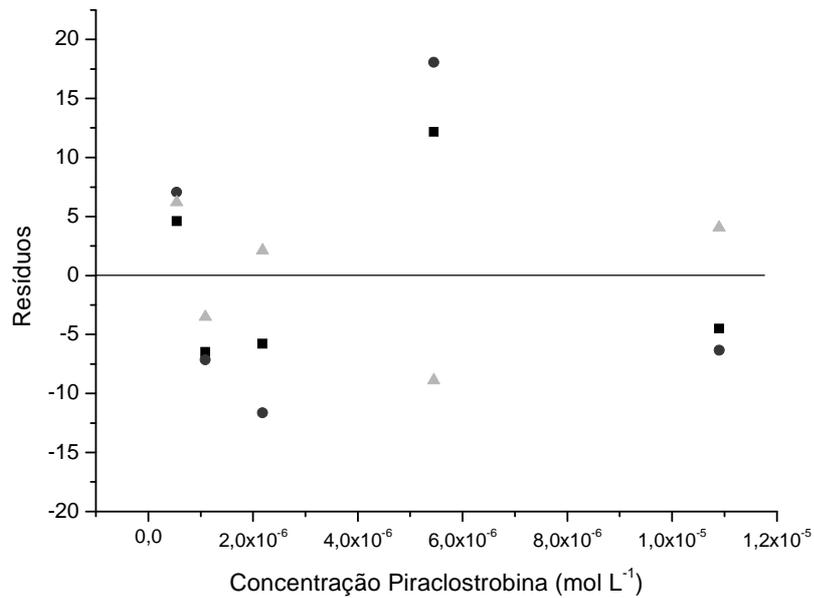


Figura 33: Gráfico de resíduos da piraclostrobina sem considerar o padrão interno.

Tabela 8: Parâmetros das curvas analíticas da piraclostrobina sem considerar o padrão interno.

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Coeficiente angular	$(39,4 \pm 1,2) \times 10^6$	$(39,7 \pm 3,04) \times 10^6$
Coeficiente linear	$-5,51 \pm 1,66$	$-18,3 \pm 4,4$
$R^2$	0,9996	0,9995
$R^2_{adj}$	0,9995	0,9988

O comportamento linear para a piraclostrobina foi obtido, como indicado pelos vários coeficientes ( $R^2$ ,  $R^2_{adj}$  e gráfico de resíduos), Tabela 7 e 8 e Figura 30 e 32 superiores a 99 % e pelos gráficos de resíduos. Os desvios padrão dos coeficientes lineares indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenada está muito próxima do valor zero. Os desvios padrões dos coeficientes angulares indicam que o método apresenta uma boa precisão intermediária das medições. Similarmente ao exposto para a picoxistronina, o gráfico de resíduos (Figura 31) aponta um comportamento não linear, mas essa informação foi ignorada em função de outros indicadores de linearidade, em especial, o gráfico de resíduos quando da ausência de padronização interna (Figura 33).

Similarmente aos testes realizados para a picoxistrobina, a adequação do modelo para piraclostrobina para ambos os casos foi avaliada pelos testes F e t de Student, assim como pelos valores de P, que indicaram ser linear para os dois casos estudados. A Tabela 9 apresenta os valores obtidos para F, t e P.

Tabela 9: Valores da análise da variância (ANOVA) para piraclostrobina.

Padronização interna	Curva 1	Curva 2
$F_{cal}$	471	1631
$t_{cal}$	21,7	40,4
$P_{cal}$	$2,14 \times 10^{-4}$	$3,34 \times 10^{-5}$
Padronização externa		
$F_{cal}$	9615	3377
$t_{cal}$	98,1	58,1
$P_{cal}$	2,34E-6	1,12E-5

### 3.7.4.2. Detectabilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, sendo representado pela inclinação das curvas analíticas. Os limites de detecção e de quantificação são critérios de avaliação de detectabilidade. O LD é a menor quantidade ou concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Existem vários critérios para a definição do LD. No caso de métodos instrumentais a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído-sinal da linha de base, conforme demonstrado na Equação 18, ou pela distribuição de Student, Equação 19, ou ainda por parâmetros da curva analítica (Equação 20)<sup>58,59</sup>.

$$LD = x + 3s_b \quad (18)$$

$$LD = x + ts_b \quad (19)$$

$$LD = 3 \times \frac{s_b}{a} \quad (20)$$

onde “x” é a média dos valores dos brancos e “s<sub>b</sub>” é o desvio padrão dos brancos e “t” é a abcissa da distribuição de Student (dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança) e “a” é a inclinação da curva analítica.

Nesse trabalho o critério utilizado para calcular o LD, foi através de medições realizadas com a amostra contendo a menor concentração de analito que poderia ser distinguida do sinal de ruído da linha base. Esse método para se obter s<sub>b</sub> foi adotado devido à dificuldade de medição de um sinal de branco (o sinal do branco seria próximo a zero). O cálculo foi realizado utilizando as Equações 18 e 20.

O LQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. O procedimento de avaliação do LQ é semelhante à do LD, podendo ser estimado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 vezes o desvio padrão do branco (Equação 21) ou por meio de parâmetros da curva analítica<sup>58,59</sup>, conforme Equação 22.

$$LQ = x + 10s_b \quad (21)$$

$$LQ = x + \frac{10s_b}{a} \quad (22)$$

A obtenção dos limites de detecção e de quantificação foi feita para os dois analitos, picoxistrobina e piraclostrobina nas condições estabelecidas, considerando a análise de 10 soluções-padrão com a menor concentração para os dois analitos. A Tabela 10 apresenta os resultados de LD e LQ para a picoxistrobina e piraclostrobina calculados pelos critérios indicados nas Equações 18, 19, 20, 21 e 22.

Tabela 10: Parâmetros de mérito de sensibilidade para picoxistrobina e piraclostrobina

Parâmetro	Analitos	
	Picoxistrobina (mol L <sup>-1</sup> )	Piraclostrobina (mol L <sup>-1</sup> )
LD (x + 3s <sub>b</sub> )	2,52 x 10 <sup>-7</sup>	3,62 x 10 <sup>-7</sup>
LD (3s <sub>b</sub> /a)	6,84 x 10 <sup>-8</sup>	1,76 x 10 <sup>-7</sup>
LQ (x + 10s <sub>b</sub> )	4,11 x 10 <sup>-7</sup>	4,03 x 10 <sup>-7</sup>
LQ (10s <sub>b</sub> /a)	2,27 x 10 <sup>-7</sup>	5,85 x 10 <sup>-8</sup>

### 3.7.4.3. Exatidão

#### 3.7.4.3.1. Comentário geral

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<sup>59</sup>.

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), e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (branco ou placebo), 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  $\pm 20\%$ . Porém dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$ <sup>62,63</sup>. Alguns valores de recuperação considerados adequados em função da concentração do analito são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Recuperação do analito em função da sua concentração (adaptação da fonte Brito, Junior e Polese<sup>64</sup>)

Concentração do analito	Intervalo de recuperação aceito, %
$\geq 10\%$	98 - 102
$\geq 1\%$	97 - 103
$\geq 0,1\%$	95 - 105
$\geq 100\ \mu\text{g g}^{-1}$	90 - 107
$\geq 100\ \text{ng g}^{-1}$	80 - 110
$\geq 10\ \text{ng g}^{-1}$	60 - 115
$\geq 1\ \text{ng g}^{-1}$	40 - 120

Para os ensaios de recuperação, amostras em branco de urina e água do riacho foram fortificadas com os fungicidas de interesse picoxistrobina, piraclostrobina (azoxistrobina com padrão interno) de modo que a concentração final da solução ficasse próxima ao ponto médio das respectivas curvas analíticas. Para as amostras de água de riacho a análise foi mais simples, apenas enriquecimento dos pesticidas e diluição em solução otimizada no procedimento de pré-concentração “on-line”. Porém, no caso da urina, a complexidade da matriz forçou o ajuste em algumas condições.

#### 3.7.4.3.2.

##### Tratamento nas amostras de urina e água do riacho

A primeira tentativa para viabilizar a análise da amostra de urina foi realizada fazendo um ajuste de pH da amostra fortificada com as estrobilurinas.

O pH foi ajustado para 7,0 pela adição de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) para forçar a precipitação de proteínas. Posteriormente, a solução resultante foi centrifugada por 20 min a 3000 rpm<sup>40</sup>. Em seguida a solução foi diluída em solução contendo acetonitrila:água ultrapurificada 6:94 % v/v, passada por filtros de PTFE (0,45  $\mu\text{m}$ ) e analisada por CE nas condições otimizadas anteriormente.

Devido à presença de picos interferentes no início do eletroferograma, mesmo após a diluição da amostra, foram realizados novos testes para limpeza das amostras de urina antes de ser injetada no CE. Sulfato de amônio<sup>40</sup> foi utilizado para teste de desproteínação da urina e um cartucho de sílica foi usado para se tentar a extração dos interferentes em fase sólida. Os procedimentos não apresentaram resultados satisfatórios. Os picos no início do eletroferograma continuaram e no tratamento com sulfato de amônio os picos dos analitos nem apareceram (Figura 34).

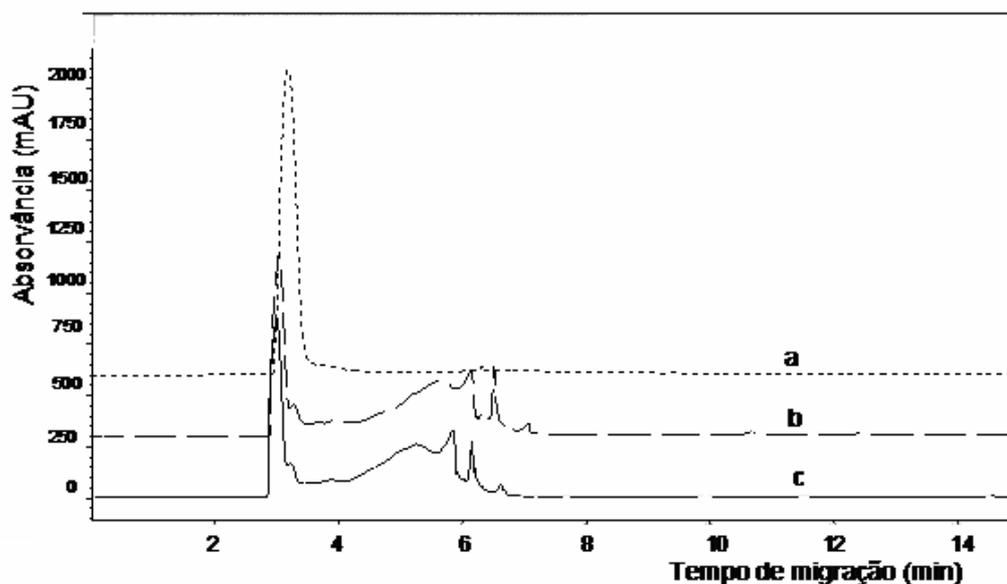


Figura 34: Análise das estrobilurinas em amostra de urina enriquecidas ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos),  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em 200 nm. (a) Amostra após desproteínação com sulfato de amônio; (b) desproteínação com ajuste de pH para 7,0 e limpeza da amostra com coluna de sílica e (c) amostra de urina após desproteínação somente com ajuste de pH.

A urina fortificada foi então submetida a procedimentos de extração em fase sólida com cartuchos de C18. Antes da passagem pelo cartucho C18, a amostra foi apenas centrifugada por 20 min a 3000 rpm. Vários eluentes foram

testados, diclorometano, acetona e acetonitrila. No caso do uso dos solventes diclorometano e acetona, após diluição, estes foram evaporados sob fluxo de nitrogênio, para que o resíduo fosse então retomado com solução contendo acetonitrila:água ultrapurificada 6:94 % v/v. Com a acetonitrila como eluente, não foi preciso fazer a evaporação do solvente, sendo a solução eluída (1 ou 1,5 mL) e diluída com água (volume final de 10 mL).

As extrações com os solventes diclorometano e acetona não foram eficientes, com valores de sinal aproximadamente 50% do esperado para as picoxistrobina e piraclostrobina. Melhores resultados foram obtidos com eluição dos analitos com 1 mL de acetonitrila (Figura 35).

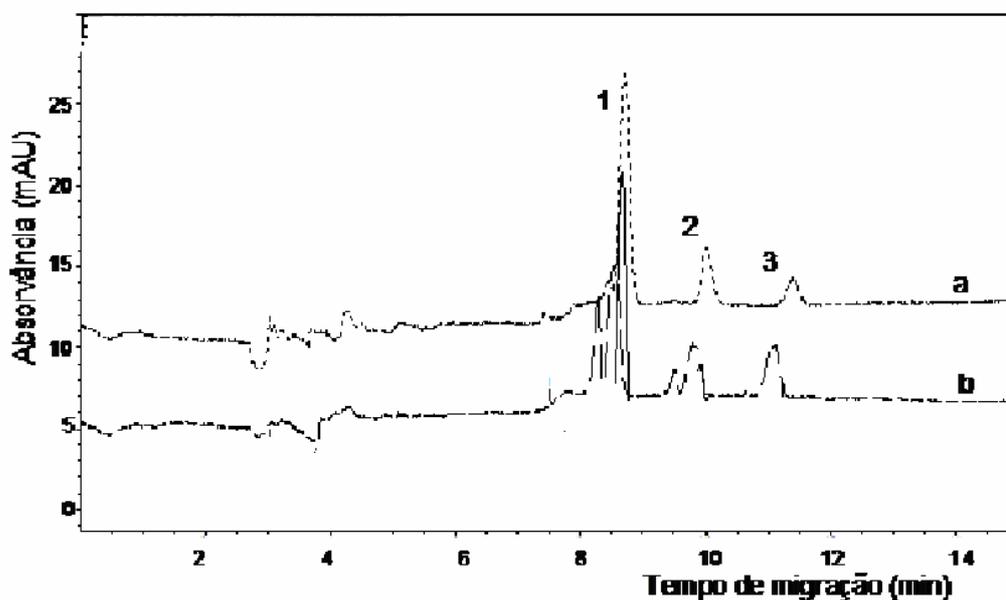


Figura 35: Análise das estrobilurinas em solução padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos),  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em 200 nm. Eletroferogramas de soluções padrão após passar por cartucho de extração C18 e eluído com (a) 1 ml e (b) 1,5 mL de ACN. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

Apesar das perdas observadas para a picoxistrobina e piraclostrobina após extração em C-18, o ruído da matriz no eletroferograma foi minimizado. Assim, como a azoxistrobina sofreu perdas similares ao longo do pré-tratamento, decidiu-se que o procedimento de passagem de amostra em C-18 com retomada em acetonitrila era o mais adequado, sendo obrigatoriamente necessário o uso da padronização interna. O procedimento para extração dos pesticidas com cartucho C-18 foi então realizado com as seguintes etapas: i) condicionamento do cartucho com 2 mL de ACN e 2 mL de água ultrapurificada; ii) 10 mL de

amostra foi em seguida adicionado; iii) 10 mL de água ultrapurificada foi utilizado para remoção de impurezas da urina retidas no cartucho e iv) eluição dos analitos com 1mL de ACN para balão volumétrico de 10 mL. A Figura 36 mostra o eletroferograma de uma amostra de urina e seu respectivo branco analisados após passarem pelo processo de extração e volume ajustado com água ultrapurificada.

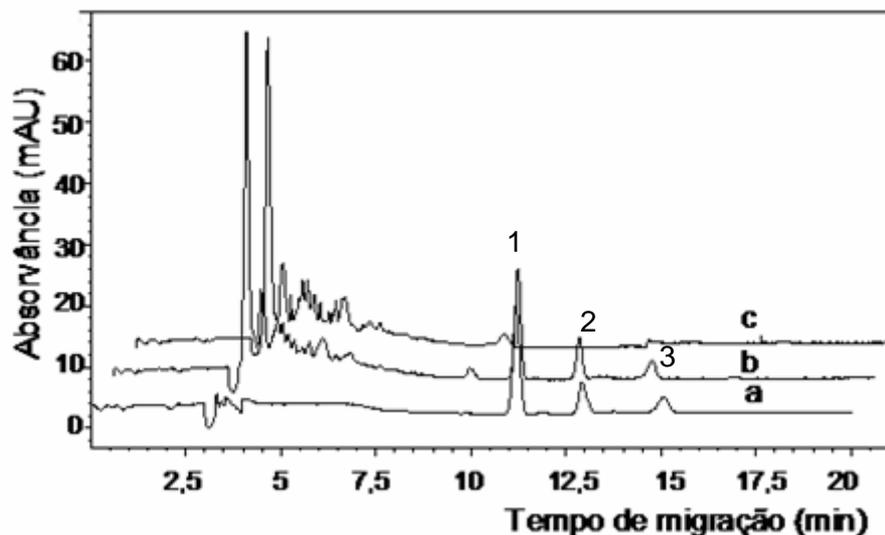


Figura 36: Comparação entre solução padrão e amostra de urina. Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x  $75 \text{ }\mu\text{m}$  d.i., os analitos foram injetados por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos),  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em 200 nm. (a) eletroferograma da solução padrão; (b) eletroferograma da amostra de urina após passar por extração em cartuchos C-18 (eluição com 1,0 mL de acetonitrila) e (c) branco da urina após o mesmo tratamento da amostra. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclisotrobina.

Para as amostras de água de riacho, os eletroferogramas foram obtidos sem dificuldade, sendo alguns indicados na Figura 37.

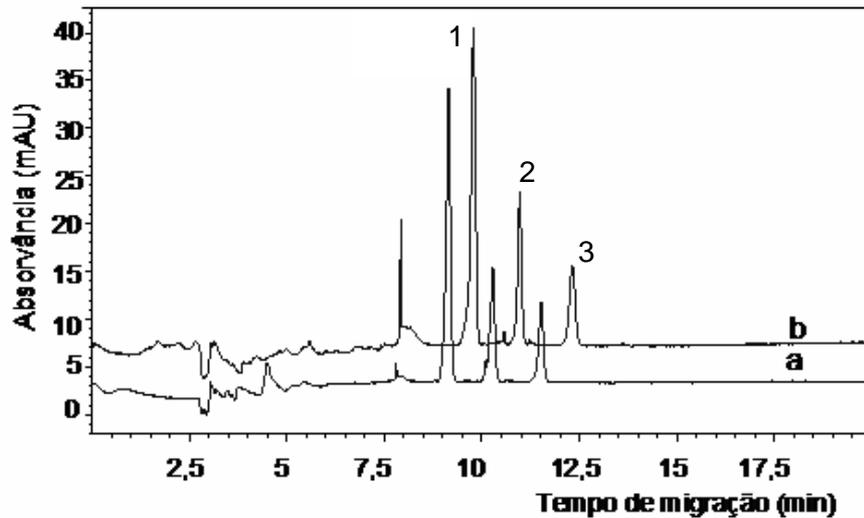


Figura 37: Análise das estrobilurinas em amostras de água do riacho enriquecidas com os fungicidas e solução padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  d.i., os analitos foram injetados por pressão ( $50 \text{ mbar}$ , 15 segundos),  $V = 25 \text{ kV}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$  e detecção em  $200 \text{ nm}$ . (a) eletroferograma da solução padrão e (b) eletroferograma da amostra de água do riacho fortificada. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

Depois destes testes um estudo foi realizado para avaliar o procedimento de pré-concentração na amostra de urina e água de riacho. Essas amostras e os padrões dos pesticidas passaram a ser diluídos todos na solução de água ultrapurificada: tampão borato ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$  pH = 8,5) 50:50% v/v e injetados no capilar por 75 segundos (condições otimizadas no processo de pré-concentração “on-line”). Quando aplicada as condições de pré-concentração “on-line” nas amostras o pico referente ao analito piraclostrobina (terceiro pico) apresentou um alargamento (diminuiu sua eficiência), mas esse efeito não prejudicou a separação entre os picos.

