

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1. Reagentes

A água utilizada nesse trabalho foi ultrapurificada (resistividade de 18,2 MΩ cm) em um sistema Milli-Q gradiente da Millipore (EUA). O ciclofenil utilizado foi proveniente da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Os testes de dosagem foram realizados no medicamento Menopax®, da Ache (Guarulhos, SP), apresentado em comprimidos de administração oral contendo, segundo bula, 200 mg de ciclofenil por cápsula. Os padrões dos pesticidas: dimoxistrobina 99,9%, piraclostrobina 99,9% azoxistrobina 99,9% e picoxistrobina 99,9% foram adquiridos da Riedel-de-Haen (Alemanha). Soluções 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cu (II), Pb (II) e de Cd (II) foram obtidas da Sigma-Aldrich. O acetato de m-toluila foi adquirido da Chem Service Inc (EUA), este composto é comercializado na forma líquida, possui 97% de pureza e densidade de 1,04 g mL<sup>-1</sup>.

O metanol, etanol e acetonitrila foram de grau HPLC e obtidas da Merck (Darmstad, Alemanha). Os reagentes utilizados para se produzir o tampão Britton-Robinson foram: ácido acético glacial, proveniente (Vetec Química Fina LTDA – Rio de Janeiro, Brasil), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck) e hidróxido de sódio (Merck). O ácido nítrico utilizado para limpeza da vidraria foi adquirido da Vetec, assim como o sulfato de amônio testado para a limpeza da urina.

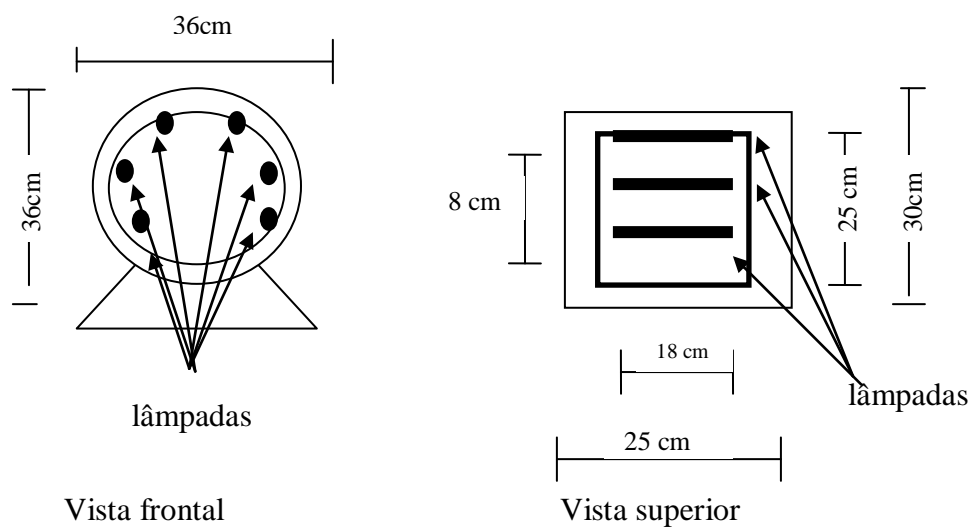
O filtro de papel utilizado foi o N<sup>o</sup> 42, de 150 mm de diâmetro da Whatman International Ltd (Inglaterra). Os cartuchos de pré-extração C-18 (500 mg, 3 mL) da marca AccuBond foram adquiridos da Agilent Technologies (Reino Unido). O filtro de seringa, de 17 mm de diâmetro e de 0,45 µm de diâmetro de poro, foi adquirido da National Scientific Company (Reino Unido). As membranas para filtração dos eluentes orgânicos (47 mm de diâmetro) foram adquiridos da Glass Fiber Filter/Tokyo Soshi Kaisha Ltda (Tóquio, Japão) e as membranas de filtração

para água (1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro do pólo, 47 mm de diâmetro) foram adquirida da Schleicher & Schuell (EUA)

### 3.2. Instrumentação.

#### 3.2.1. Reator fotoquímico.

O reator fotoquímico utilizado para irradiar a solução de ciclofenil, obtendo assim o seu fotoproduto, foi um reator construído no laboratório e constituído por seis lâmpadas para esterilização de vapor de mercúrio, 6W cada. 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. Uma representação esquemática deste reator pode ser visualizada na Figura 9, enquanto a Figura 10 mostra uma foto deste reator.



