

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 fundo³⁹.

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 μm 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 urina⁴⁰, 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 μm 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 μL 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 μL e de 20 a 200 μL 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 μL 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 métodos³⁴. 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 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 mL min^{-1} , o 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 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.

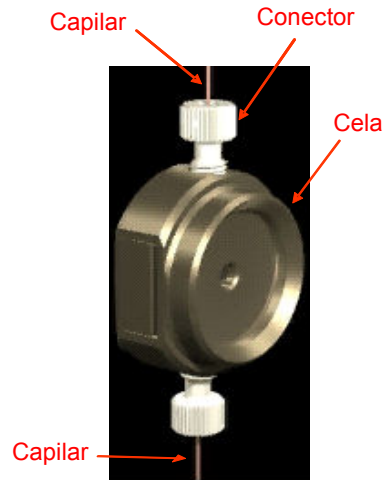


Figura 4: Cella com caminho óptico alongado com os aparatos adaptados.

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 μ 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.

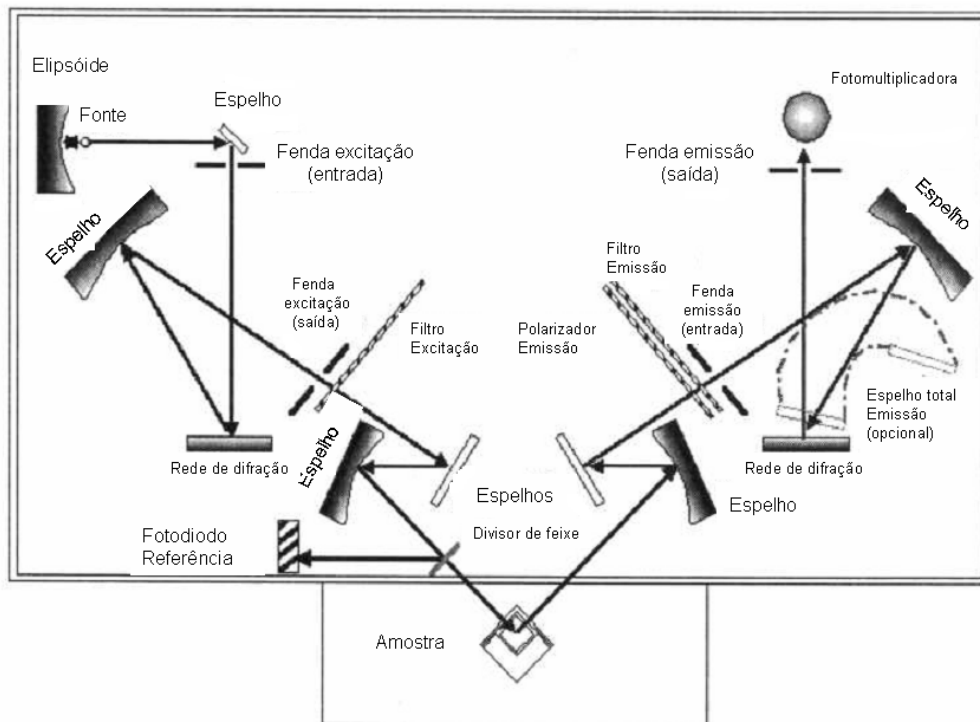


Figura 5: Esquema óptico do espectrofotômetro de luminescência.

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).