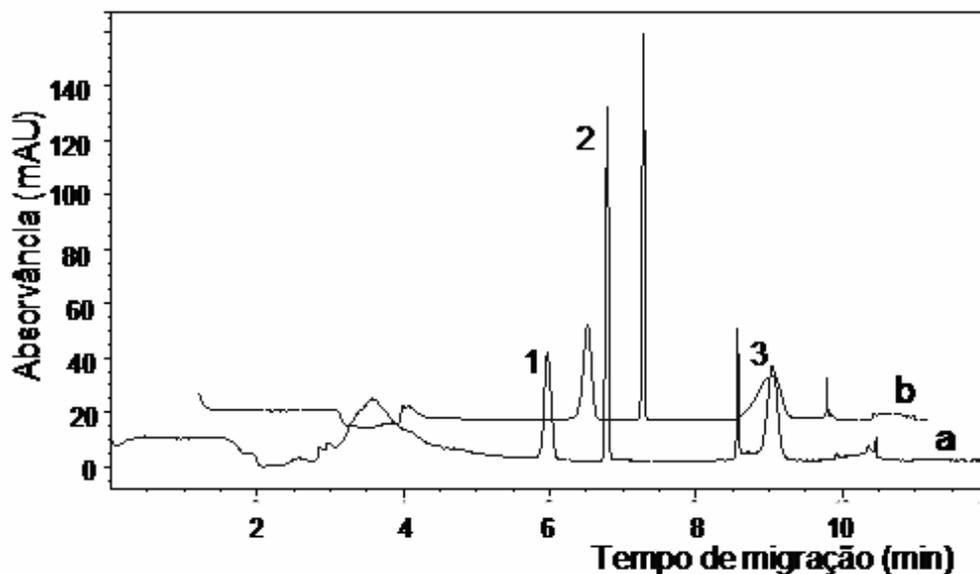


Figura 38: Aplicação da pré-concentração em linha em amostra de urina (a) e água do riacho (b) enriquecidas com os fungicidas. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 μm d.i., os analitos foram injetados por pressão (pressão 50 mbar) por 75 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina.

### 3.7.4.3.3. Resultados da recuperação

As recuperações nas amostras de urina e água de riacho foi avaliada segundo os procedimentos descritos acima, incluindo a pré-concentração “on-line”. Os resultados de recuperação, Tabela 12, foram expressos como recuperação analítica (valor medido é a média de dez replicatas, dividido pelo valor esperado) em percentual.

Os valores das recuperações para a determinação do picoxistrobina em ambas as amostras, ficaram dentro do intervalo esperado (Tabela 11), já que o valor da concentração do analito na solução final das amostras foi aproximadamente igual a  $3,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1,26 \text{ mg L}^{-1} > 100 \text{ μg g}^{-1}$ ). Já para o analito piraclostrobina as recuperações analíticas apresentaram valores diferentes entre a amostra de água de riacho e urina. Para as amostras de água de riacho as recuperações ficaram dentro do intervalo esperado (Tabela 11). Nas amostras a concentração final do piraclostrobina foi aproximadamente igual a  $2,78 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1,08 \text{ mg L}^{-1} > 100 \text{ μg g}^{-1}$ ), então para a urina o valor de recuperação encontrado ficou abaixo do valor esperado segundo a Tabela 11, mas

considerando a complexidade analítica da amostra um intervalo entre 50 a 120% com precisão de até  $\pm 15\%$  é aceito para análise de resíduo<sup>62</sup>.

Tabela 12: Recuperação dos pesticidas em diferentes amostras.

<i>Analito</i>	<i>Amostras</i>	
	<i>Urina</i>	<i>Água Riacho</i>
Picoxistrobina	109 $\pm$ 9%	102 $\pm$ 9%
Piraclostrobina	74,5 $\pm$ 3,6%	93,7 $\pm$ 9,8%

#### 3.7.4.4. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Ela é normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-las são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão e desvio padrão relativo<sup>59</sup>.

Repetitividade 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 repetitividade (mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo)<sup>59</sup>.

A repetitividade de sinal e de tempo de migração para o picoxistrobina e piraclostrobina foi calculada pelo desvio padrão relativo (%RSD)<sup>59</sup>, indicado na Equação 23. Para o tempo de migração dos analitos e para as áreas de pico, os valores foram obtidos em relação ao padrão interno. Foram realizadas sete medições em três níveis de concentração.

$$RSD(\%) = \frac{s_r}{M_{\text{medição}}} \times 100 \quad (23)$$

onde “s<sub>r</sub>” é a estimativa do desvio padrão “M<sub>medição</sub>” é a média das determinações.

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de

medição. Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial. Precisão sob condições de reprodutibilidade, por exemplo, onde resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos é denominada precisão intermediária ou reprodutibilidade interna<sup>59</sup>.

Neste trabalho foi calculada a precisão intermediária, as medidas foram avaliadas em diferentes dias para três níveis de concentração, para cada nível foi realizada quatro medidas. Uma vez escolhida a fonte de variação, as estimativas das variâncias (dentro e entre os grupos) foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), no programa Excel (Microsoft Office). A reprodutibilidade é calculada pelo desvio padrão relativo (%RSD) com os valores de  $MQ_{entre}$  que é a soma dos mínimos quadrados entre dias e  $MQ_{dentro}$  que é a soma dos mínimos quadrados de cada dia conforme mostrado nas Equações 24 e 25<sup>65</sup>.

$$s_{entre}^2 = (MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n \quad (24)$$

$$RSD\% = \frac{s_{entre}}{MQ_{entre}} \times 100 \quad (25)$$

#### 3.7.4.5.

#### Precisão do tempo de migração dos analitos picoxistrobina e piraclostrobina

A repetitividade e reprodutibilidade interna para o tempo de migração dos pesticidas foram avaliadas de duas formas, com e sem considerar o padrão interno.

A repetitividade do tempo de migração para a picoxistrobina e piraclostrobina sem considerar o comportamento do padrão interno apresentaram variações entre 1 a 3% e 1 a 4%, respectivamente (Tabela 13), esses valores são muitos bons para a técnica de CE. Por outro lado, quando o padrão interno foi levado em consideração, os resultados mostraram que a repetitividade desses valores teve uma maior variação para ambos analitos, ficando entre 3 a 6% e 2 a 13% para a picoxistrobina e piraclostrobina,

respectivamente. Surpreendentemente, melhores resultados foram obtidos sem se considerar o tempo de migração do padrão interno. Provavelmente, o tempo de migração da azoxistrobina está sofrendo maior efeito da variação instrumental que os tempos do picoxistrobina e piraclostrobina. No entanto, independentemente disso, e considerando o grande número de variáveis envolvidas na técnica os valores obtidos sem considerar ou considerando o padrão interno são satisfatórios para todos os níveis de concentração, presentes no estudo, da picoxistrobina e para os níveis 2 e 3 da piraclostrobina. A variação maior da repetitividade (13%) foi observada para o menor nível de concentração da piraclostrobina.

Os resultados obtidos para a reprodutibilidade interna do tempo de migração da picoxistrobina (Tabela 13) mostraram que se for considerado o comportamento do padrão interno, os valores variaram entre 2 a 12%, sendo a maior variação referente ao nível de concentração mais alto do estudo (nível 3). Uma variação percentual bem mais satisfatória para este nível de concentração pode ser observada sem o uso do padrão interno.

Para a piraclostrobina os resultados obtidos para a reprodutibilidade interna (Tabela 13), mostraram que ao se considerar o padrão interno os valores variaram entre 0,2 a 12%, sendo a maior variação referente ao nível 1 que também teve maior variação na repetitividade. O uso do padrão interno no tempo de migração da piraclostrobina provou uma menor variação nos valores da reprodutibilidade interna para os níveis 2 e 3 quando comparada aos resultados obtido sem a presença do padrão interno. Esse resultado mostrou que o padrão interno é mais eficiente no caso da piraclostrobina, corrigindo as variações do tempo de migração entre dias de análise. Outra observação interessante é que, para alguns casos, a reprodutibilidade interna apresentou valores menores ou muito próximos dos valores da repetitividade.

Tabela 13: Parâmetros da precisão dos tempos de migração do picoxistrobina e piraclostrobina.

Analitos	Repetitividade (%)		Reprodutibilidade interna (%)	
	Sem P. I.	Com P. I.	Sem P. I.	Com P. I.
Picoxistrobina				
1	3	6	5	4
2	1	3	1	2
3	3	6	2	12
Piraclostrobina				
1	4	13	2	12
2	1	6	0,2	0,2
3	4	2	5	0,2

Níveis de concentração: (1) =  $5,15 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>; (2) =  $2,06 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; (3) =  $1,03 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; P.I. = padrão interno.

#### 3.7.4.6.

##### Precisão da área do picoxistrobina e piraclostrobina

A repetitividade do sinal em função da área de pico da picoxistrobina foi avaliada considerando a padronização interna sendo que os valores ficaram entre 3 e 5% (Tabela 14). Esses resultados foram piores do que o obtido sem considerar o padrão interno (2 a 3%) como indicado na Tabela 14. Tal fato indica que o picoxistrobina pode ser determinado com boa repetitividade sem a presença desse padrão interno. Nos dois casos uma melhor repetitividade foi obtida para o nível de concentração intermediário, o que representa o ponto médio da curva analítica onde a incerteza nas medições é menor.

A repetitividade da razão das áreas da piraclostrobina na padronização interna apresentou valores próximos a repetitividade quando o padrão interno não foi considerado, o uso do padrão interno nesse caso não alterou a precisão das medidas de repetitividade, Tabela 14.

A reprodutibilidade interna para o picoxistrobina teve variações no intervalo entre 1 a 2% quando o padrão interno não foi considerado. Esse resultado pode ser considerado excelente para a técnica de CE. Considerando o resultado em

função do padrão interno, o intervalo de variação foi maior (2 a 8%). A maior variação neste caso foi para a menor concentração de analito.

O teste F baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática dos valores obtidos em dias diferentes ( $MQ_{\text{entre}}$ ) é dividida pela média quadrática dos valores obtidos em um mesmo dia ( $MQ_{\text{dentro}}$ ), 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 ( $F_{\text{calc.}} < F_{\text{crítico}}$ ) indica que não há diferença significativa entre as médias. O teste F foi aplicado para o picoxistrobina e apenas o valor de  $F_{\text{cal}}$  (14) para a menor concentração de analito (nível 1) medido com padronização interna foi maior do que o  $F_{\text{crítico}}$  (5,99). Por esse resultado poderia-se dizer que existe diferença significativa, com nível de confiança de 95%, entre as médias dessa concentração.

A reprodutibilidade interna do piraclostrobina considerando o padrão interno teve menor variação para os níveis 1 e 2, o nível 1 (padrão de menor concentração) apresentou grande variação sem o uso de padrão interno (14%), para trabalhar com esse nível de concentração a padronização interna é fundamental. O teste F aplicado nesse estudo mostrou a importância da utilização do padrão interno, os valores encontrados neste caso, são muito menores do que os valores obtidos sem considerar o padrão interno. Pelos valores de  $F_{\text{cal}}$ , para todos os níveis de concentração com o uso de padrão interno não existe diferença significativa entre as médias ( $MQ_{\text{entre}}$  e  $MQ_{\text{dentro}}$ ), já que  $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$  a um nível de confiança de 95%. Para os níveis 1 e 3 sem considerar o padrão interno os valores de  $F_{\text{cal}}$  foi igual a 9 e 23, respectivamente, sendo maiores do que o  $F_{\text{crítico}}$ . A Tabela 14 apresenta todos os valores encontrados.

Tabela 14: Parâmetros da precisão da área para picoxistrobina e piraclostrobina

Analitos	Repetitividade (%)		Reprodutibilidade interna (%)		F <sub>cal</sub>	
	Sem P. I.	Com P. I.	Sem P. I.	Com P. I.	Sem P. I.	Com P. I.
Picoxistrobina						
1	3	5	2	8	3	14
2	2	3	1	3	0,4	4
3	3	5	1	2	1	0,01
Piraclostrobina						
1	10	10	14	5	9	0,4
2	6	7	3	3	2	0,5
3	4	5	2	3	23	0,2

Níveis de concentração: (1) =  $5,15 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>; (2) =  $2,06 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>; (3) =  $1,03 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>; P.I. = padrão interno.

O papel desse padrão interno na melhoria da qualidade do resultado de medição dos analitos não foi cumprido como se esperava, com exceção do piraclostrobina que teve precisão de medição de sinal (em área de pico) mais satisfatória. A utilização do padrão interno se mostrou mais importante em termos das recuperações obtidas para a piraclostrobina nas amostras de urina, provavelmente corrigindo alguma perda de analito ao longo do processo de tratamento da amostra.

## 4 Fosforescência

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 fosforescência ocorre quando moléculas excitadas no estado tripleto retornam para o estado fundamental emitindo radiação<sup>66,67</sup>.

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 direção do spin do elétron que é promovido para um orbital de maior energia é preservada, tem-se o estado excitado singleto. No estado excitado tripleto o spin do elétron promovido é invertido, como representado na Figura 39. No processo fosforescente a direção do spin do elétron da espécie molecular no estado excitado sofre uma inversão (mudança de multiplicidade do estado excitado de singleto para tripleto), assim a emissão de radiação ocorre com um tempo de vida da ordem de  $10^{-4}$  a  $10^1$  s, significativamente maior que o da fluorescência ( $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  s). Adicionalmente, as energias dos estados excitados tripletos são relativamente menores que a dos seus equivalentes singletos, conseqüentemente, a banda de emissão fosforescente ocorre em região espectral de menor energia (comprimento de onda maior)<sup>67,68</sup>.

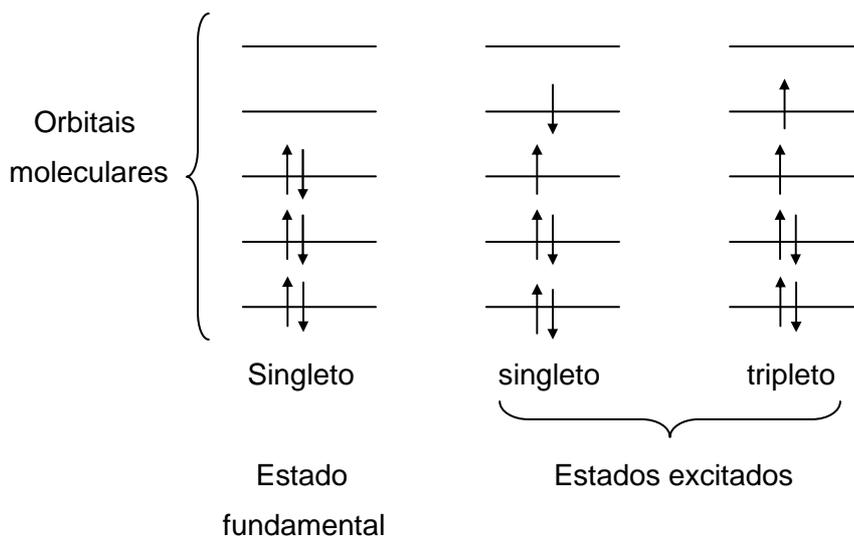


Figura 39: Diagrama esquemático de um arranjo de spin nos orbitais moleculares para o estado fundamental, e para os estados excitados singlete e tripleto.

O estado fundamental é singlete e denominado  $S_0$ . Já os estados excitados singlete e tripleto de menor energia são chamados de  $S_1$  e  $T_1$ , respectivamente, sendo que, normalmente, o estado  $T_1$  possui menor energia que  $S_1$ . Em geral, simultaneamente a uma transição eletrônica, ocorrem também mudanças nos estados vibracionais e rotacionais da molécula. Assim, ao se considerar que uma população de moléculas esteja envolvida no processo, as bandas espectrais são relativamente largas ( $\Delta\lambda$  na ordem de 100 nm), pois vários níveis rotacionais e vibracionais diferentes estão disponíveis em energias ligeiramente diferentes<sup>66,67,68</sup>.

O diagrama de Jablonski (Figura 40) pode ser usado para compreender os processos fotoluminescentes. A partir da absorção de fótons de energia apropriada, uma população de moléculas pode passar do estado fundamental ( $S_0$ ) para qualquer dos estados vibracionais de um estado excitado singlete ( $S_n$ ). Por meio de uma série de relaxamentos vibracionais (RV), essa população excitada é levada através dos níveis vibracionais de estados eletrônicos de mesma multiplicidade, até atingir o primeiro nível vibracional do primeiro estado excitado singlete ( $S_1$ ) - regra de Kasha. O RV ocorre na escala de tempo da ordem de  $10^{-13}$  a  $10^{-11}$  s. Essa transição, que não envolve emissão de radiação, pode também ocorrer pela transferência de energia vibracional para outras moléculas (solvente, por exemplo) através de colisões. O efeito final é a conversão de parte da energia do fóton absorvido em calor, que é disseminado por todo o meio<sup>60</sup>.

