

### 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 conseqüência, 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 isoeletrica 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 do 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  $\mu_i$ :

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

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 ( $F_{\text{elétrica}}$ ) é dada pelo produto que envolve a carga do íon  $z_i$ , a carga elementar “e”, e o campo elétrico:

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

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

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

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>.

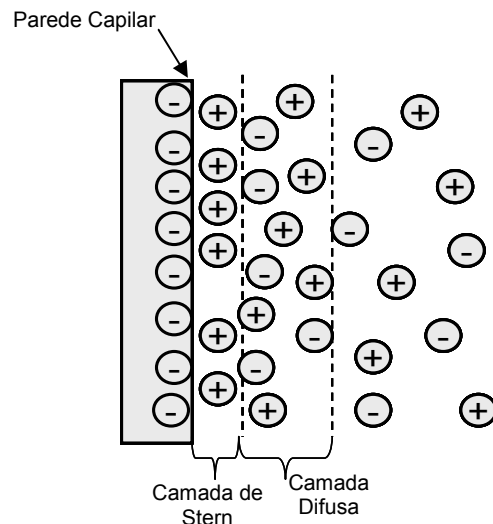


Figura 9: Esquema da dupla camada elétrica no capilar.

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:

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

onde  $v_{\text{EOF}}$  é a velocidade do EOF,  $\mu_{\text{EOF}}$  é a mobilidade do EOF,  $\zeta$  é o potencial zeta e  $\varepsilon$  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>.

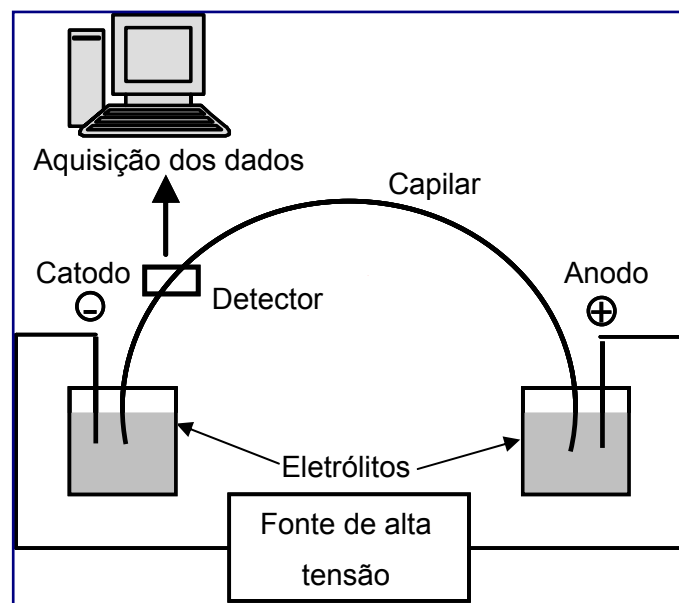


Figura 10: Esquema de um instrumento para eletroforese capilar (adaptado da ref 4).

### 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 eletrocinética (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>.

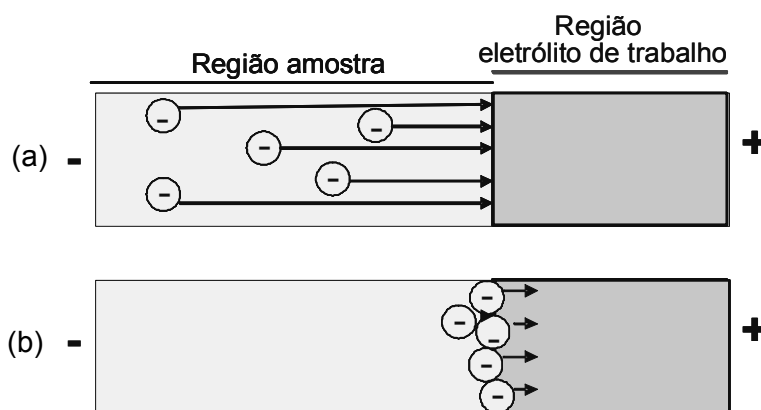


Figura 11: Esquema geral do modo de empilhamento de uma amostra aniônica.

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>.

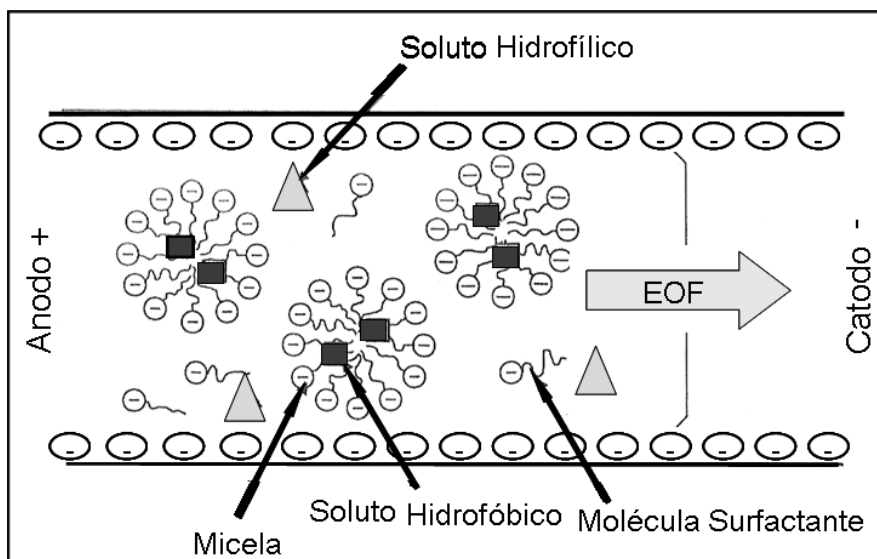


Figura 12: Esquema representativo da separação por MECC usando micelas aniônicas (adaptado da ref. 48).