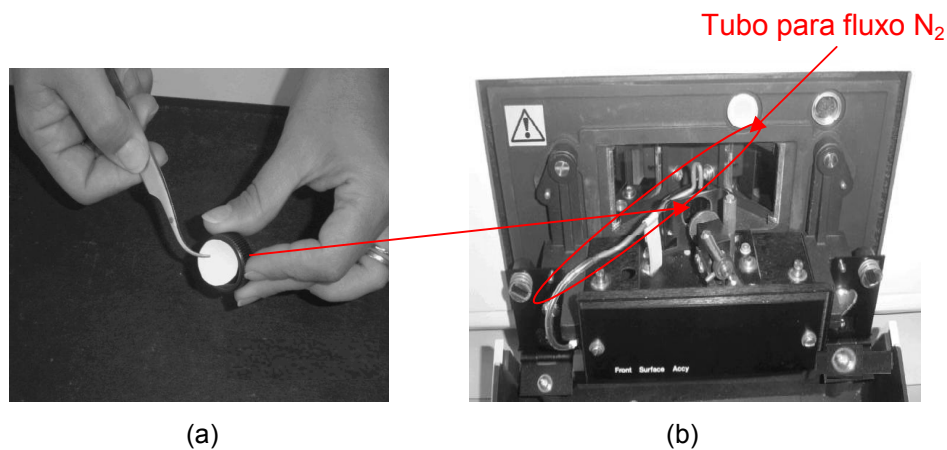


Figura 6: (a) Colocação do substrato de papel no suporte que é acoplado ao (b) aparato de medição em superfície sólida.

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 μL . 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 medições⁴⁰.

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 nm⁴⁵.

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 eletrocinética capilar micelar

O modo de separação eletroforética utilizado nesse trabalho foi o da cromatografia eletrocinética 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 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 mmol L^{-1}), solução aquosa de SDS (concentração final no eletrólito 30 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°C . A

corrente medida nessas condições foi tipicamente em torno de 45 μ 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 al⁴¹. 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 trabalho⁴².

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⁻¹ 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 eletrocínica 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 eluidos 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 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)⁴³. 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.

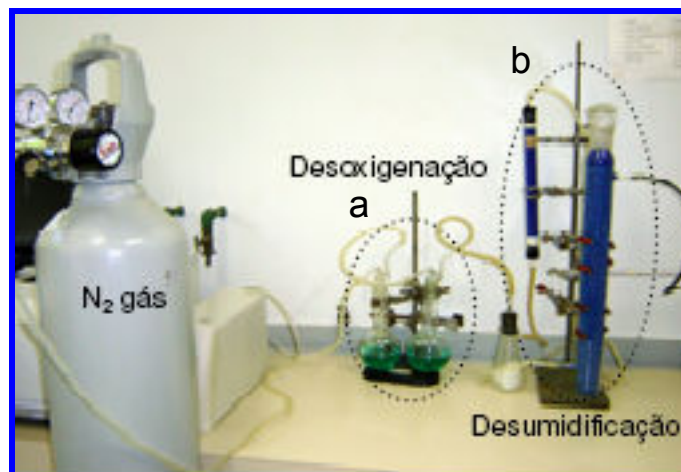


Figura 7: (a) Sistema para desoxigenação e (b) secagem do nitrogênio

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 UV⁴⁴. Esse procedimento reduziu em até 97% o sinal de fundo original do papel. Detalhes desse procedimento podem ser encontrados na literatura⁴⁵.

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 μL 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 μL) 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.

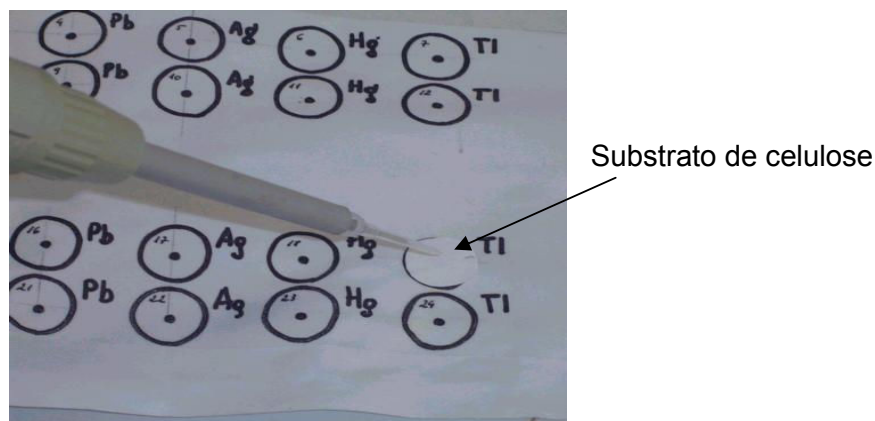


Figura 8: Deposição das soluções no substrato de celulose com auxílio de uma planilha marcada.

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 μL 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 μL 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 μL 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 literatura³⁴. 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 mL min^{-1} . A fase móvel foi uma mistura de acetonitrila: tampão fosfato (25 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.