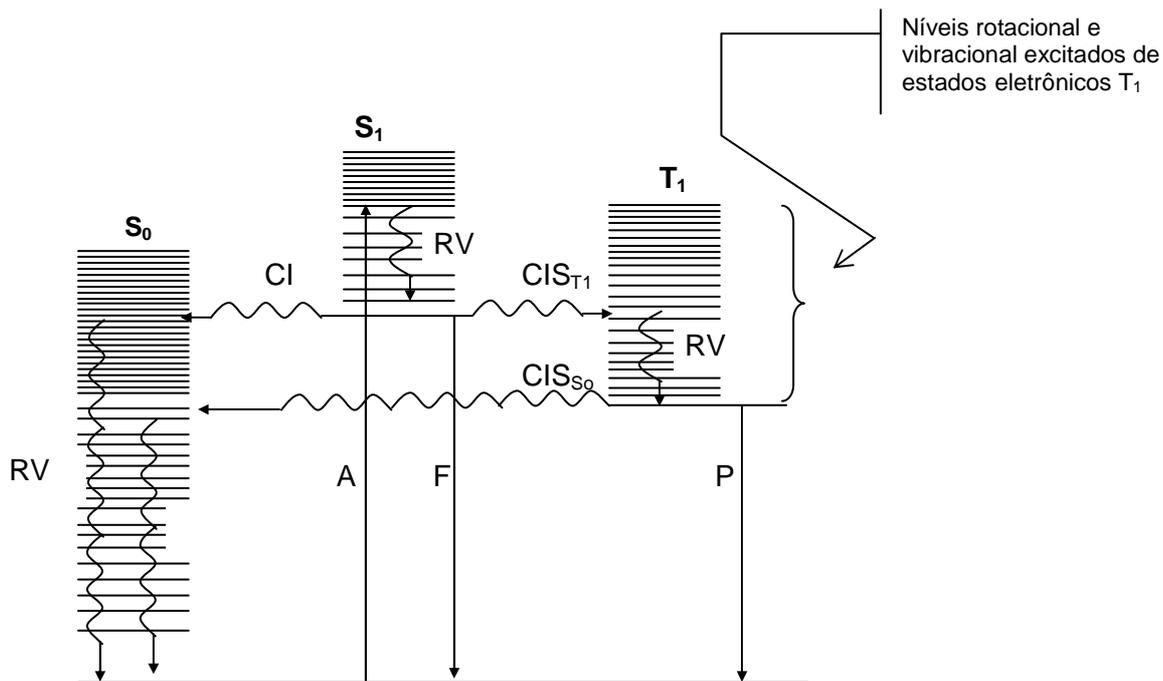


Figura 40: Diagrama modificado de Jablonskii (adaptação da fonte Vo-Dinh, John Wiley & Sons, 1984). Absorção (A), relaxamento vibracional (RV), cruzamento interno (CI), fluorescência (F), cruzamento intersistemas (CIS), fosforescência (P), estado fundamental ( $S_0$ ), estado excitado singlete ( $S_1$ ) e estado excitado tripleto ( $T_1$ ).

A partir de  $S_1$ , a população de moléculas pode retornar para o  $S_0$  por uma combinação de etapas envolvendo processos radiativos (fluorescência e fosforescência) e/ou não-radiativos (relaxamento vibracional e cruzamento interno). O cruzamento interno (CI) ocorre quando a população passa para níveis vibracionais de  $S_0$  que possuem energia mais elevada, semelhante ao do nível vibracional de menor energia de  $S_1$ , esse processo ocorre em intervalos de tempo similares ao do relaxamento vibracional. O relaxamento vibracional ocorre se a diferença de energia entre  $S_1$  e  $S_0$  não for muito grande e existir sobreposição de níveis vibracionais. No caso da fluorescência (F), a desativação a  $S_0$  por emissão de fóton ocorre se a diferença energética entre  $S_1$  e  $S_0$  for relativamente grande e as condições do meio favorável. Se houver possibilidade de acoplamento spin-orbital, a transição eletrônica entre estados excitados de diferente multiplicidade ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) deve acontecer no processo denominado de cruzamento intersistemas – CIS. Nesse caso, a molécula pode se desativar, a partir de  $T_1$ , por meio de relaxamento vibracional ou por meio de fosforescência (P), com emissão de fótons. O CI e a fluorescência competem muito

eficientemente pela desativação do estado excitado, por isso, a fosforescência é observada somente em condições especiais<sup>60,69</sup>.

O CIS é um processo não-radiativo fundamental para a observação de fosforescência e que envolve a troca de multiplicidade da população no estado excitado. O CIS tem duração na ordem de  $10^{-7}$  s e compete com a fluorescência e com o CI. Embora a transição de estados excitados de diferentes multiplicidades seja quantomecanicamente proibida, o CIS pode ocorrer em casos onde existe acoplamento spin-orbital. Este tipo de fenômeno, que consiste no acoplamento entre os campos magnéticos gerados pelo movimento do spin e pelo movimento angular do orbital do elétron, promove a mistura quantomecânica de estados excitados<sup>66</sup>.

As taxas relativas de CI, relaxamento vibracional, CIS, fluorescência e fosforescência são dependentes da estrutura da molécula, do sistema de solventes ou substrato, da presença de espécies químicas concomitantes e de condições como a temperatura e a pressão. Pode-se observar na Figura 40, que a energia da fosforescência é menor do que a energia da fluorescência, de forma que as bandas de emissão fosforescentes aparecem em comprimentos de onda maiores (energias menores) do que as bandas de emissão fluorescente<sup>60</sup>.

O uso da fosforescência em química analítica (fosforimetria) é bem menos comum que o da fluorescência, pois se requer condições especiais para aumentar a eficiência da transição radiativa entre estados de diferentes multiplicidades. Os primeiros estudos com fosforimetria foram realizados em baixas temperaturas (usando nitrogênio líquido) e solventes apropriados para a criogenia. No entanto, a evolução da técnica mostrou que os sinais fosforescentes podiam ser obtidos em temperatura ambiente, pela adsorção do fósforo em uma matriz sólida, em solução com meio organizado, ou mesmo diretamente em solução aquosa<sup>67</sup>. Desde então, muitos grupos de pesquisa se dedicaram na viabilização da fosforimetria como técnica analítica de rotina, valorizando sua seletividade e sensibilidade, decorrente de um ambiente espectral potencialmente de baixo sinal de fundo.

A eficiência quântica luminescente ( $\phi_L$ ) é um parâmetro que avalia a contribuição do processo radiativo no processo geral da desativação da molécula no estado excitado. A eficiência quântica fosforescente é expressa pela razão entre o número total de fótons emitidos pela molécula na forma fosforescente e o número total de fótons absorvidos no estado excitado singleto. A fosforescência é uma característica intrínseca do composto e depende de certas condições experimentais (temperatura, solvente, rigidez da matriz do analito). A Equação

26 descreve a eficiência quântica da fosforescência ( $\phi_P$ ) em termos de constantes de velocidades de todos os processos radiativos e não-radiativos de desativação de uma molécula excitada<sup>66,67,70</sup>.

$$\phi_P = \left( \frac{k_P}{k_P + K_m} \right) \left( \frac{k_{cis}}{k_{cis} + k_f + k_{IC}} \right) \quad (26)$$

onde:

$$\phi_{cis} = \frac{k_{cis}}{k_{cis} + k_f + k_{fq}} \quad (27)$$

onde:

$k_P$  – Constante de velocidade da fosforescência

$K_m$  e  $k_{fq}$  – Constante de velocidade dos processos não-radiativos de desativação de  $T_1$

$k_{CIS}$  – Constante de velocidade do cruzamento intersistemas

$k_f$  – Constante de velocidade da fluorescência

$k_{IC}$  – Constante de velocidade dos processos não-radiativos de desativação de  $S_1$

Os valores de  $\phi_P$  podem assumir valores entre zero e um, assim compostos com  $\phi_P$  próximos da unidade certamente apresentarão alta probabilidade de desativação de  $T_1$  através de emissão fosforescente<sup>71</sup>.

Conforme já foi mencionado, moléculas no estado  $T_1$  possuem grande probabilidade de se desativar para  $S_0$  por processos não-radiativos, por isso, para aumentar a chance de uma molécula fosforescer, se faz necessário minimizar a probabilidade dos processos não-radiativos ocorrerem. Pela Equação 26 pode-se ver que a eficiência da fosforescência é favorecida tanto pela redução do valor de  $K_m$  quanto pelo aumento de  $k_{CIS}$ .

A redução do valor de  $K_m$  pode ser alcançada pela redução de liberdade vibracional e de difusão do luminóforo (molécula luminescente) colocando-se em uma matriz rígida ou organizada. Nesse caso, soluções congeladas a 77K, solventes viscosos, meio organizado ou substratos sólidos são artifícios que podem ser aplicados<sup>66,67,71</sup>.

No caso do  $\phi_{cis}$ , a presença de átomos de elevado número atômico (átomos pesados) nas vizinhanças da molécula de interesse pode provocar um aumento na magnitude desse parâmetro<sup>66,67,72</sup>. Como consequência, o aumento da fosforescência pode ser provocado pela presença de átomos pesados na

forma de ligantes na molécula de interesse (efeito interno do átomo pesado)<sup>73</sup> ou simplesmente pela proximidade entre a molécula de interesse e átomos pesados na forma, por exemplo, de sais inorgânicos (efeito externo do átomo pesado)<sup>74</sup>. Em ambos os casos, um favorecimento das constantes de velocidades dos processos envolvendo troca de spin eletrônico é observado. Esse aumento da fosforescência é acompanhado pela redução da fluorescência.

A minimização das colisões moleculares entre o luminóforo e as moléculas do solvente e a restrição das vibrações moleculares foram primeiramente realizados pelo congelamento da amostra a 77 K. Atualmente, o uso de substratos sólidos ou de meio organizado em solução aquosa (micelas, por exemplo) vem permitindo a observação de fosforescência na temperatura ambiente (RTP).

#### 4.1.

#### **Fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP)**

O uso de matrizes que proporcionem à molécula a rigidez em sua estrutura (redução da liberdade vibracional) minimiza os processos de desativação não-radiativos do estado tripleto, além de proteger a molécula contra colisões com outras espécies (pela diminuição da difusão de componentes)<sup>67</sup>.

Durante muitos anos, a fosforimetria se baseou na imobilização da substância fotoluminescente em uma matriz vítrea rígida a baixas temperaturas (em geral 77 K). Apesar das muitas vantagens que esta metodologia oferecia (baixos limites de detecção, ampla faixa linear dinâmica nas curvas analíticas e grande seletividade), existia uma grande resistência ao uso desta abordagem devido à necessidade de criostatos, aos transtornos observados no processo de imersão das soluções em N<sub>2</sub> líquido; às limitações a respeito da escolha do solvente e a dificuldade de se obter uma matriz homogênea que pudesse minimizar a reflexão e o espalhamento de radiação durante o congelamento<sup>67</sup>.

A fosforimetria na temperatura ambiente suportada em substrato sólido (SSRTP) surgiu como uma alternativa a técnica fosforimétrica em baixa temperatura. A SSRTP é uma técnica simples (viável para o uso rotineiro), de baixo custo, de boa seletividade e baixos níveis de detecção (análise de traço). Entretanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens, como, a dificuldade em termos de automatização e a repetitividade relativamente mais alta que a observada em técnicas que utilizam solução.

O uso de substratos sólidos de baixo custo e de fácil preparação facilitou a observação de intensa fosforescência na temperatura ambiente. Graças à sua eficiência na imobilização de moléculas orgânicas, o substrato sólido tem demonstrado uma capacidade impressionante em permitir a observação de fosforescência de várias classes de analitos. Além disso, o substrato sólido é compatível com o uso de diferentes sais de átomos pesados, quando comparado com a outra maneira de se obter RTP: o meio micelar. O uso do meio micelar, na prática, tolera o uso de apenas dois ( $I^-$  e de  $Tl^+$ ) dos seis íons de átomos pesados tradicionalmente aplicados em fosforimetria. Esses fatos aumentam a versatilidade e a seletividade da aplicação analítica desse fenômeno com substrato sólido<sup>71</sup>.

A fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP) só foi reconhecida após estudos feitos por Schulman e Walling<sup>75</sup>. Esses autores identificaram o fenômeno da RTP em uma variedade de suportes, incluindo sílica, alumina, papel e asbestos, mostrando que as moléculas do analito adsorvidas no substrato sólido adquirem a rigidez necessária para minimizar os efeitos de desativação colisional e vibracional do estado excitado.

Entre os diversos materiais pesquisados para servir de substrato sólido, a celulose, na forma de papel de filtro ou papel cromatográfico, é o que tem sido mais utilizada. O papel de filtro, quando tratado adequadamente, tem baixo custo e é compatível com a utilização dos mais variados sais de átomos pesados, que são utilizados como indutores e amplificadores de fosforescência. A principal interação, responsável pela imobilização, entre o analito e o grupo hidroxila da celulose foram atribuídos às ligações de hidrogênio<sup>76</sup>. Além disso, os poros da superfície do papel são sítios onde as moléculas do analito podem penetrar e interagir tridimensionalmente com o substrato após a secagem. Na técnica em substrato sólido, a solução do analito é colocada na matriz sólida e, após a secagem do solvente, a fosforescência é medida em atmosfera inerte<sup>66</sup>.

Uma grande desvantagem do uso dos substratos de celulose é sua fosforescência natural, proveniente das ligninas e hemiceluloses do papel (apresentam uma extensa banda de emissão de 400 a 600 nm) que limita a sensibilidade da SSRTP<sup>71</sup>. O principal procedimento para diminuir o sinal de fundo<sup>77</sup> do papel consiste em uma etapa de lavagem com água fervente seguida de uma etapa de exposição à radiação ultravioleta. Esse procedimento, desenvolvido simultaneamente por Campiglia e de Lima<sup>78</sup> e por McLeese e Dunlap<sup>79</sup>, é capaz de reduzir o sinal de fundo em até 98%. Mais recentemente, Cardoso<sup>45</sup> adaptou esses procedimentos para reduzir o tempo total do

tratamento de 16 para apenas 4 h, com redução de sinal de fundo semelhante aos obtidos com os procedimentos originais.

Vários fatores experimentais estão relacionados com a indução e maximização da SSRTP, como: oxigênio e umidade no meio; íons de átomo pesado; modificadores de superfície tais como surfactantes; espécies desativadoras; a natureza do solvente e o pH do meio onde o analito é dissolvido. Esses fatores quando não otimizados podem minimizar ou até eliminar o sinal fosforescente. A seguir faz-se uma descrição do efeito dos fatores mais importantes e que devem ser avaliados no desenvolvimento de métodos baseados na SSRTP.

## **4.2. Parâmetros que afetam o sinal fosforescente**

### **4.2.1. Efeito do oxigênio e da umidade**

A interação de espécies químicas presentes no meio fosforescente com as espécies luminescentes pode minimizar ou até mesmo eliminar sua fosforescência. Este fenômeno é denominado de “quenching” (desativação do estado excitado), podendo ser classificado em dois tipos: o estático e o dinâmico. Na desativação estática, interações entre o luminóforo e a espécie desativadora formam um complexo estável no estado fundamental não-luminescente, impedindo a excitação do luminóforo. No processo de desativação dinâmica, a espécie desativadora pode interagir com o luminóforo durante o tempo em que este se encontra no estado excitado, indisponibilizando a fosforescência<sup>71</sup>

A presença de oxigênio molecular é um fator importante, pois este provoca a diminuição e até mesmo a eliminação do sinal fosforescente. A umidade no substrato pode aumentar as colisões (atenuação dinâmica) que desativam as moléculas excitadas sem emissão de radiação<sup>66,67</sup>.

Estudos teóricos mostram que a interação do oxigênio com moléculas no estado tripleto provoca a desativação da molécula excitada para o estado fundamental ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). Esta desativação da molécula excitada é acompanhada pela transição do oxigênio de seu estado tripleto natural para um estado singleto

excitado. Um dos modelos seguidos para descrever este tipo de interação propõe a transferência de carga, por contato, entre o oxigênio e o analito<sup>66,67</sup>.

Os efeitos dieletérios provocados pela umidade e pelo oxigênio podem ser reduzidos através de secagem prévia do substrato e da purga de nitrogênio seco sobre a superfície do substrato de celulose antes e durante o procedimento de leitura da fosforescência.

O mecanismo de desativação do estado excitado pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer<sup>66</sup>:

$$I / I_0 = 1 + K_Q \tau [Q] \quad (28)$$

onde:  $I$  e  $I_0$  são as intensidades luminescentes na ausência e na presença da substância desativadora  $Q$  em uma concentração  $[Q]$ , respectivamente.  $k_Q$  é a constante de velocidade do processo de desativação não radiativa do estado excitado e  $\tau$  é o tempo de vida da fosforescência. Assim, a equação acima nos mostra que, como o tempo de vida da fosforescência é elevado, a influência do oxigênio e da umidade é muito acentuada quando comparado com a fluorescência. Além disso, a diminuição da fosforescência é diretamente proporcional ao aumento da concentração da espécie desativadora<sup>66</sup>.

#### 4.2.2. Efeito do átomo pesado

O efeito do átomo pesado pode ser justificado pelo aumento do fenômeno chamado de acoplamento de spin-orbital, no qual o estado tripleto adquire algumas características de singleto e vice-versa. Esta condição aumenta a taxa do cruzamento intersistemas (CIS) do estado singleto para o estado excitado tripleto, aumentando a probabilidade de ocorrer fosforescência<sup>80</sup>.

O efeito do átomo pesado na luminescência foi primeiramente observado por McClure em 1949, e logo em seguida por Kasha (1952), o qual percebeu que átomos pesados aumentam a velocidade da transição  $S \rightarrow T$ <sup>81</sup>. A primeira aplicação de íons de átomo pesado como amplificador do sinal fosforescente foi em 1975, quando White e Seybold testaram o efeito do NaI em diversas substâncias, como o 1-sulfonato naftaleno, 1-naftol e 2-naftol. Intensidades 40 vezes mais fortes foram obtidas quando o NaI foi usado<sup>81</sup>. White e Seybold<sup>82</sup> (1977) fizeram um estudo da influência de íons halogenetos e descreveram que a eficiência do efeito do átomo pesado entre estes ânions segue a seguinte ordem:  $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ . Lue-Yen Bower e Winefordner<sup>83</sup> (1978) compararam o

efeito de outros sais de átomos pesados de vários hidrocarbonetos poliaromáticos adsorvidos em papel de filtro e concluíram que a intensidade da fosforescência de hidrocarbonetos poliaromáticos aumentava na seguinte ordem de átomo pesado adicionado:  $Tl^+ > Ag^+ > Pb^{2+} > Hg^{2+}$ .

O aumento do sinal fosforescente por átomos pesados pode ser induzido pela presença destes na forma de ligantes (efeito interno do átomo pesado)<sup>24</sup> ou por sais inorgânicos de átomos pesados adicionados à matriz do analito (efeito externo do átomo pesado). No entanto, a presença de átomos pesados também pode aumentar as constantes de velocidade dos processos de desativação de  $T_1$  sem emissão de radiação. Nestes casos, a eficiência quântica da fosforescência ( $\phi_p$ ) será desfavorecida e uma redução no sinal fosforescente será observada<sup>66,67,71</sup>.

O aumento de sinal devido a presença de átomo pesado é difícil de ser previsto, é necessário um estudo sistemático para verificar qual tipo irá favorecer a fosforescência. Os átomos pesados mais utilizados são iodo, tálio, chumbo, prata, cádmio e mercúrio<sup>84,82,85,86</sup>.