**Figura 9 – Representação esquemática do reator fotoquímico utilizado.**

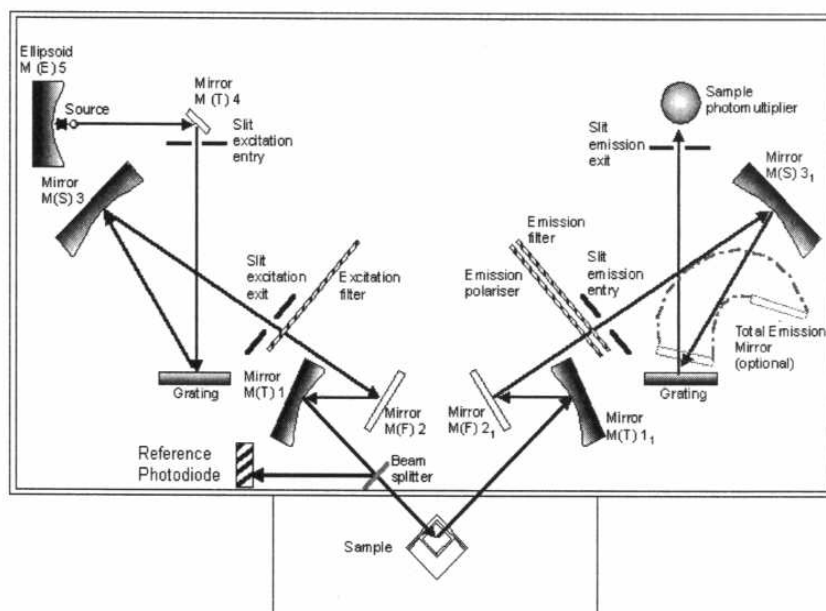


**Figura 10 – Foto do reator fotoquímico .**

### **3.2.2. Espectrofotômetro de luminescência.**

O equipamento utilizado para a realização das medições de luminescência foi um espectrofotômetro de luminescência da Perkin-Elmer modelo LS-45, a partir dele foram obtidos os espectros de excitação e emissão e as intensidades dos sinais fluorescentes do analito estudado. Este equipamento utiliza como fonte uma lâmpada de xenônio pulsátil, de 20 KW de potência, com pulsos de  $8\mu\text{s}$  de duração e com largura inferior a  $10\mu\text{s}$  a meia altura. O esquema ótico é formado por um conjunto de dois monocromadores montados segundo a geometria Monk-Gillieson (como demonstrado na Figura 11) que cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-650 nm para emissão. Este conjunto possui exatidão no comprimento de onda de  $\pm 1,0\text{ nm}$  e reprodutibilidade de  $\pm 0,5\text{ nm}$ .

O detector é um tubo fotomultiplicador com resposta S5 sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm. As fendas para emissão e excitação são fixas em 10 nm, e a velocidade de varredura pode ser ajustada em incrementos de 1 nm variando de 10 a  $1500\text{ nm min}^{-1}$ , sendo utilizado este último valor por propiciar maior velocidade de medição sem perda na sensibilidade. O equipamento é controlado por meio de um computador pessoal marca Dell com as especificações adequadas de hardware e software. O software utilizado para se fazer a aquisição dos espectros é o FL WinLab, também da Perkin-Elmer, que necessita operar em ambiente Windows. As cubetas utilizadas para comportar a solução durante as análises são de quartzo, com caminho ótico de 1 cm, adquiridos também na Perkin-Elmer.



