

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

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0621159/CA

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



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

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.

172 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

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!

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⁻¹, pH=8,5; SDS 30 mmol L⁻¹; 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⁻¹ 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 R² 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 10⁻⁷ mol L⁻¹. 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⁻¹ 50:50% v/v) irradiada com UV por 30 min e substrato contendo 80 µg de TINO₃. 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 R² 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 eletrocínica 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. Master Dissertation - 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⁻¹ pH=8.5; 30 SDS mmol L⁻¹; 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⁻¹ 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 R² 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 10⁻⁷ mol L⁻¹ 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⁻¹ 50:50% v/v) irradiated with UV for 30 min and cellulose substrates containing 80 µg of TiNO₃. 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 R² 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_{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.	Enrofloxacin	29
1.5.	Modo de ação	31
1.6.	Métodos analíticos para determinação de enrofloxacin	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.	Cromatógrafo 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 (1×10^{-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 μm 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 (1×10^{-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 μm 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 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.	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⁻¹ de SDS, tampão borato 20 mmol L⁻¹, 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⁻¹ 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⁻¹. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 82
- Figura 19: Variações na concentração do surfactante (SDS). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L⁻¹ 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⁻¹. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 83
- Figura 20: Variações no potencial aplicado. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L⁻¹ de borato, 30 mmol L⁻¹ 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⁻¹ de borato, 30 mmol L⁻¹ 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⁻¹ de borato, 30 mmol L⁻¹ 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 mmol L^{-1} de borato, 30 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 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 mmol L^{-1} de borato, 30 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 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 mmol L^{-1} de borato, 30 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), $V = 25$ 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. 106

Figura 35: Análise das estrobilurinas em solução padrão (1×10^{-5} mol L^{-1}). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L^{-1} de borato, 30 mmol L^{-1} 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, $T = 25^{\circ}\text{C}$ 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^{-1} de borato, 30 mmol L^{-1} 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, $T = 25^{\circ}\text{C}$ 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) Piraclostrobina. 108

Figura 37: Análise das estrobilurinas em amostras de água do riacho enriquecidas com os fungicidas e solução padrão (1×10^{-5} mol L^{-1}). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L^{-1} de borato, 30 mmol L^{-1} 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, $T = 25^{\circ}\text{C}$ 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^{-1} de borato, 30 mmol L^{-1} 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, $T = 25^{\circ}\text{C}$ e detecção em 200 nm. 1) Azoxistrobina, 2) Picoxistrobina e 3) Piraclostrobina. 110

Figura 39: Diagrama esquemático de um arranjo de spin nos orbitais

moléculares para o estado fundamental, e para os estados excitados singlete e tripleto.	118
Figura 40: Diagrama modificado de Jablonskii (adaptação da fonte Voldin, 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 enrofloxacin (5 x 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 enrofloxacin (5 x 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 enrofloxacin (5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) em acetona/água após exposição ao UV.	132
Figura 44: Espectros de fosforescência de 889 ng de enrofloxacin (5 x 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 enrofloxacin (89.8 ng).	134
Figura 46: Influência da basicidade da solução do analito no sinal fosforescente da enrofloxacin (89.8 ng).	135
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 ₃ .	136
Figura 48: Estudo do tempo de irradiação UV no sinal fosforescente da solução da enrofloxacin em meio básico.	138
Figura 49: Cromatograma obtidos para solução de enrofloxacin com eluição isocrática (a) e com eluição com gradiente (b) de fase móvel.	139
Figura 50: Análise das soluções de enrofloxacin 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 enrofloxacin.	141
Figura 52: Gráfico de resíduos da curva analítica para enrofloxacin.	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_{dentro} – Mínimos quadrados dentro do grupo
MQ_{entre} – Mínimos quadrados entre grupos
MRLs – Limite máximo de resíduos
NSM – Modo de empilhamento normal
P – Fosforescência

PCR - Regressão de componente principal
P_{mw} – 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_r – Desvio padrão da repetitividade
s_R – Desvio padrão da reprodutibilidade
SSRTP – Fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido
U – Incerteza expandida
u_c – Incerteza combinada
UV – Vis – Ultravioleta - Visível
UV-VIS – Ultravioleta – visível
 λ_{em} – Comprimento de onda de máximo de emissão expresso em nm
 λ_{ex} – Comprimento de onda máximo de excitação expresso em nm

“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).