#### 4.2.3.

#### **Efeito do surfactante como modificador de superfície**

A adição de um surfactante, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), previamente à adição do átomo pesado e da solução do analito no substrato sólido, pode produzir um grande aumento de sinal fosforescente, pois a longa cadeia alquílica do ânion do surfactante pode proteger o analito contra fotodecomposição causada pela fonte de irradiação durante as medições espectrais. Além disso, o surfactante na superfície do papel pode organizar as moléculas do analito, aumentando a quantidade de sítios ativos e a rigidez da molécula, e aproximando-as mais dos íons de metais pesados. Esse maior contato entre o analito e os íons de átomo pesado aumenta a probabilidade de acoplamento spin-orbital. O surfactante também evita que as moléculas do analito e do átomo pesado penetrem nos poros da celulose, facilitando a interação destas moléculas com a superfície do papel. Entretanto, se a quantidade de SDS for excessiva, o sinal tende a cair por causa, por exemplo, da dificuldade de interação entre o átomo pesado e a radiação incidente (efeito filtro)<sup>87,88</sup>.

#### 4.2.4. Influência do pH

O pH da solução a ser depositada no papel é um fator muito importante para a obtenção de um bom sinal fosforescente. Von Wandruszka e Hurtubise<sup>34</sup> primeiro notaram que a RTP do ácido p-aminobenzóico adsorvido em acetato de sódio diminuía muito em meios extremamente ácidos ou básicos. De Lima e M. Nicola<sup>89</sup> em seus estudos com diversas substâncias orgânicas depositadas em papel de filtro, concluíram que cada composto em particular tem o seu melhor pH, cujo sinal fosforescente será máximo.

Um dos aspectos mais relevantes das reações ácido-base de moléculas potencialmente luminescentes é a produção de derivados com maior eficiência quântica luminescente. Além disso, espécies com cargas têm maior probabilidade de mostrar sinais mais intensos, o que se deve ao fato de que espécies ionizadas possuem maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel<sup>67</sup>.

O efeito do pH na intensidade fosforescente é largamente dependente da molécula analisada, sendo a escolha do pH muito importante para melhorar a sensibilidade da SS RTP<sup>70</sup>.

### 4.3. Resultados e Discussão

#### 4.3.1. Características fosforescentes da enrofloxacin

Sabendo-se que a capacidade fotoluminescente de um composto não depende só de sua estrutura molecular mas também de todo o meio que o cerca, o desenvolvimento de uma metodologia baseada em fosforimetria na temperatura ambiente (RTP) para a determinação de um composto, deve necessariamente começar com o estudo das condições experimentais que afetam as características fosforescentes dos analitos de interesse no substrato de escolha. Desse modo, diferentes condições experimentais foram estudadas visando induzir ou amplificar a fosforescência na temperatura ambiente da enrofloxacin. Em todos esses estudos, os parâmetros instrumentais foram fixados como indicado a seguir: tempo de abertura do detector (3 ms), tempo de retardo do detector (3 ms), velocidade de varredura ( $1500 \text{ nm min}^{-1}$ ) e bandas espectrais de passagem de excitação e emissão (ambas 10 nm).

##### 4.3.1.1. Estudos preliminares

Estudos preliminares foram realizados com o intuito de se encontrar condições de contorno para o desenvolvimento do método fosforimétrico para a enrofloxacin. O primeiro estudo foi a avaliação da influência de quatro diferentes sais de átomos pesados em substrato de papel onde a enrofloxacin foi colocada. As massas dos sais de átomos pesados adicionados no centro dos substratos foram: 333  $\mu\text{g}$  de  $\text{TlNO}_3$  (5  $\mu\text{L}$  de solução  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ), 504  $\mu\text{g}$  de  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (5  $\mu\text{L}$  de solução  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ), 166  $\mu\text{g}$  de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (5  $\mu\text{L}$  de solução  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ), 271  $\mu\text{g}$  de  $\text{AgNO}_3$  (5  $\mu\text{L}$  de solução  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ). Esses sais de átomos pesados foram usados como recurso para tentar induzir a fosforescência da enrofloxacin já que este analito não apresentou fosforescência quando imobilizadas diretamente nos substratos de papel. A escolha desses sais foi baseada nos resultados obtidos por Nava<sup>22</sup> em estudos com outras fluorquinolonas.

Diferentes átomos pesados devem ser testados, pois um composto ou grupo de compostos responde positivamente na presença daqueles átomos pesados específicos que promovem as mudanças adequadas nos níveis de energia de modo a criar um corredor por onde a população molecular troca de multiplicidade (cruzamento intersistemas).

Nesse mesmo estudo preliminar, as soluções de enrofloxacina ( $5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), preparadas em sistema de solventes com duas composições diferentes, foram também avaliadas. As composições das soluções foram acetona/água 50/50% e acetona/solução de NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) 50/50% v/v. A acetona foi utilizada para garantir a solubilização completa da enrofloxacina<sup>22</sup>. O efeito da exposição da solução de trabalho à radiação UV foi também avaliado. Esse último estudo se mostrará importante mais a frente por causa da instabilidade do analito frente à radiação de excitação.

Em nenhuma das condições estudadas foi detectada fosforescência em substratos contendo AgNO<sub>3</sub>. A enrofloxacina adicionada no substrato a partir da solução preparada em acetona/água apresentou pequeno sinal fosforescente na presença dos sais TlNO<sub>3</sub> e CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O. Um maior sinal foi observado com Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Figura 41). Quando a enrofloxacina foi preparada em meio contendo NaOH, o sinal fosforescente do analito pode ser observado em substratos sem átomos pesados. As características desse sinal foram muito próximas ao do sinal encontrado na presença TlNO<sub>3</sub> (Figura 42). Este resultado mostrou que a enrofloxacina foi sensível à presença de NaOH na solução de origem. Na presença de CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O e Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> não foi observado sinal fosforescente do analito nessa condição.

O estudo realizado com solução de enrofloxacina irradiada com UV (60 min de exposição) não indicou nenhum aumento significativo de sinal foi observado em relação aos valores já descritos para soluções preparadas em acetona/água (Figura 43). Para a solução de enrofloxacina preparada em acetona/solução NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a irradiação provocou um grande aumento de sinal na presença do sal TlNO<sub>3</sub>, indicando que o processo de irradiação induziu a formação de um derivado cuja fosforescência é favorecida na presença de tálio(I) (Figura 44). A partir desses testes, o desenvolvimento do método seguiu com a otimização das condições experimentais que promoveram esse sinal fosforescente mais promissor para a enrofloxacina.

Na Tabela 15 encontram-se resumidamente os resultados obtidos nos estudos preliminares. Nela, os valores de comprimento de onda máximos de luminescência assim como as razões entre os sinais dos analitos em relação aos

respectivos brancos ( $I_A/I_B$  razão entre o sinal fosforescente de cada um dos analitos e o sinal medido do substrato) são indicados.

Importante ressaltar que os sinais fosforescentes obtidos das soluções de enrofloxacin não irradiadas tiveram uma grande variação, o que indicou que esses sinais estavam variando em função do tempo de exposição à radiação de excitação durante o processo de medição fosforescente.

Tabela 15: Fosforescência da enrofloxacin e de seus derivados na presença de diferentes sais de átomos pesados.

	Acetona/Água		Acetona/Solução NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup>	
	Sem irradiar	Irradiado (60 min)	Sem irradiar	Irradiado (60 min)
Ausência de átomo pesado	-----	$I_A/I_B = 1,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 270/436$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/463$	$I_A/I_B = 4,2$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/432$
TiNO <sub>3</sub>	$I_A/I_B = 1,5$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 254/490$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/494$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/425$	$I_A/I_B = 13$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 274/463$
CdCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	$I_A/I_B = 1,5$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 254/438$	$I_A/I_B = 2,9$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/439$	-----	$I_A/I_B = 3,3$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 274/443$
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	$I_A/I_B = 4,3$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 260/470$	$I_A/I_B = 7,8$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 246/455$	-----	$I_A/I_B = 2,0$ $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 265/472$
AgNO <sub>3</sub>	-----	-----	-----	-----

--- ausência de sinal fosforescente

$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  – comprimento de onda de excitação \ comprimento de onda de emissão

$I_A/I_B$  – razão entre a intensidade sinal fosforescente do analito e do branco

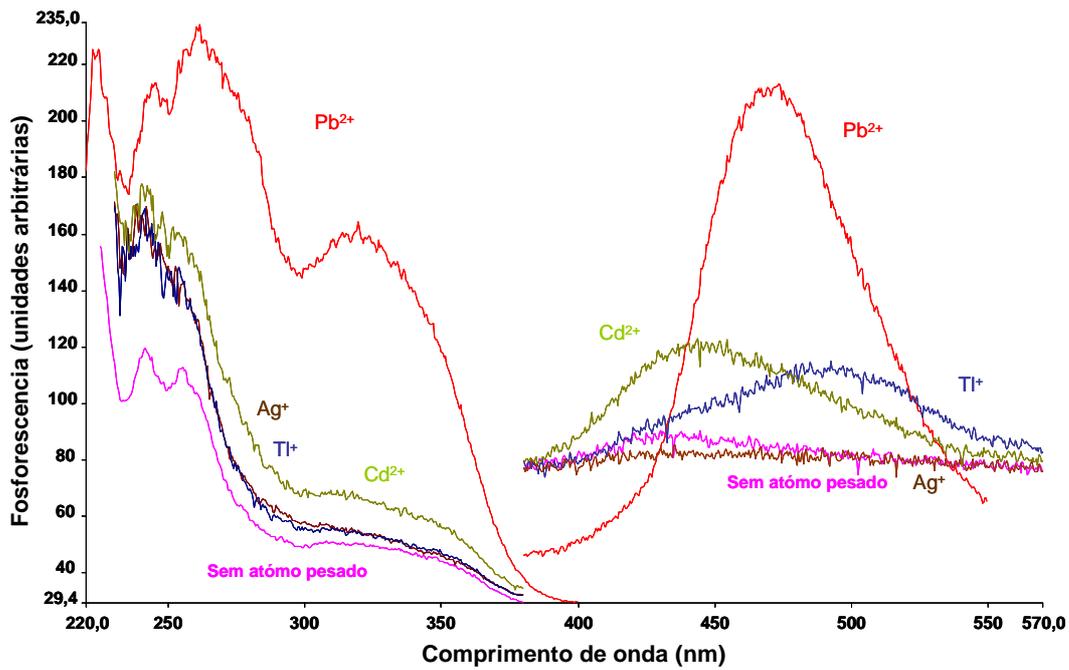


Figura 41: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ( $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) com e sem a presença de sais de átomos pesados em acetona/água sem exposição ao UV.

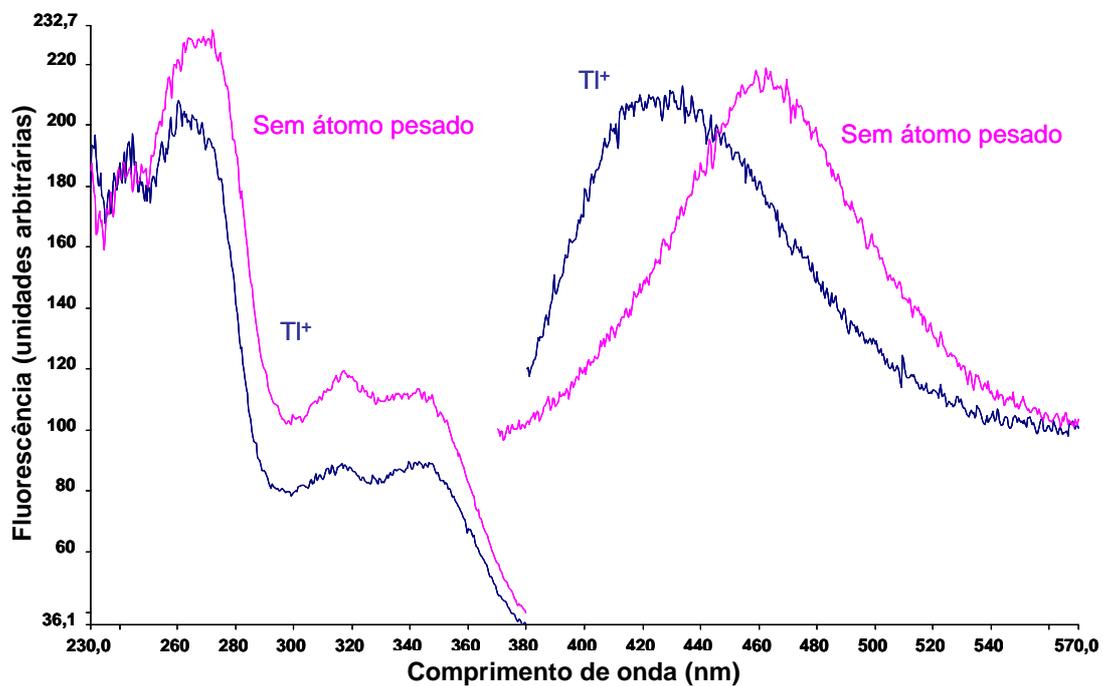


Figura 42: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ( $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) em acetona/solução NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  sem exposição ao UV.

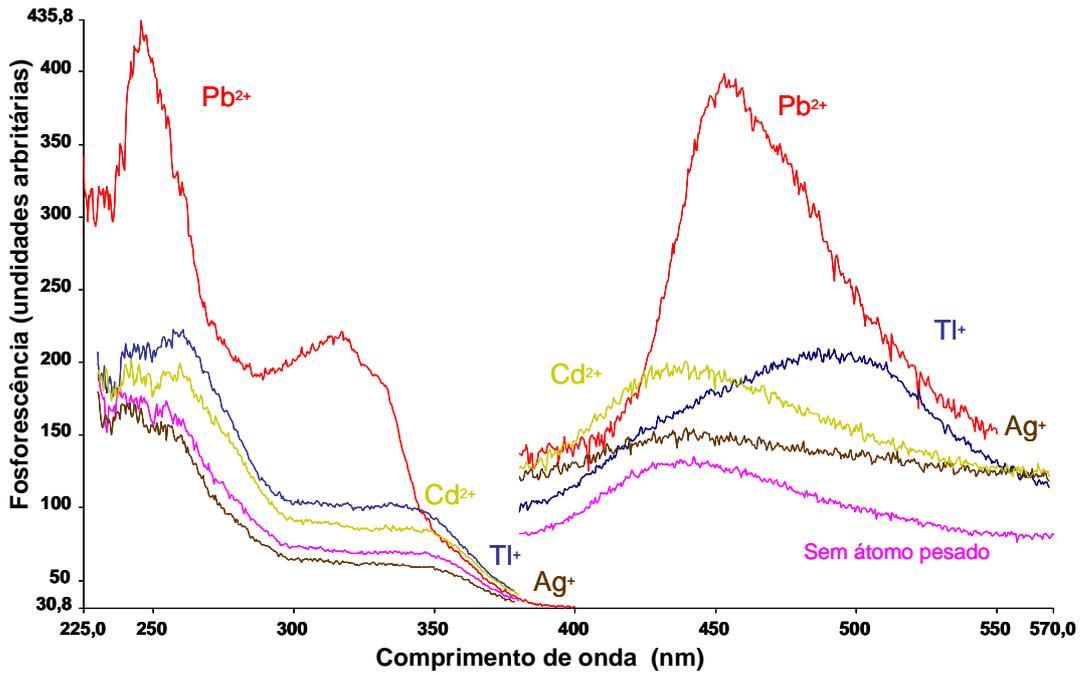


Figura 43: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ( $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) em acetona/água após exposição ao UV.

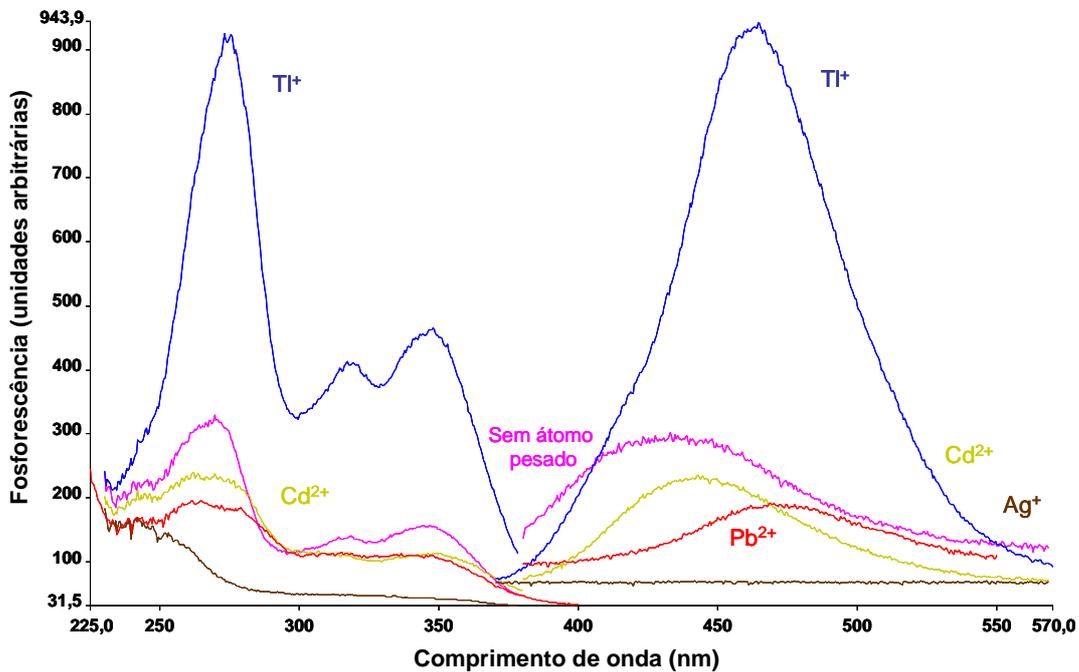


Figura 44: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin ( $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) em acetona/solução NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  após exposição ao UV.

### 4.3.2. Otimização dos parâmetros experimentais

Com objetivo de maximizar o sinal fosforescente da enrofloxacinina os parâmetros mais relevantes foram avaliados por estudo univariado. Os seguintes fatores foram estudados: (i) influência da quantidade do sal de átomo pesado no substrato sólido (ii); concentração de NaOH na solução de analito; (iii) influência da presença de surfactante (SDS) no substrato sólido e (iv) tempo de irradiação UV.