**Figura 11 - Representação esquemática do sistema ótico do espectrofotômetro utilizado.**

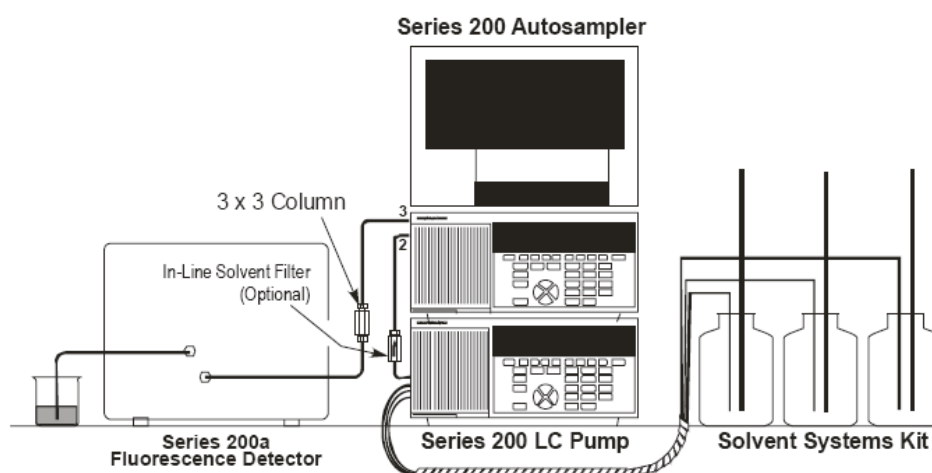
### 3.2.3. Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)

O sistema cromatográfico usado nesse trabalho foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Perkin-Elmer. O sistema é constituído por uma bomba, que tem a função de alimentar de forma constante todo o sistema com os eluentes, um sistema de introdução de amostra, uma coluna para a separação cromatográfica e um detector para registrar o sinal do analito.

A bomba cromatográfica utilizada é uma bomba binária modelo SERIES200 da Perkin-Elmer. Esta bomba tem como características principais manter um fluxo no intervalo entre 0,01 e 10,0 mL min<sup>-1</sup> com precisão relativa de pressão e repetitividade no tempo de retenção abaixo de 0,3%. O sistema de injeção foi o automático próprio do modelo SERIES200. O sistema foi utilizado com a bandeja padrão para 99 frascos de vidro (volume interno de 1,5 mL cada), “alça de amostragem” de 250 µL. Segundo o manual, este equipamento possui desvio padrão relativo menor que 0,5% medido para injeções de 3 µL, e precisa de um volume mínimo de 7µl para conseguir fazer uma injeção de 1 µl. O detector de fluorescência utilizado foi um detector do modelo SERIES200 que possui uma

lâmpada de xenônio de emissão contínua como fonte de radiação e um detector do tipo tubo fotomultiplicador.

O sistema foi completado com a colocação de uma coluna cromatográfica (SGE, Austrália) C-18, de 250 mm de comprimento, 4,6 mm diâmetro interno, 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio para partícula interna e 80 Angstroms de tamanho do poro. O sistema foi interfaciado a um computador pessoal (o qual podia controlar a ação deles pelo software TOTALChrom, da Perkin-Elmer). A Figura 12 apresenta uma representação esquemática do sistema cromatográfico utilizado (exceto pela dimensão da coluna).



**Figura 12 – Representação esquemática do sistema cromatográfico utilizado**

### 3.2.4. Analisadores voltamétricos

Nas determinações das estrobilurinas, as medições voltamétricas foram realizadas num sistema formado por um potenciostato da BAS Epsilon EC e uma torre BAS CGME (controlled growth mercury electrode), ambos da Bio Analytical System Inc (Indiana, EUA) e ambos interfaciado a um computador pessoal. Todo este sistema é controlado pelo software da Epsilon.

A cela voltamétrica era composta por três eletrodos. O eletrodo de trabalho era o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), um eletrodo de Ag/AgCl ( $3\text{mol L}^{-1}$ ) como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar.

As celas de trabalho foram copos de borosilicato, com volume interno de 15 mL, mas que eram usadas para comportar 10 mL de solução.

As determinações de Cu (II), Pb (II) e Cd (II) foram realizados em outro sistema voltamétrico, composto por um potenciostato BAS modelo CV-50W acoplado a uma torre polarográfica da BAS, modelo CGME, também ambos da Bioanalytical System Inc e ambos interfaciados a um computador pessoal, controlados pelo software BAS CV50W versão 2.0.

A cela voltamétrica foi formada por um eletrodo de Ag/AgCl ( $3 \text{ mol L}^{-1}$ ) como eletrodo de referência, fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo como suporte para se fazer o BiFE.

### **3.2.5. Outros equipamentos**

(i) O cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa utilizado neste trabalho para auxiliar na proposta do mecanismo de quebra fotoquímica do ciclofenil foi um equipamento da Hewlett Packard, modelo 5890 series II Plus , com detector de massa 5972 MSD (no modo de monitoramento de íon) e uma coluna capilar de 30 cm de comprimento e 0,25 cm de diâmetro interno, HP5MS, a temperatura do injetor durante as injeções era de  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foi usado como gás de arraste He, a um vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

(ii) Espectrômetro de massa de ionização/dessorção a laser com tempo de vôo (LDI-TOF-MS).