#### 4.3.2.1. Influência da quantidade de sal de átomo

Conforme mencionado, o efeito externo do átomo pesado tem um papel muito importante na indução ou amplificação da fosforescência de substâncias orgânicas. O átomo pesado atua aumentando a velocidade do cruzamento entre os estados excitados singleto e tripleto, aumentando a intensidade fosforescente. Sabendo que a magnitude da amplificação de sinal fosforescente é dependente da quantidade depositada de sal de átomo pesado, foi realizada a otimização desse parâmetro experimental. Este estudo deve ser realizado de modo cuidadoso, pois se a quantidade do sal de átomo pesado estiver abaixo da quantidade ideal, poderá não haver observação de sinal fosforescente do analito de interesse ou a amplificação da fosforescência do mesmo poderá ser aquém do que potencialmente poderia ser obtido. Por outro lado, elevadas quantidades de sal podem acarretar em decréscimo do sinal fosforescente, provocado efeito pré-filtro que atenua a radiância do feixe de excitação incidente.

Para o teste, solução de enrofloxacinina preparada em acetona/NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) 50/50% v/v na concentração 5 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> foi utilizada após ser irradiada com UV durante 60 min, já que os testes preliminares mostraram aumento de sinal nessa condição. O estudo foi realizado com adição no substrato de volumes de 5 µl de soluções de TINO<sub>3</sub> em diversas concentrações (de 0,05 a 0,25 mol L<sup>-1</sup>). Para estender a faixa estudada de quantidades de TINO<sub>3</sub> no substrato, adições sucessivas de 5 µl da solução 0,25 mol L<sup>-1</sup> de TINO<sub>3</sub> foram feitas no substrato. Assim, em termos de massa do sal, a faixa estudada foi entre 66,5 a 1332 µg. O resultado desse teste mostrou que uma faixa menor deveria ser analisada, pois o sinal fosforescente diminuiu com uma quantidade de TINO<sub>3</sub>. Conseqüentemente, um novo estudo foi realizado com soluções de

TiNO<sub>3</sub> em uma faixa de concentração entre 0,01 a 0,20 mol L<sup>-1</sup> (de 13,3 a 266 µg). A concentração de sal que induziu melhor sinal para a enrofloxacin foi 0,06 mol L<sup>-1</sup> (79,9 µg do sal) , como mostra a Figura 45. Testes de robustez indicaram que uma variação de ± 0,01 mol L<sup>-1</sup> na concentração podem ocorrer sem alterar o sinal fosforescente da enrofloxacin.

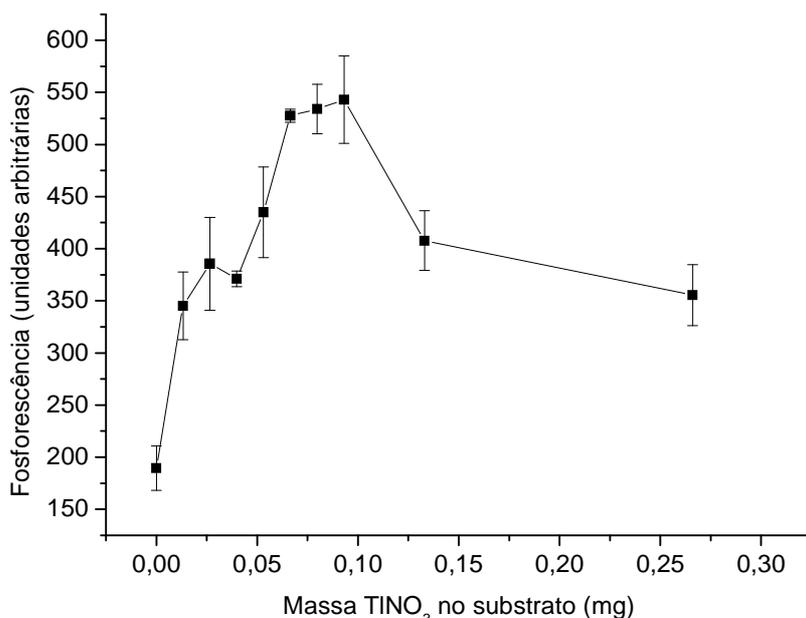


Figura 45: Influência da massa de TiNO<sub>3</sub> no sinal fosforescente da enrofloxacin (89.8 ng).

#### 4.3.2.2.

#### Concentração de NaOH na solução de analito

O controle da concentração hidrogeniônica da solução do analito aplicada na matriz sólida é um fator que tem sido de grande importância na SS RTP. Normalmente, a intensidade do sinal é diminuída tanto em meios extremamente ácidos quanto em meios extremamente básicos.<sup>79</sup> Porém, isto não é uma regra e cada molécula pode ter um comportamento diferente em função da variação do pH. A protonação ou desprotonação de espécies químicas em solução pode também proporcionar criação de sítios com carga elétrica e uma melhor adsorção do analito quando depositado no substrato de celulose. Tal fato implica em maior rigidez molecular depois de adsorvidas no papel. No estudo realizado

por Nava<sup>22</sup>, o pH teve influência no sinal fosforescente das fluorquinolonas analisadas (levofloxacin, norfloxacin e ciprofloxacin).

Para os testes a solução de enrofloxacin  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada em meio básico (acetona: solução de NaOH 50/50% v/v) sendo que a concentração final de NaOH foi variada entre 0,01 a 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ . Essas soluções foram irradiadas com UV por 60 min e em seguida depositadas nos substratos sólidos contendo 79,9  $\mu\text{g}$  de  $\text{TlNO}_3$ . O resultado obtido, Figura 46, mostrou que a intensidade do sinal fosforescente passa por um máximo em concentração final de NaOH igual a 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , sendo que esse foi o valor ótimo escolhido para os demais estudos.

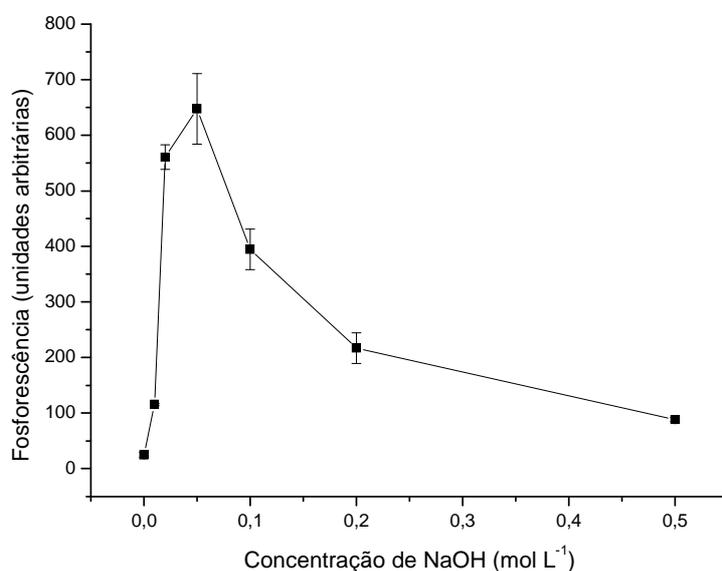


Figura 46: Influência da basicidade da solução do analito no sinal fosforescente da enrofloxacin (89.8 ng).

#### 4.3.2.3.

#### Influência da concentração de SDS no substrato sólido

Modificadores de superfície, principalmente surfactantes, têm sido utilizados para melhorar as interações entre o analito, o íon de átomo pesado e o substrato de celulose. O efeito causado pelo surfactante tem se mostrado bastante dependente de sua quantidade no local onde o analito é aplicado, visto que usando uma grande quantidade do mesmo, pode haver um decréscimo de sinal fosforescente por causa da dificuldade de interação entre o átomo pesado e o analito.

O efeito do SDS depositado no substrato sólido foi estudado na faixa de concentração entre 0,01 a 0,25 mol L<sup>-1</sup> (13,3 a 333 µg). As condições experimentais otimizadas para concentração de NaOH e de massa de TiNO<sub>3</sub> foram usadas. A solução de enrofloxacin foi irradiada por 60 min. O resultado, Figura 47, indicou que a presença de SDS não causou alteração significativa no sinal fosforescente da enrofloxacin.

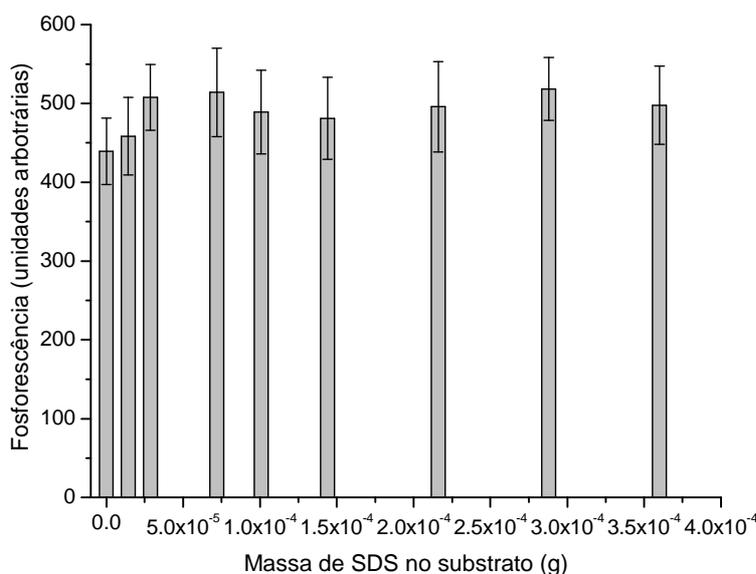


Figura 47: Estudo do sinal fosforescente da enrofloxacin em função da variação da massa de SDS depositado no substrato de papel na presença de 79,9 µg de TiNO<sub>3</sub>.

#### 4.3.2.4.

#### Influência do tempo de exposição da enrofloxacin ao UV

O tratamento da solução de analito com UV pode gerar derivados fotoquímicos com características fosforescentes distintas dos compostos originais. Tal tratamento pode ser vantajoso por gerar fotoproduto com maior intensidade de sinal e/ou com modificações nas bandas espectrais.

Nos estudos preliminares, um maior sinal fosforescente foi observado quando a solução de enrofloxacin em meio básico foi irradiada com UV por 60 min. Adicionalmente, a exposição ao UV se mostrou necessária por causa da instabilidade do sinal do analito original durante o processo de medição de sinal luminescente. Nesse caso, ficou evidente que o sinal da enrofloxacin se modificava na medida em que a radiação de excitação incidia no substrato. Como o substrato deve ficar pelo menos 2 min no compartimento de amostra

antes da medição, esse tipo de degradação sem controle é um problema para o bom desempenho de um método analítico. Assim, o tratamento fotoquímico foi realizado também com o intuito de gerar um fotoproduto mais estável frente à radiação de excitação.

O estudo foi realizado com soluções de enrofloxacina ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) preparadas nas condições otimizadas em meio básico e levadas ao reator fotoquímico onde foram expostas ao UV por diferentes tempos. As soluções irradiadas foram então adicionadas em substratos sólido contendo  $\text{TINO}_3$ .

Para cada caso (soluções irradiadas por tempos específicos) foram realizadas medições após diferentes intervalos de tempo de exposição do substrato à radiação de excitação no compartimento de amostra. Em outras palavras, as medições foram feitas em substratos (triplicata) após 2, 4 e 6 min de permanência no compartimento de amostra. A Figura 48 mostra a variação do sinal fosforescente em função do tempo em que a solução de analito ficou exposta à radiação UV no reator. Cada barra do gráfico representa a média dos sinais obtidos (levando em consideração todos os tempos de permanência no compartimento de amostra) e seu respectivo desvio padrão.

O gráfico (Figura 48) mostrou que com o tempo de radiação da solução de analito por 30 min, o sinal fosforescente foi maior em aproximadamente 2,5 vezes o sinal da solução não-irradiada. Nessa situação, foi também verificada uma pequena variação de sinal fosforescente (em torno de 4,8%). Esse resultado indicou estabilidade do analito frente à radiação de excitação no compartimento de amostra, ao contrario do resultado obtido com a solução não irradiada, cuja variação ficou em torno de 20%. O tempo de 30 min foi escolhido para irradiação da solução de enrofloxacina em meio básico.

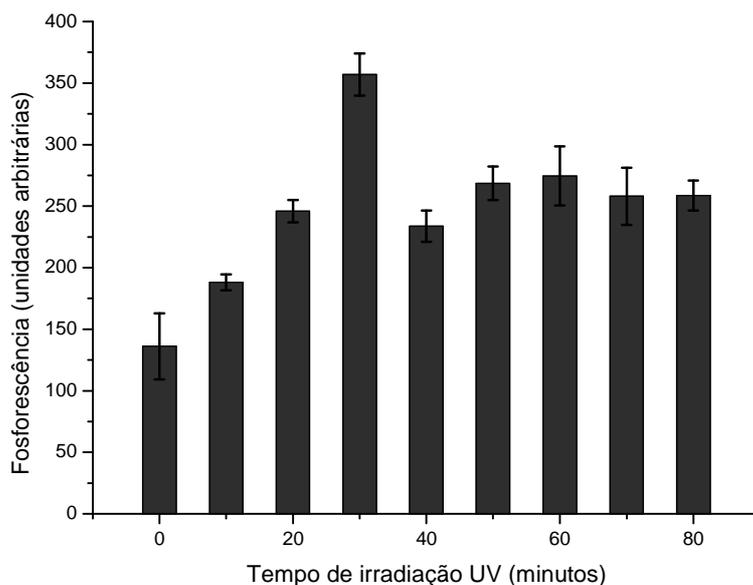


Figura 48: Estudo do tempo de irradiação UV no sinal fosforescente da solução da enrofloxacina em meio básico.

Estudos adicionais foram realizados visando compreender o processo de derivação fotoquímica da enrofloxacina. Para tal, soluções de enrofloxacina preparadas em meio básico foram analisadas por HPLC com detecção por fluorescência antes e após irradiação com UV. O método para as análises no HPLC foi adaptado do trabalho de Marazuela e Moreno-Bondi<sup>34</sup> como descrito no Capítulo 2.

Testes preliminares foram realizados para ajuste do método, como, a verificação da aplicação do método em amostra de enrofloxacina em meio básico, já que no método de referência a enrofloxacina é preparada em metanol. Como o interesse é apenas a verificação de possível sinal de um ou mais fotoproduto um teste foi feito para simplificar o método usando o modo isocrático com fase móvel acetonitrila: tampão fosfato (25 mmol L<sup>-1</sup> em pH = 3,0) 18:82% v/v. O resultado da Figura 49 mostrou que a adaptação do método para eluição isocrática foi viável, assim os estudos foram realizados nessa condição.

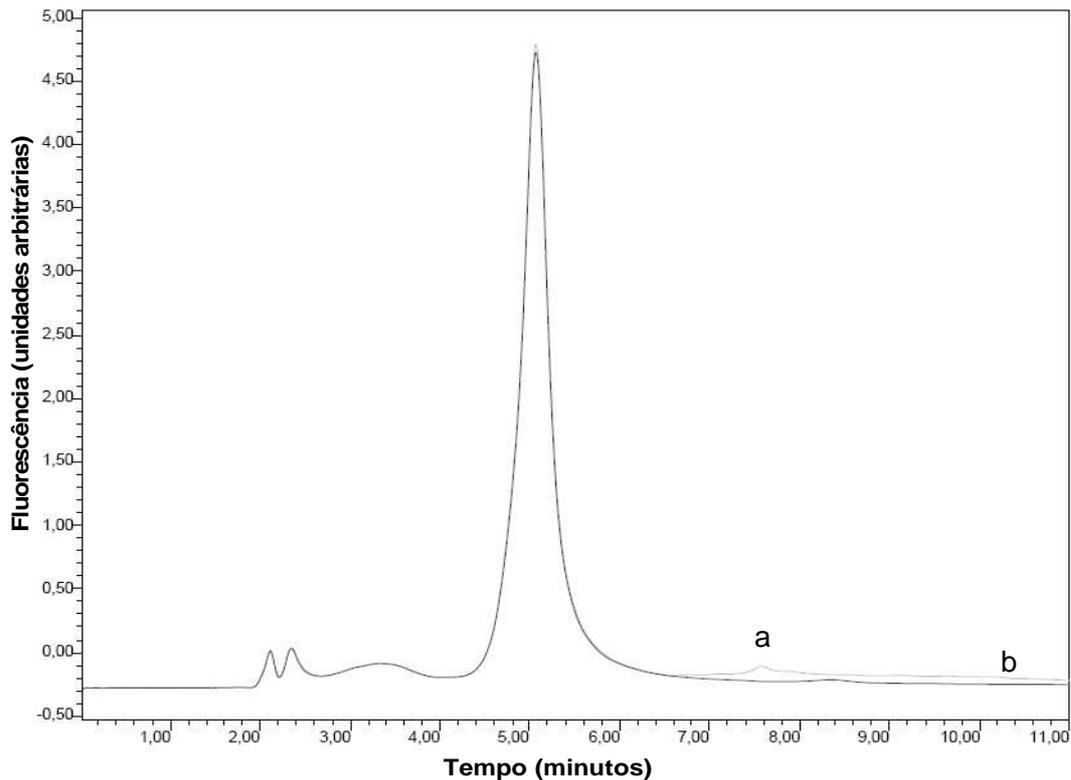


Figura 49: Cromatograma obtidos para solução de enrofloxacina com eluição isocrática (a) e com eluição com gradiente (b) de fase móvel.

Depois do ajuste de método, os testes foram realizados com soluções de enrofloxacina preparadas em meio básico e irradiadas com UV durante uma faixa de tempo entre 0 a 180 min com intervalos de 30 min. Pelo cromatograma (Figura 50) pode-se perceber que o sinal fluorescente original da enrofloxacina (tempo de retenção em 5,5 min) diminui bastante com os primeiros 30 minutos de irradiação UV, mas seu sinal ainda é intenso quando comparado aos pequenos picos que parecem no cromatograma com tempos de eluição de aproximadamente 3,5 e 4,5 min. Um outro pico pode ser percebido nesse cromatograma, mas com baixa intensidade, junto ao pico da enrofloxacina com eluição em aproximadamente 6 min.

Esses cromatogramas provavelmente não apontam o derivado fosforescente da enrofloxacina, pois a fosforescência não poderia ser medida no meio em questão e sem a presença do átomo pesado. No entanto, os resultados apontam a clara modificação na estrutura da enrofloxacina após tratamento com UV. Estudos adicionais devem ser feitos para se tentar identificar a estrutura do fotoproduto em questão.

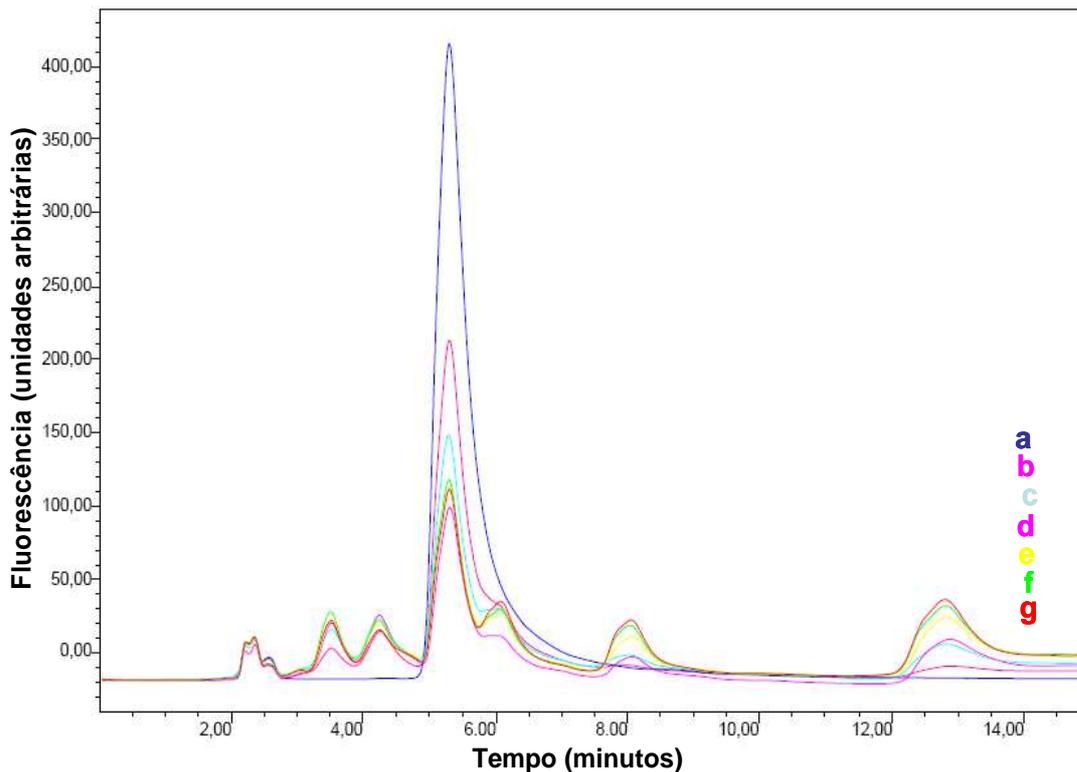


Figura 50: Análise das soluções de enrofloxacina irradiada com UV em diferentes tempos. Cromatogramas: (a) 0, (b) 30, (c) 60, (d) 90, (e) 120, (f) 150 e (g) 180 minutos.

As condições experimentais escolhidas para o método fosforescente são resumidas na Tabela 16.

Tabela 16: Condições experimentais para o método.

Parâmetros	Condições experimentais
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	274/463 nm
Preparo da solução do analito	Acetona:solução de NaOH (0,05 mol L <sup>-1</sup> ) 50:50% v/v
Tempo de irradiação UV	30 minutos
Sal de átomo pesado	80 µg de TINO <sub>3</sub>

### 4.3.3. Validação do método

Seguindo os mesmos conceitos teóricos apresentados no Capítulo 3, o método fosforimétrico foi validado. As características de desempenho analisada para este método foram: linearidade, detectabilidade, exatidão, precisão e

incerteza de medição de fosforescência. Os conceitos teóricos para o cálculo das incertezas serão discutidos assim como os resultados encontrados.

#### 4.3.3.1. Linearidade

Para estudo da linearidade da enrofloxacinina uma curva analítica foi feita utilizando a relação entre a massa de analito depositado no substrato e sinal fosforescente medido na condição ótima. Os parâmetros da curva foram determinados pela regressão linear simples obtida pelo método dos mínimos quadrados (sabendo que sua aplicação deve ser realizada em caso de homoscedasticidade nos pontos amostrados). A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), para avaliar homogeneidade das variáveis foram realizados os testes  $t$  de Student, a prova F de Fischer, o intervalo de confiança do coeficiente angular e também pelo gráfico de resíduos<sup>90</sup>.

A faixa linear para a determinação da enrofloxacinina ficou no intervalo entre 8,99 ng (5  $\mu$ L da solução  $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) a 180 ng (5  $\mu$ L da solução  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) de massa do analito. A Figura 51 apresenta duas curvas analíticas para a enrofloxacinina obtidas em dias diferentes. Cada ponto da curva representa a média de três medições do sinal fosforescente.

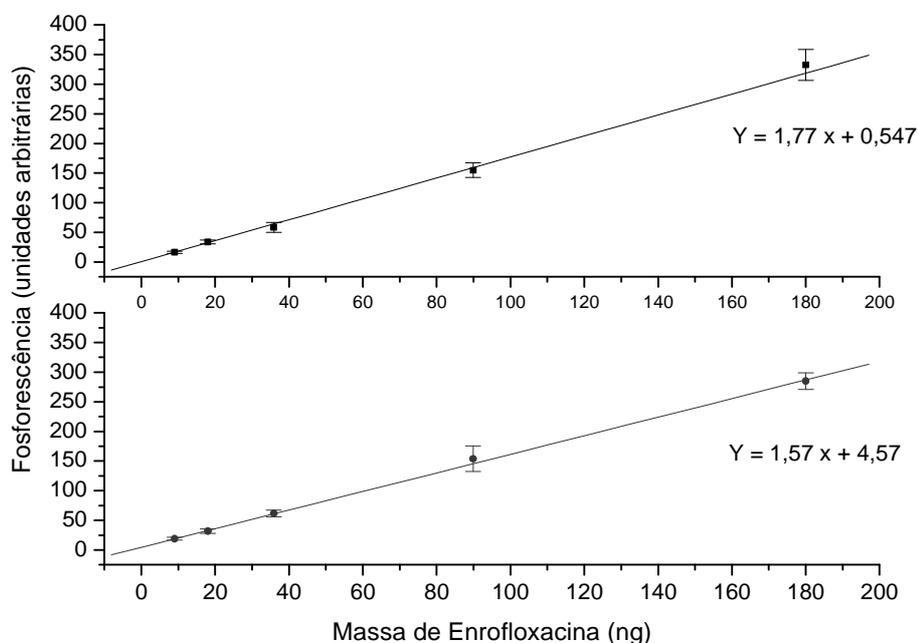


Figura 51: Curva analítica para enrofloxacinina.

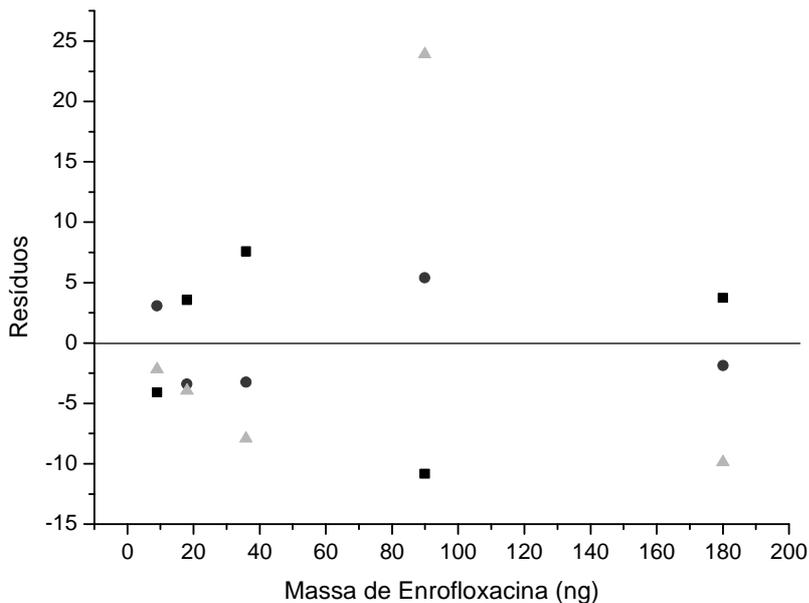


Figura 52: Gráfico de resíduos da curva analítica para enrofloxacina.

Tabela 17: Parâmetros da curva analítica da enrofloxacina

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Coefficiente angular	1,77 ± 0,06	1,57 ± 0,04
Coefficiente linear	0,547 ± 0,131	4,57 ± 0,73
R <sup>2</sup>	0,998	0,999
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	0,998	0,998

O comportamento linear foi indicado pelos valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e pelo coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ), superiores a 99% (Tabela 17). Os desvios padrões 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 padrões dos coeficientes angulares representam à boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições.

O gráfico de resíduos aponta a aleatoriedade dos desvios ao longo da melhor reta, confirmando o comportamento linear da curva analítica (Figura 52).

A adequação do modelo linear pode ser avaliada através dos testes F e t de Student e pelos valores de p. Pelo teste F realizado pelo princípio da ANOVA ( $F_{cal} = MQ_{reg}/MQ_{res}$ ) a adequação do modelo pode ser confirmada. Os valores de F apresentados na Tabela 18 indicam a não existência de relação linear ( $F_{calc.} >$

$F_{\text{crítico}}$ ), ou seja, se aceita a equação da regressão linear ( $\alpha = 0,05$  e  $F_{\text{crítico}} = 10,3$ ). Os valores de  $t$  calculados (41,5 e 54,7) mostram que a hipótese nula (suposição de que a área do pico e a concentração de analito não se relacionam linearmente) pode ser rejeitada, pois esses valores são superiores ao valor de  $t$  crítico ( $t_{0,05,4} = 2,776$ ). Os valores de  $p$  são menores do valor de  $\alpha$  (significância) para o qual rejeitamos a hipótese nula para esta curva analítica. 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, no 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 a enrofloxacinina.

Tabela 18: Valores da análise da variância (ANOVA) para enrofloxacinina.

Padronização interna	Curva 1	Curva 2
$F_{\text{cal}}$	1719	2997
$t_{\text{cal}}$	41,5	54,7
$P_{\text{cal}}$	$3,09 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-5}$

#### 4.3.3.2. Detectabilidade

Os limites de detecção do método foram calculados por dois critérios já apresentados:  $LD = x_b + 3s_b$  e  $LD = 3s_b/a$ . No caso da SSRTP, onde o sinal do branco pode ser relevante, o primeiro critério parece ser o mais adequado pois leva em consideração o sinal do branco ( $x_b$ ). No caso da técnica SSRTP, o limite de detecção também pode ser expresso em termos de massa efetiva de analito depositado no substrato (limites de detecção absoluto, LDA) considerando 5  $\mu\text{L}$  de amostra, o que permite avaliar a capacidade de detecção em termos de massa. O LDA pode ser expresso como indicado na Equação 29:

$$LDA = (LD) \cdot V \cdot MM \quad (29)$$

onde “ $V$ ” é o volume depositado no substrato (5  $\mu\text{L}$ ) e “ $MM$ ” é a massa molar do analito em  $\text{g mol}^{-1}$ .

O procedimento de avaliação do LQ foi semelhante à do LD, foi estimado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 10 vezes o desvio padrão do branco ( $LQ = x_b + 10s_b$ ) e por meio de

parâmetros da curva analítica ( $LQ = 10s_b/a$ ). No caso da massa efetiva de analito (limite de quantificação absoluto, LQA) a equação similar à usada no cálculo do LDA foi aplicada.

A determinação dos LD e dos LQ foi feita considerando a análise de 10 amostras em branco e os resultados são apresentados na Tabela 19.

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação pelos dois critérios utilizados foram próximos, sendo o parâmetro mais realista para detectabilidade em SS RTP aquele que leva em consideração a magnitude do sinal do branco.

Tabela 19: Parâmetros da sensibilidade da enrofloxacin.

Parâmetros	$3s_b/a$		$x_b + 3s_b$		$10s_b/a$		$x_b + 10s_b$	
	LD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	LDA (ng)	LD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	LDA (ng)	LQ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	LQA (ng)	LQ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	LQA (ng)
Enrofloxacin	$6,24 \times 10^{-7}$	1,12	$1,18 \times 10^{-6}$	2,12	$2,08 \times 10^{-6}$	3,74	$2,64 \times 10^{-6}$	4,74

#### 4.3.3.3. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de recuperação nos medicamentos Flotril e Baytril contendo enrofloxacin (formulações farmacêuticas contendo enrofloxacin e que são utilizadas na medicina veterinária). Nesse caso, foi realizada a comparação de resultados do SS RTP com o de um método de referência (HPLC-fluorescência).

O procedimento de preparação das amostras comerciais foi ajustado para que a concentração esperada de enrofloxacin nas soluções estoque dos medicamentos fossem  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  dessas soluções foram coletadas para balões volumétricos de 5 mL e diluída com acetona/NaOH ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) 50/50 % v/v para se obter soluções de trabalho de  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . As soluções foram irradiadas com UV (30 min), sendo em seguida adicionadas no substrato de celulose para determinação fosforimétrica. Para a análise por HPLC, as alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  retiradas foram diluídas em metanol.

Os resultados encontrados pela análise das amostras dos medicamentos pelo método fosforimétrico e por HPLC foram comparados com as concentrações de enrofloxacin descrita em suas respectivas bulas.

Tabela 20: Valores das recuperações encontradas na análise dos medicamentos por SS RTP e HPLC.

Amostras	SS RTP (%)	HPLC (%)
Comprimido	108 ± 8	91,6 ± 4,7
Injetável	107 ± 7	96,6 ± 6,7

Valor esperado nas soluções: Comprimido =  $1,03 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ; Injetável =  $1,04 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

A comparação de resultados obtidos empregando-se o método SS RTP e o método de referência (HPLC) foi feito de modo a avaliar o grau de proximidade entre os resultados, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. As análises foram efetuadas em replicatas autênticas (com seis soluções independentes de amostra), utilizando o método em desenvolvimento e o método de referência<sup>34</sup>, nas mesmas amostras de medicamentos em concentrações iguais.

A comparação entre os métodos SS RTP 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 ( $t_{\text{cal}} = 0,975$  e  $t_{\text{tabelado}} = 2,228$ ) para as amostras analisadas. A Tabela 21 mostra os valores dos parâmetros calculados para o teste estatístico realizado nas amostras.

Tabela 21: Resultado do teste de comparação entre SS RTP e HPLC para enrofloxacin.

Parâmetros	Amostra injetável	Amostra comprimido
$S_p$	$9,0 \times 10^{-6}$	$8,0 \times 10^{-6}$
$t_{\text{cal}}$	0,480	1,04
gl	10	10

$S_p$  = desvio padrão agrupado.

#### 4.3.3.4. Precisão

Para o estudo de repetitividade da enrofloxacin, o cálculo foi feito a partir do desvio padrão relativo (%RSD), realizando dez medições de uma mesma amostra sob as mesmas condições. A repetitividade foi avaliada em três diferentes níveis de concentração.

Para medições sucessivas no mesmo substrato, a repetitividade da enrofloxacin apresentou variações de 0,69 a 3,49%, sendo consideradas excelentes para esta técnica. Esse resultado também indicou a estabilidade do sinal do analito após o procedimento de fotoderivação. No entanto, no caso da SS RTP, as replicatas são realizadas utilizando substratos de papel distintos, ou seja, cada replicata é adicionada em um substrato de papel. Sendo assim, entende-se que para técnicas com esse tipo de característica, o estudo de repetitividade deve também ser realizado usando diferentes substratos. Neste caso, as repetitividades da enrofloxacin apresentaram um aumento significativo, quando comparado com os resultados anteriores medidos em seqüência no mesmo substrato. Os valores variaram entre 12,9 a 18,5%, indicando problemas de homogeneidade dos substratos (variação de sinal de fundo) e as pequenas diferenças na posição de aplicação das soluções no substrato (variação na posição de depósito da solução de analito e coadjuvante). A menor variação foi para o nível médio, que representa o meio da curva analítica onde a incerteza na medição é menor, para esse nível considerando as limitações o resultado obtido foi satisfatório (12,9%).

A reprodutibilidade interna foi calculada neste trabalho, sendo o analista a fonte de variação de medição. As estimativas das variâncias (dentro e entre os grupos) foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), no programa Excel (Microsoft Office). A reprodutibilidade é calculada pelo desvio padrão relativo (%RSD) com os valores de  $MQ_{entre}$  que é a soma das médias quadráticas entre dias e  $MQ_{dentro}$  que é a soma dos médias quadráticas de cada dia (Equações 24 e 25).

Os resultados obtidos para a reprodutibilidade interna variaram entre 1,88 a 4,18%. Para todos os níveis estudados, a reprodutibilidade interna apresentou menor variação quando comparada com os valores de repetitividade com troca de substrato. Este fato indica que, o substrato é o fator mais relevante na degradação da precisão, não importante a troca de analista.

O teste F baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática dos valores obtidos entre analista ( $MQ_{\text{entre}}$ ) é dividida pela média quadrática dos valores obtidos por um mesmo analista ( $MQ_{\text{dentro}}$ ), foi utilizado para dizer se existe diferença significativa entre as médias obtidas. Pelos valores de F encontrados (Tabela 22) podemos dizer, com um nível de confiança de 95%, que não existe diferença significativa entre as médias obtidas pelos analistas, pois  $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$  para todos os níveis ( $F_{\text{crítico}} = 4,41$ ). Todos os dados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Precisão da enrofloxacina.

Nível	Repetitividade (%)		Reprodutibilidade interna (%) (troca de analista)	$F_{\text{cal}}$
	(mesmo substrato)	(troca de substrato)		
1	3,49	18,5	4,07	0,558
2	1,80	12,9	4,18	1,71
3	0,693	17,2	1,88	0,904

Níveis: 1 =  $5,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; 2 =  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ; 3 =  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.3.3.5. Incertezas

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/CITAC<sup>63</sup> 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 implementação do ISO GUM (Guia para a expressão da incerteza de medição)<sup>91</sup> 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 influência<sup>92</sup>. 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 freqüencista), conforme Equação 30.

$$u_{x_i} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (30)$$

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 declarado<sup>93</sup>. A expressão que representa cada tipo de incerteza é apresentada na Equação 31.

$$u(x_i) = c \quad c = u_{\text{certificado}} = \frac{U_{(\text{declarada})}}{k} \quad (31)$$

onde “c” é a estimativa do resultado, “ $U_{declarada}$ ” 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 32).

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i)} \quad (32)$$

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 esta 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 33. 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.

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots} \quad (33)$$

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 34.

$$U = k_{v,p} u_c \quad (34)$$

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 35, de Welch- Satterthwaite:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (35)$$

onde “ $u_c$ ” é a incerteza combinada, “ $u_i$ ” é a incerteza padronizada associada à  $i$ -ésima fonte de incerteza, “ $v_i$ ” é o nº de graus de liberdade associado à  $i$ -ésima fonte de incerteza, “ $N$ ” é o nº total de fontes de incertezas analisadas.

Da aplicação da Equação 35, resulta o número de graus de liberdade efetivo. O valor “ $k$ ” para o nível de confiança de 95% pode então ser obtido da tabela estatísticas.

O resultado da medição é, então, convenientemente expresso como:

$$Y = y \pm U \quad (36)$$

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 este trabalho foram calculadas com base no trabalho realizado por Cunha<sup>65</sup>. Neste trabalho um diagrama de causa e efeito para a

medição de fosforescência por SS RTP, onde se encontra selecionados os componentes relevantes para os cálculos (Figura 53).