O equipamento utilizado para se fazer as medições de espectrometria de massa com tempo de vôo após dessorção por ionização a laser (LDI-TOF-MS) usava uma fonte de irradiação de laser de 337 nm modelo VSL-337-ND-S, o equipamento foi adquirido da Laser Science Inc, (EUA)

(iii) Espectrofotômetro de absorção atômica por forno de grafite

Os espectros de absorção atômica foram registrados em um equipamento da Analytic Jena (Jena, Germany) modelo Zeenit 60 com corretor de fundo por efeito Zeeman. Lâmpadas de catodo oco para Cu (Analytic Jena) foram usadas como fonte. Os parâmetros instrumentais foram ajustados de acordo com o manual do

equipamento para Cu. Todas as medidas foram feitas usando integração da absorvância e os resultados provenientes da média de 3 leituras.

### **3.2.6. Equipamentos auxiliares**

A centrífuga utilizada neste trabalho foi um modelo BE 4000 - Brushless da Bio Eng, (Rio de Janeiro Brasil). O banho ultra-sônico utilizado para auxiliar na homogeneização das amostras foi um modelo USB 124 da CTA do Brasil. Com potência de 50 W e 40 MHz de frequência. Os solventes utilizados na cromatografia foram degaseificados em um banho ultra-sônico modelo USC 1800 (Unique, São Paulo, Brasil). A balança utilizada foi uma balança de precisão analítica de cinco casas decimais da marca Shimadzu modelo AUW220D (Shimadzu, Tóquio, Japão) calibrada pelo laboratório Peso Exato Automação (Rio de Janeiro, Brasil). As medições de pH foram realizadas no medidor pH-metro Tecnonon MPA 210 (São Paulo, Brasil), acoplado a um eletrodo combinado de vidro.

### **3.3. Lavagem do material**

O material utilizado em todos os procedimentos foi previamente enxaguado com água corrente, sendo então imerso em solução de ácido nítrico 10% por um período mínimo de 24 horas. Em seguida o material era enxaguado com água destilada, seguido de enxágüe em abundância com água deionizada. O material descontaminado foi mantido em recipientes hermeticamente fechados.

### **3.4. Metodologia de trabalho para a determinação espectrofluorimétrica do ciclofenil**

#### **3.4.1. Padrões de ciclofenil**

A solução-estoque de ciclofenil ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi preparada em metanol, sendo que todas as demais soluções utilizadas foram preparadas em

misturas de metanol/tampão Britton-Robinson. A composição final otimizada foi metanol/tampão Britton-Robinson pH 10,5 , 9/1 v/v.

As soluções tampões Britton-Robinson foram preparadas através da mistura de soluções 0,04 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético, ácido fosfórico e ácido bórico, seguido da adição de pequenos volumes de solução de NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup> até que o valor de pH desejado fosse atingido.

Os diferentes pontos das curvas analíticas foram preparados por diluições da solução-estoque de ciclofenil em balões volumétricos de 10 mL, levando em consideração os volumes finais de metanol e de tampão.

### **3.4.2. Tratamento fotoquímico**

A irradiação das soluções de analito e da amostra foi feita colocando-se 10 mL dos mesmos em tubos de quartzo (1,9 cm de diâmetro e 13,7 cm de altura) no centro do reator fotoquímico, os quais receberam irradiação ultravioleta proveniente das lâmpadas durante o tempo desejado.

### **3.4.3. Formulações farmacêuticas**

As soluções de amostras de formulações comerciais foram obtidas pela maceração de pelo menos 5 comprimidos com pistilo em gral de porcelana. Uma massa conhecida foi dissolvida em metanol e posteriormente filtrada em papel qualitativo da Whatmam, (São José dos Pinhais – PR - Brasil). O filtrado foi então diluído para 50 mL em balão volumétrico com metanol.