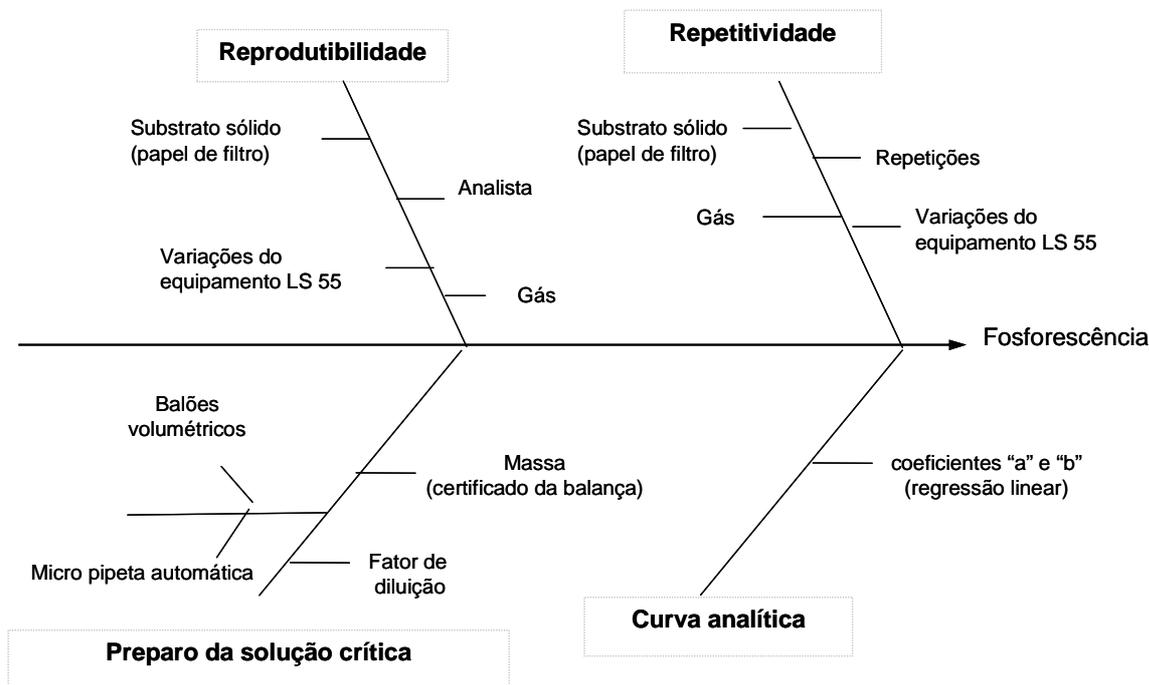


Figura 53: Diagrama de causa e efeito para a técnica SS RTP.

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

A incerteza associada à repetitividade da amostra ( $u_{repe}$ ) foi calculada pela estimativa do desvio padrão " $s_r$ ", com dez repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições. E a incerteza associada à reprodutibilidade da amostra foi calculada pela estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade " $s_R$ ", através de 10 substratos distintos de uma mesma amostra para cada analista, sob as mesmas condições. A estimativa da incerteza da reprodutibilidade ( $u_{repro}$ ) foi calculada pela soma dos quadrados dos desvios da repetitividade de cada analista " $s_r$ " e entre os analistas " $s_{entre}$ ", conforme Equação 37.

$$\mu_{Repro} = \sqrt{(s_r^2 + s_{entre}^2)} \quad (37)$$

A estimativa da incerteza do componente curva foi calculada com base nos coeficientes da curva analítica, Equação 38.

$$u_{curva} = \sqrt{\left[ (c_{ia}^2 \times s^2 a) + (c_{ib}^2 \times s^2 b) + (2 \times c_{ia} \times c_{ib} \times u_a \times u_b \times r) \right]} \quad (38)$$

onde:  $c_{ia}$  é o coeficiente de sensibilidade igual a  $\frac{y_{maior(u.a.)} - b}{a^2}$  (“b” intercepção da reta);  $c_{ib}$  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<sup>-1</sup> 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 massa, micropipeta e balão volumétrico contribuem na estimativa da incerteza associada ao preparo de soluções críticas. Sendo assim, a incerteza associada ao preparo de soluções críticas ( $u_s$ ) foi calculada conforme a Equação 39.

$$u_s = \sqrt{\left[ \left( \frac{u_{mp1}}{k} \right)^2 + \left( \frac{u_{mp2}}{k} \right)^2 + \left( \frac{u_{bv}}{k} \right)^2 \right] \times (u_{fd}) + \left( \frac{u_{bal}}{k} \right)^2} \quad (39)$$

onde: “ $u_{mp1}$ ” é a incerteza da micropipeta de 20-200  $\mu$ L, “ $u_{mp2}$ ” é a incerteza da micropipeta de 5  $\mu$ L, “ $u_{bv}$ ” 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 ( $u_{comb}$ ). Os certificados referentes às calibrações da balança, 2 micropipetas e balão volumétrico estão nos anexos I, II e III.

Com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza foram calculadas a incerteza combinada e incerteza expandida, conforme cálculo apresentado nas Equações 40 e 41, respectivamente.

$$u_c = \sqrt{(u_r^2 + u_R^2 + u_s^2 u_{curva}^2)} \quad (40)$$

$$U = u_c \times K \quad (41)$$

A Tabela 23 apresenta um resumo das incertezas calculadas para o nível de concentração de analito igual a  $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Tabela 23: Valores das incertezas calculadas para os três níveis de concentração

Fontes de incertezas	Incertezas ( $\text{mol L}^{-1}$ )
Preparo de soluções críticas	$9,14 \times 10^{-7}$
Repetitividade	$1,72 \times 10^{-5}$
Reprodutibilidade	$1,88 \times 10^{-6}$
Curva analítica	$4,76 \times 10^{-6}$
Incerteza combinada	$1,79 \times 10^{-5}$
Incerteza expandida	$3,59 \times 10^{-5}$

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 54, apresenta a contribuição de cada componente de incerteza para o nível estudado. Considerando o valor de concentração pode - se confirmar que a maior contribuição de incerteza é a repetitividade.

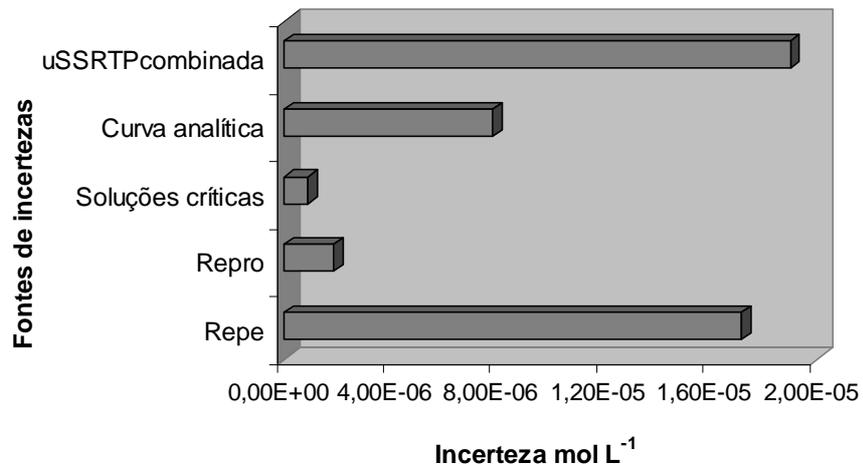


Figura 54: Gráfico de barras mostrando a contribuição de incerteza de cada componente no nível estudado.

## 5 Conclusões e trabalhos futuros

Métodos analíticos baseados em MECC e SS RTP foram desenvolvidos e validados para determinação de estrobilurinas (picoxistrobina e piraclostrobina) e enrofloxacina, respectivamente. O método em MECC foi inicialmente otimizado para promover a separação dos fungicidas e para avaliação dos resultados em termos de reprodutibilidade. Uma ótima separação dos picos foi obtida com boa simetria e resolução. A validação do método foi muito importante para avaliar o desempenho das análises no CE. Em busca de aumentar a sensibilidade, não foi possível aplicar rotineiramente a cela de caminho óptico alongado nas análises, mas seu uso mostrou ser eficiente no aumento do sinal analítico. Alternativamente, para aumentar a sensibilidade, o método de pré-concentração em linha foi aplicado com sucesso nas determinações dos analitos, possibilitando aumentar o sinal analítico em 5 vezes e chegar a limites de detecção e quantificação na ordem de  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> o que equivale a centenas de mg L<sup>-1</sup>. A presença do padrão interno azoxistrobina não provocou, em termos da melhoria da resposta linear e de correção nos tempos de migração relativos, a melhoria que se esperava. No entanto, quando o método foi aplicado em amostras de urina e água de riacho, valores de recuperações satisfatórios para os analitos em níveis de resíduos foram obtidos, em especial, o uso do padrão interno foi importante no resultado encontrado para a piraclostrobina. A precisão do método (repetitividade e reprodutibilidade interna) tanto para a área quanto para o tempo de migração, apresentou resultados satisfatórios independentemente do uso do padrão interno.

O desenvolvimento do método por SS RTP foi inicialmente baseado em estudos preliminares para o conhecimento das características fosforescentes da enrofloxacina. O maior sinal fosforescente foi alcançado pela presença de nitrato de tálio, a partir de soluções de analito preparadas em meio básico após irradiação UV durante 30 minutos. Nessas condições o sinal apresentou maior estabilidade frente à radiação de excitação. O estudo das soluções de enrofloxacina irradiadas utilizando o HPLC mostrou apenas que ocorrem modificações na estrutura do fotoproduto em questão, outro método deve ser utilizado para identificação do composto (espectrometria de massas). A

validação do método fosforescente foi realizada e os limites de detecção e quantificação encontrados ficaram na ordem de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> com valores em termos de massa depositada no papel igual a 2,12 e 4,74 ng, respectivamente. O estudo de comparação entre os métodos de SS RTP e HPLC mostrou que não existe diferença significativa (nível de significância de 5%) entre eles na determinação da enrofloxacin a em formulações farmacêuticas. A precisão do método na medição do sinal analítico é afetada pela não homogeneidade dos substratos sólidos, esse resultado foi mostrado pelos valores de repetitividade. No cálculo da incerteza da medição do sinal fosforescente da enrofloxacin a a repetitividade nas mudanças de substrato foi o componente que mais contribuiu na incerteza combinada.

Como trabalhos futuros para o método desenvolvido por MECC sugerem-se:

- i. Uma nova avaliação do uso do padrão interno, como também a busca de outra substância que possa ser usada para esse propósito sem estar presente na matriz analisada.
- ii. Aplicação da cela de caminho óptico alongado em conjunto com a pré-concentração em linha para um grande aumento na sensibilidade do método.
- iii. A inclusão de um novo composto da família das estrobilurinas no método aumentado assim o número de compostos determinados e possível aplicação em amostras de frutas onde possam estar presentes.

Para o método em SS RTP seria interessante trabalhar os seguintes itens:

- i. Avaliação de outro substrato sólido, como o Nylon, visando à minimização da repetitividade do método, uma vez que tem uma forte contribuição para a incerteza de medição. O Nylon é um substrato interessante, pois permite a observação de intenso sinal fosforescente em ambiente de baixo sinal de fundo. Outra forma de minimizar a repetitividade é fazer adaptações do suporte de substrato sólido de modo ser possível a busca de maior sinal fosforescente no momento da leitura, diminuindo assim erros de adição das soluções no centro do papel.
- ii. Aplicação do método para determinação da enrofloxacin a em amostras biológicas como leite e urina, sendo necessário um estudo de extração em fase sólida para minimizar possíveis

interferências e aumentar a sensibilidade com pré-concentração da amostra.

## 6 Referências

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> TAYLOR, M. J, HUNTER, K, HUNTER, K. H, LINDSAY, D, BOUHILLEC, S. L, *Multi-Residue Method for Rapid Screening and Confirmation of Pesticides in Crude Extracts of Fruits and Vegetables Using Isocratic Liquid Chromatography With Electro spray Tandem Mass Spectrometry*, **Journal of Chromatography**, v. 982, p. 225-236, 2002.

<sup>4</sup> JEWESS, P.; LEE, P.; NICOLSS, P.; PLIMMER, J., *Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides*, **Royal Soc. of Chemistry**, p.1, 1999.

<sup>5</sup> ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G, *The Strobilurins – New Antifungal Antibiotics from the Basidiomycete Strobilurus Tenacellus*, **Journal of Antibiotcs**, v. 30, p. 806 – 810, 1977

<sup>6</sup> SCHRAMM, G.; STEGLICH, W.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F. *Antibiotics from basidiomycetes, III. Strobilurin A And B, Antifungal Metabolites from Strobilurus Tenacellus*, **Chemische Beriche**, v. 111, p. 2779 – 2784, 1978.

<sup>7</sup> BALBA, H., *Review of Strobilurin Fungicides Chemicals*, **Journal of Envionmental Sciense and Health Part B**, v. 42, p. 441 – 451, 2007.

<sup>8</sup> KIM, B. S.; HWANG, B. K., *Microbial Fungicides in the Control of Plant Diseases*, **Journal Phytopathology**, v. 155, p. 641 – 653, 2007.

<sup>9</sup> FISHEL, F.M., *Pesticide Toxicity Profile: Strobilurins Pesticides*, PI – 67, **U. F. IFAS Extention**, 2005.

<sup>10</sup> Índice Monográfico, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVIA, P46 e P50.

<sup>11</sup> 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.

<sup>12</sup> 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.

<sup>13</sup> 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 A**, v. 1036, p.161-169, 2004

<sup>14</sup> CHRISTENSEN, H. B.; GRANBY, K.; Method Validation for Strobilurin Fungicides in Cereals and Fruit, **Food Additives and Contaminants**, v. 18, p. 866-874, 2001.

<sup>15</sup> 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.

<sup>16</sup> 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.

<sup>17</sup> 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.

<sup>18</sup> 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.

<sup>19</sup> 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.

<sup>20</sup> LESHNER, G. Y.; GRUETT M. D.; FROELICH, E. J., 1,8-Naphthyridine Derivates – A New Class of Chemotherapeutic Agents, **Journal Of Medicinal & Pharmaceutical Chemistry**, v. 5, p. 1063-&, 1962.

<sup>21</sup> PETERSON, L. R., *Quinolone Molecular Structure-Activity Relationships: What We Have Learned About Improving Antimicrobial Activity*, **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. S180-S186, 2001.

<sup>22</sup> NAVA, I. S. J. *Determinação Seletiva de Fluoroquinolonas por Fosforimetria na Temperatura Ambiente Suportada em Substrato de Celulose com Nitrato de Tório*, *Dissertação de Mestrado – Departamento de Química*, **PUC – RIO**, 2007.

<sup>23</sup> MANSILLA, A. E.; PEÑA, A. M. DE LA; GÓMEZ, D. G.; LÓPEZ, F. S.; *Determination of Fluoroquinolones in Urine and Serum by Using High Performance Liquid Chromatography and Multiemission Scan Fluorimetric Detection*, **Talanta**, v. 68, p. 1215 – 1221, 2006.

<sup>24</sup> MITCHELL, M. A., *Therapeutic Review Enrofloxacin*, **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 15, p. 66-69, 2006.

<sup>25</sup> [http://www.kinetomax.com.br/fr\\_dados\\_tecnicos.asp?pagina=3](http://www.kinetomax.com.br/fr_dados_tecnicos.asp?pagina=3)

<sup>26</sup> HUNG, J. F.; QUIONG, W. Y., *Determination of Fluroquinolones in Eggs Using In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography*, **Analitycal Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1228 – 1235, 2006.

<sup>27</sup> HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D., *Development of a New Sampe Pretreatment Procedure Based on Pressurized Liquid Extration for the Determination of Fluoroquinolones Residues in Table Eggs*, **Journal of Chromatography A** v. 1140, p. 63-70, 2007.

<sup>28</sup> BELAL, F.; AL-MAJED, A. A., AL-OBAID, A. M., *Methods of Analysis of 4 – Quinolones Antibacterials*, **Talanta**, v. 50, p. 765 – 786, 1999.

<sup>29</sup> NAVALON, A.; BLANC, R.; REYES, L.; NAVAS, N.; VILCHEZ, J. L., Determination of the Antibacterial Enrofloxacin by Differential-Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry, **Analytical Chimica Acta**, v. 454, p. 83-91, 2002.

<sup>30</sup> RIZK, M.; BELAL, F.; IBRAHIM, F.; AHMED, S.; EL-ENANY, N. M., *Voltammetric Analysis of Certain 4 –Quinolones in Pharmaceutics and Biological Fluids*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 211 – 218, 2000.

<sup>31</sup> ASKAL, H.; REFAAT, I.; DARWISH, I., *Evaluation of N-Bromosuccinimide as a New Analytical Reagent for the Spectrophotometric Determination of Fluoroquinolone Antibiotics*, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 1551-1556, 2007.

<sup>32</sup> MOSTAFA, S.; EL-SADEK, M.; ALLA, E. A.; *Spectrophotometric Determination of Ciprofloxacin and Pefloxacin Through Charge Transfer Complex Formation*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 133-142, 2002.

<sup>33</sup> USLU, M. O.; YEDILER, A.; BALCIOGLU, I. A.; HOSTEDE-SCHULTE, S., *Analysis and Sorption Behavior of Fluoroquinolones in Solid Matrices*, **Springer Science**, v. 190, p. 55-63, 2008.

<sup>34</sup> MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M.D.; *Multiresidue Determination of Fluoroquinolones in Milk by Column Liquid Chromatography with Fluorescence and Ultraviolet Absorbance Detection*. **Journal of Chromatography A**, v. 1034, p. 25-32, 2004.

<sup>35</sup> Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE), Council Regulation N° 2377/90 L224, 991, 2601, 1990.

<sup>36</sup> KOWALSKI, P.; PLENIS, A., *Simultaneous Determination of Six Quinolones Antibiotics in Poultry and Porcine Samples By Capillary Electrophoresis*, **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 52, p. 81-85, 2008.

<sup>37</sup> ZHAO Y. Y.; WANG L. J.; LI Y.Q.; HAN Y. Y.; DU G. L., *On-Line Sweeping Determination of Quinolones in Pork Tissue by Micellar Capillary Electrophoresis*, **Chemical Journal Of Chinese Universities-Chinese**, v. 28, p. 62 – 64, 2007.

<sup>38</sup> HERNÁNDEZ, M.; AGUILAR, C.; BORRULL, F.; CALULL, M, *Determination of Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Flumequine in Pig Plasma Samples by Capillary Isotachophoresis – Capillary Zone Electrophoresis*, **Journal of Chromatography B**, v. 772, p.163 -172, 2002.