### **3.4.4. Procedimento para mediação do sinal fluorescente.**

Para a medida do sinal de fluorescência das soluções, estas foram colocadas em uma cubeta de quartzo limpa. As medições da intensidade fluorescente de cada solução foram tomadas após 10 segundos de exposição à luz radiante, com o objetivo de compensar qualquer flutuação do sinal. As medições de sinal foram feitas pela altura das bandas nos máximos de emissão e de excitação, que no método otimizado foram 250/410 nm.



### **3.4.5.**

#### **Procedimento para medição no cromatógrafo a líquido**

As medidas no cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detecção fluorescente (HPLC/F) foram feitas utilizando um sistema de eluição metanol / água. Foi aplicado um sistema de gradiente, que se iniciava com metanol/água 60/40% v/v, levando 5 min. para atingir 100% de metanol, permanecendo assim por mais 10 minutos, sempre com a vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. As medições de fluorescência foram feitas com detector ajustado em 290/410 nm.

### **3.4.6.**

#### **Urina**

As amostras de urina, obtidas de voluntários do próprio laboratório, foram enriquecidas com ciclofenil, e a elas foi adicionado o mesmo volume de padrão interno (acetato de m-tolúila, 100 µg mL<sup>-1</sup>). A mesma quantidade de padrão interno foi adicionada às soluções padrões. As amostras (10 mL) foram percoladas através de um cartucho C-18, e o analito e o padrão interno foram eluídas com 10 mL de metanol. Antes de serem irradiadas no reator fotoquímico as soluções foram filtradas nos filtros de 45 µm.

### **3.5.**

#### **Metodologia de trabalho para a determinação voltamétrica das estrobilurinas**

#### **3.5.1.**

##### **Preparação de padrões.**

Soluções-estoque de azoxistrobina e dimoxistrobina ( $1,00 \times 10^{-3}$ ) foram preparadas em acetonitrila.

#### **3.5.2.**

##### **Amostras de alimentos**

Cerca de dois gramas das amostras de alimentos (uva e batata) foram lavados, triturados e a eles adicionado 100 µL de solução estoque das estrobilurinas ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). O processo de extração consistia de 3 extrações

de 3 mL de água, o extrato era então recombinado, avolumado com água deionizada para 10 mL. Um cartucho de extração C-18 era condicionado com 1 mL de água prévia, 10 mL da amostra era percolada pelo cartucho e a extração sedava com a eluição de 1,5 mL de acetonitrila.

As amostras de água do rio e de suco de uva industrial não foram submetidas a nenhum tipo de pré-tratamento, apenas fortificadas com as estrobilurinas.

### **3.5.3. Procedimento para a medição eletroquímica**

Para a medição eletroquímica, foi feito uso de micropipetas para adicionar o volume da amostra (100  $\mu\text{L}$ ) na cela voltamétrica (contendo 10 mL de HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , eletrólito suporte). Antes da adição a cela foi purgada com nitrogênio durante um tempo de 300 s. Entre medições replicadas a purga era de apenas 30 s, e após a adição de cada volume de padrão (10  $\mu\text{l}$ ) aplicava-se nova purga de 120 s.

### **3.6. Metodologia de trabalho para a determinação voltamétrica de Cu (II), Pb (II) e Cd (II) em amostras de cachaça.**

#### **3.6.1. Preparação de padrões.**

As soluções de padrões estoque (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de Cd (II) Cu (II) Pb (II) e Bi (III) foram compradas. As soluções utilizadas foram preparadas por diluições destas soluções em solução aquosa com concentração final de 10 % de ácido nítrico.

#### **3.6.2. Pré-tratamento das amostras**

As amostras de cachaça foram condicionadas em tubos de quartzo, cada uma foi acidificado com HCl (concentração final de  $6,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ), e em seguida irradiada por 1 h em um reator fotoquímico.

### 3.6.3. Procedimento para a medição eletroquímica

Um mL da amostra foi transferida para uma cela de 15 mL, contendo 9 mL de tampão acetato pH 4,5. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de solução de Bi  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi adicionado para produção *in situ* do BiFE na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. A interferência do Bi (III) sobre o sinal do Cu (II) foi eliminado pela adição de 5  $\mu\text{L}$  de peróxido 30 % v/v. As condições instrumentais foram: Potencial inicial: -1.400 mV, amplitude: 100 mV, frequência 100 Hz, tempo de deposição 60 s e incremento de potencial de 2 mV. Não foi necessário utilizar purga. O voltamograma foi obtido fazendo varredura de potencial até + 300 mV.