<sup>39</sup> BATTS, B. D.; FATHONI, A. Z., *A Literature-Review on Fuel Stability Studies with Particular Emphasis on Diesel Oil*, **Energj. Fuel**, v. 5, p. 2 -21, 1991

<sup>40</sup> MARQUES, F. F. C., *Fosforimetria na Temperatura Ambiente e em Substrato Sólido (FTASS) para a Determinação de dois Derivados da Beta – Carbolina (Harmane e Harmine)*. **Dissertação de Mestrado**. Rio de Janeiro: PUC, 2005.

<sup>41</sup> PÉREZ, L. R. M.; BORGES, H. J.; CIFUENTES, A.; DELGADO, M. Á. R.; *MEKC Combined with SPE and Sample Stacking for Multiple Analysis of Pesticides in Water Samples at the ng/L Level*, **Electrophoresis**, v. 28, p. 1805 – 1814, 2007.

<sup>42</sup> KHALEDI, M. G, *High-Performance Capillary Electrophoresis – Theory, Techniques, and Applications*, **Chemical Analysis**, v. 146, 1998.

<sup>43</sup> **Operating and Service Manual – Model 303A – Static Mercury Drop Electrode**. EG&G, Princeton applied Research: Estados Unidos, p. II- 3, 1984.

<sup>44</sup> DORBON, M. e BERNASCONI, C. *Nitrogen-Compounds in Light Cycle Oils - Identification and Consequences of Aging*, **Fuel**, v. 68, p. 1067 , 1989.

<sup>45</sup> CARDOSO, C. E. MARTINS., *Utilização da Fosforimetria na Temperatura Ambiente Suportada em Substrato Sólido para a Determinação Seletiva de Compostos Policíclicos Aromáticos Nitrogenados e Sulfurados em Gasolina e em Sedimento*, Departamento de Química, PUC-RJ, 2007.

<sup>46</sup> TAVARES, M. F. M, *Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos*, **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173 – 181. 1996.

<sup>47</sup> HEIGER, D., *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*, **Hewlett – Packard**, Publicação número 5968-9963E, 2000.

<sup>48</sup> NURSTEN, R. M. A., *Capillary Electrophoresis for Food Analysis – Method Development*, **Royal Society of Chemistry**, 2000.

---

<sup>49</sup> TERABE, S.; QUIRINO, J. P., *Sample Stacking of Cationic and Anionic Analytes in Capillary Electrophoresis*, **Journal of Chromatography A**, v. 92, p. 119 -135, 2000.

<sup>50</sup> TISELIUS, A.; JERSTEDT, S.; HJERTEN, S., *Some Aspects of Use of Continuous and Discontinuous Buffer Systems in Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, **Analytical Biochemistry**, v. 11, p.219, 1965.

<sup>51</sup> TUIEL, E.; FERNÁNDEZ, 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.

<sup>52</sup> CHIEN, R. L.; BURGI, D. S., *Field Amplified Sample Injection in High-Performance Capillary Electrophoresis*, **Journal of Chromatography**, v. 559, p. 141 - 152, 1991.

<sup>53</sup> MIKKERS, F. E. P; EVERAEST, F. M.; VERHEGGEN, T. P. E., *Concentration Distributions in Free Zone Electrophoresis*, **Journal of Chromatography**, v. 169, p. 1 - 10, 1979.

<sup>54</sup> 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 A**, v. 892, p. 187 – 194, 2000.

<sup>55</sup> BORGES, J. H. J.; MONTELONGO, F .J. G; CIFUENTES, A.; DELGADO, M. Á. R., *Determination of Herbicides in Mineral and Stagnant Waters at ng/L Levels Using Capillary Electrophoresis and UV Detection Combined with Solid-Phase Extraction and Sample Stacking*, **Journal of Chromatography A** v. 1070, p. 171 – 177, 2005.

<sup>56</sup> PYELL, U., *Electrokinetic Chromatography, Theory, Instrumentation e Applications*, **Wiley**, 2006.

<sup>57</sup> NEUE, D. U., *HPLC Columns: Theory, Thechnology, and Praticce*, **Wiley**, 1997.

<sup>58</sup> **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005**. *Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração*.

<sup>59</sup> INMETRO, DOQ – CGCRE – 0008, *Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, Revisão 02 – Junho/2007.

---

<sup>60</sup> HARRIS, D. C., *Análise Química Quantitativa*, 5ª Edição, Editora **LTC**, 2001.

<sup>61</sup> MEIER, P. C., *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, v. 153, **Wiley**, 2000.

<sup>62</sup> 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.

<sup>63</sup> CITAC/EURACHEM, *Guide to Quality in Analytical Chemistry*, 2002.

<sup>64</sup> BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L., et. all., *Avaliação da Exatidão e da Precisão de Métodos de Análise de Resíduos de Pesticidas Mediante Ensaio de Recuperação*, **Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente**, v. 12, p.155, 2002.

<sup>65</sup> CUNHA, A. L. M. C., *Desenvolvimento e Validação de Método Fosforimétrico em Substrato de Celulose para Determinação de Pireno e Criseno*. Tese de Doutorado – Departamento de Química, **PUC - Rio**, Rio de Janeiro, 2007.

<sup>66</sup> VO-DINH, T. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, **Chemical Analysis Series**, v. 68, 1984.

<sup>67</sup> HURTUBISE, R., *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*. **VCH Publishers: New York**, 1990.

<sup>68</sup> SKOOG, D.; LEARY, J., *Análisis Instrumental*, McGraw-Hill: España, 1993.

<sup>69</sup> JOBLONSKI, A. Z., **Physik**, v. 94, p. 38, 1935.

<sup>70</sup> GUNSHEFSKI, M., SANTANA, J. J., STEPHENSON, J. E WINEFORDNER, J. D. *Solid-surfaceRoom-Temperature Phosphorescence*. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 27(2), p. 143-192, 1992.

<sup>71</sup> SCHULMAN, S. G.. *Molecular Luminescence Spectroscopy – Methods and Applications – Part I*. New York: John Wiley & Sons, 1975.

<sup>72</sup> VO-DINH, T. and WINEFORDNER, J. D., **Applied Spectrosc. Review**, v. 13, p.261, 1992.

---

<sup>73</sup> KASHA, M., *Vibrational Fine Structure in the Absorption Spectra of Uranyl and Plutonyl Ions in Aqueous Solution*, **J. Chem. Phys.**, v. 17, p. 349, 1949.

<sup>74</sup> McLURE, D. S.. **J. Chem. Phys.**, v. 17, p. 905, 1949.

<sup>75</sup> CAMPIGLIA, A. D. e GIOIA, S. M. C. *Room Temperature Phosphorescence of Biogenic Índoles in Low Background Paper Enhanced by Heavy Atom Salts and Sodium Dodecyl Sulfate*, **Anal. Chim. Acta**, v. 287, p. 89-94, 1994.

<sup>76</sup> ARRUDA A. F. e CAMPIGLIA A. D., *Phosphorimetric Determination of Indomethacin in Pharmaceutical Formulations*, **Analyst**, v.122, p. 559 – 562, 1997.

<sup>77</sup> FIDANZA, J. e AARON, J. J.. *Evaluation of Filter Papers as Substrates for Solid-Surface Room-Temperature Fluorimetry and Photochemical Fluorimetry*. **Talanta**, v. 33 (3), p. 215-218, 1986.

<sup>78</sup> CAMPÍGLIA, A. D. e DE LIMA, G. C., *Room-Temperature Phosphorimetry of Carbaryl in Low-Background Paper*, **Anal. Chem**, v. 59, p. 2822 - 2827, 1987.

<sup>79</sup> McALEESE, D. L. e DUNLAP, R. B.. *Reduction of Background Emission in Room-Temperature Fosforescence*, **Anal. Chem.**, v. 56, p. 600, 1984.

<sup>80</sup> HURTUBISE, R. J., *Solid-Matrix Luminescence Analysis: Photophysics, Physicochemical Interactions and Applications*, **Anal. Chim. Acta**, v. 351, p. 1-22, 1997.

<sup>81</sup> SEYBOLD, P. G e WHITE, W. *Room Temperature Phosphorescence Analysis: Use of the External Heavy-Atom Effect*. **Anal. Chem.**, v. 47 (7), p. 1199 - 1200, 1975.

<sup>82</sup> WHITE, W. e SEYBOLD, P. G., *External Heavy-Atom Effect on Room-Temperature Luminescence of Adsorbed Dyes*, **J. Phys. Chem.**, v. 81, p. 2035 - 2040, 1977.

<sup>83</sup> BOWER, E. L. e WINEFORDNER, J.D., *Effect Of Sample Environment on Room-Temperature Phosphorescence of Several Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons* **Anal. Chim. Acta.**, v. 102, p. 1 - 13, 1978.

<sup>84</sup> VO-DINH, T. LUE-YEN, E. e WINEFORDNER, J. D., *Room-Temperature Phosphorescence of Several Polyaromatic Hydrocarbons*, **Talanta**, v. 24, p. 146 - 148, 1977.

---

<sup>85</sup> VO-DINH, T., YEN, E. L. e WINEFORDNER, J. D., *Heavy-Atom Effect on Room-Temperature Phosphorimetry*, **Anal. Chem.**, v. 48 (8), p. 1186 - 1188, 1976.

<sup>86</sup> ARRUDA, A. F., AUCÉLIO, R. Q., *Room-Temperature Phosphorimetry for the Selective Determination of Yohimbine in the Presence of Reserpine-Like Indolic Alkaloids*, **Anal. Sci.**, v.18, p. 831 - 834, 2002

<sup>87</sup> RODRIGUEZ, J. J. S., GARCIA J. H., FERRERA, Z. S. e LÁZARO, B. M. *Solid Surface Room Temperature Phosphorescence of Polychlorinated Dibenzofurans Enhanced by a Surface Active Agent*, **Anal. Letters**, v.28, p. 2413-2436, 1995.

<sup>88</sup> HURTUBISE, R. J. *Phosphorimetry - New Developments Include Solid-Surface, Micelle-Stabilies, and Solution-Sensitized Room-Temperature Phosphorescence*, **Anal. Chem.**, v. 55 (6), p. 669A-680A, 1983.

<sup>89</sup> DE LIMA, C. G. e NICOLA, M. M., *Analytical Application Of Room And Low-Temperature (77-K) Phosphorescent Properties of Some 1,8-Naphthyridine Derivatives*, **Anal. Chem.** v. 50, p. 1658 - 1665, 1978.

<sup>90</sup> MEIER, P. C., *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, v. 153, **Wiley**, 2000.

<sup>91</sup> AOAC International – Peer Verified Method Program – Manual on Policies and Procedures, 1998.

<sup>92</sup> *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição – 2ª edição brasileira – ABNT, INMETRO, SBM - Brasil, 1998.*

<sup>93</sup> FREITAS, S. M., *Metodologia Estatística para Validação de Métodos Analíticos Aplicáveis à Metrologia em Química*, Departamento de Metrologia, **PUC-RJ**, 2003.

---

## Anexos

- I. Certificado da calibração da vidraria – balão volumétrico de 10 mL.
- II. Certificado da calibração da micropipeta 100 – 1000  $\mu\text{L}$ .
- III. Certificado da calibração da micropipeta 10  $\mu\text{L}$ .
- IV. Certificado da calibração da balança analítica.

## I. Certificado da calibração da vidraria – balão volumétrico de 10 mL.

**LABORATÓRIO DE CARACTERIZAÇÃO DE FLUIDOS**  
Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22453-900

**LCF**  
DEV. PUC-RIO

Tel: (21) 3527-1173  
Fax: (21) 3527-1165  
e-mail: lcf@lcf.puc-rio.br  
http://www.lcf.puc-rio.br

**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº VOL-005/07**

**DADOS DO CLIENTE**  
Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio  
Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

Nº O.S.: 001/07

Objeto: balão  
Tipo do objeto: volumétrico  
Fabricante: -  
Nº identificação: 5  
Código Cliente: -  
Temp. de referência: 20°C  
Capacidade nominal: 10 mL  
Valor de uma divisão: -

**DADOS DA CALIBRAÇÃO**  
Método: Segundo o Procedimento Interno PR-003 revisado 03, baseado na norma ABNT MB-3-19, que consiste em determinar o peso do volume de água desionizada contido ou transferido.

Dados Ambientais	Temp.	20,1°C	Umidade	50%	Pressão	762 mmHg
Termômetro:	nº ident.	F525	nº cert.	508-473/06	LCF/DCM/PUC-Rio	
Balança 1:	nº ident.	M15079000271 - Satorl D1	nº cert.	11-912/06C	INMETRO	
Balança 2:	nº ident.	00441118700137	nº cert.	DMO 0674/0006	INMETRO	
Higrômetro:	nº ident.	71815	nº cert.	LTR 1702/03	MISORES	
Barômetro:	nº ident.	8271	nº cert.	DMO 0162/0005	INMETRO	

**RESULTADOS OBTIDOS**

volume nominal (mL)	volume a 20°C (mL)	$U$ (mL)	$k$
10	10,002	0,003	2,18

Representa a incerteza expandida, e é o fator de abrangência.

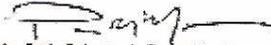
Data da calibração: 09/01/07  
Data de emissão: 12/01/07

Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes  
Gerente Técnico

DCM: • Original nº 01 cópia. • Este certificado atende aos requisitos de acreditação do Organismo que avalia a competência de medição do laboratório e conformidade das medições com os padrões nacionais de medida. • Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a quaisquer outros. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.

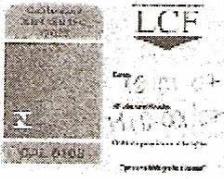
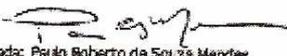
Folha nº 1/1

## II. Certificado da calibração da micropipeta 100 – 1000 µL.

	<b>Laboratório de Caracterização de Fluidos</b> Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900		Tel: (21) 3527-1178 Fax: (21) 3527-1165 e-mail: lcf@lcf.puc-rio.br http://www.lcf.puc-rio.br/		
	<b>CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO n° MVO-003/07</b>				
<b>DADOS DO CLIENTE</b>					
Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900  N° O.S.: 1001/07					
<b>DADOS DO OBJETO</b>					
Objeto: micropipeta Tipo do objeto: deslocamento de ar Fabricante: Hirschmann N° identificação: 4061797 Código Cliente: - Temp. de referência: 20°C Capacidade nominal: 1000 µL Valor uma divisão: 5 µL Fabricante das ponteiros: não informado Modo de pipetagem: normal					
<b>DADOS DA CALIBRAÇÃO</b>					
Método: Segundo o Procedimento Interno PR-006 revisão 03, baseado na norma ISO 8655, que consiste em determinar o peso do volume de água sob certas condições ou transferido.					
<b>Dados Ambientais:</b> Termômetro: Balança 1: Balança 2: Higrômetro: Barômetro:	Temp. 20,2°C 20,2°C 20,2°C 20,2°C 20,2°C	Unidades n° cert. n° cert. n° cert. n° cert. n° cert.	7528 TDS2001816 - Senso 02 1122206582 02641118300117 21015 2821	68% VOL 812/08 31-251-4/05 OMC 0670/2006 OMC 0674/2006 LTE 1702/06 OMC 0163/2006	Precisão 754 mmHg LCF/OLIMSK/446 FM INMETRO INMETRO VISCINES INMETRO
<b>RESULTADOS OBTIDOS</b>					
	volume nominal (µL) 100 500 1000	volume a 20°C (µL) 101,7 504 1006	U (µL) 0,2 1 1	k 2,32 2,32 2,32	
U (incerteza) é incerteza expandida, a k o fator de abrangência.					
Data de calibração: 16/01/07 Data de emissão: 16/01/07					
 Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes Gerente Técnico					
CRÉ: = Original e/ ou cópia. • Este certificado atende aos requisitos de acreditação do Organismo, que avaliou a competência de medição do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. • Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a quaisquer outros. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.					

Folha n° 1/1

III. Certificado da calibração da micropipeta 10  $\mu$ L.

CAL 0108		DADOS DO CLIENTE				
		Laboratório de <b>Caracterização de Fluidos</b> Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900 LCF DEM/PUC-RIO				
CAL 0108		CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº MVO-001/07				
Noms: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea Rio de Janeiro, RJ 22451-900		Tel: (21) 3527-1173 Fax: (21) 3527-1165 e-mail: lcf@ccf.puc-rio.br http://www.lcf.puc-rio.br/prof/mandado/paginas/lcf.html				
N° O.S.: 001/07						
Objeto: micropipeta Tipo do objeto: deslocamento de ar Fabricante: Wheaton N° identificação: 07031569 Código Cliente:		Objeto: micropipeta Tipo do objeto: deslocamento de ar Fabricante: Wheaton N° identificação: 07031569 Código Cliente:				
Temp. de referência: 20°C Capacidade nominal: 10 $\mu$ L Valor uma divisão: 0,01 $\mu$ L Fabricante das ponteiros: não informado Modo de pipetagem: normal		Temp. de referência: 20°C Capacidade nominal: 10 $\mu$ L Valor uma divisão: 0,01 $\mu$ L Fabricante das ponteiros: não informado Modo de pipetagem: normal				
DADOS DA CALIBRAÇÃO						
Método: Segundo o Procedimento Interno PR-006 versão 03, baseado na norma ISO 8635, que consiste em determinar o peso do volume de água Usando a seguinte família de instrumentos:						
Docos Ambientais	Temp.	19,8°C	Umidade	68%	Pressão	104 mmHg
Piômetros	n° ident.	552	n° cert.	VCL 013/03	LGR/DEM/PUC-RIO	
Termômetros	n° ident.	TDS20001816 - Sensor 02	n° cert.	IT-2134/04	IRA	
Balança 1:	n° ident.	1122200582	n° cert.	DNQ 078/2006	INMETRO	
Balança 2:	n° ident.	D2641 18500117	n° cert.	DNQ 0674/2006	INMETRO	
Hidrometros	n° ident.	21915	n° cert.	LTR 170/05	INMETRO	
Barômetros	n° ident.	0221	n° cert.	DNQ 1161/2005	INMETRO	
RESULTADOS OBTIDOS						
	volume nominal ( $\mu$ L)	volume a 20°C ( $\mu$ L)	U ( $\mu$ L)	k		
	5	5,02	0,05	2,32		
U representa a incerteza expandida a 95% nível de confiança.						
Data da calibração: 16/01/07 Data de emissão: 10/01/07						
Assinatura Autorizada:  Paulo Roberto de Souza Mendes Gerente Técnico						
OBS: * Original e/ou cópia. * Este certificado atende aos requisitos de acreditação do Cgcre/Inmetro, que avalia a competência de medição do laboratório e compromete sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. * Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensíveis a qualquer outro. * Não é permitida sua reprodução parcial. * A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.						

---

III. Certificado da calibração da balança analítica.