### 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 eletrosmótica. O outro extremo  $t_{mc}$  é definido pela eluição de analitos que interagem fortemente com as micelas e ( $P_{mw} \sim \infty$ ), esses compostos são muito hidrofóbicos e seus tempos de migração coincidem com o tempo de migração das micelas ( $t_{mc}$ ). A existência da janela de eluição limita a capacidade de pico em 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).

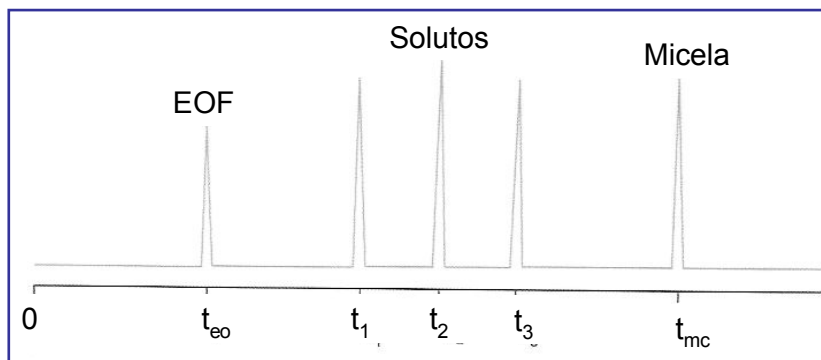


Figura 13: Esquema da janela de eluição em MECC (adaptado da ref 47).

### 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  $k'^{46}$ .

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 fluida, 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 apolares 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>.

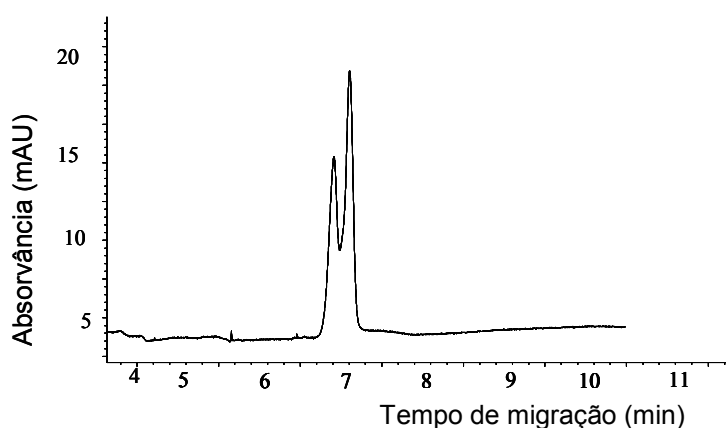


Figura 14: Análise de uma mistura padrão das estrobilurinas ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) pelo método MECC. Eletrólito de trabalho:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,5, capilar de sílica fundida de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m}$  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.

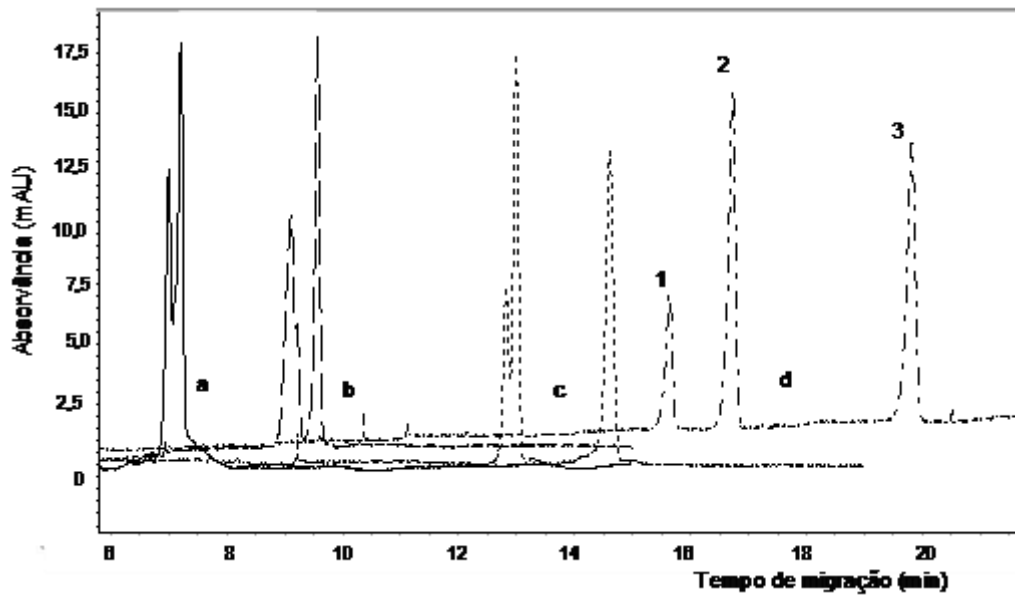


Figura 15: Separação das estrobilurinas em uma mistura padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, tampão borato  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,5, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  d.i., Injeção por pressão ( $50 \text{ mbar}$ ) 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.

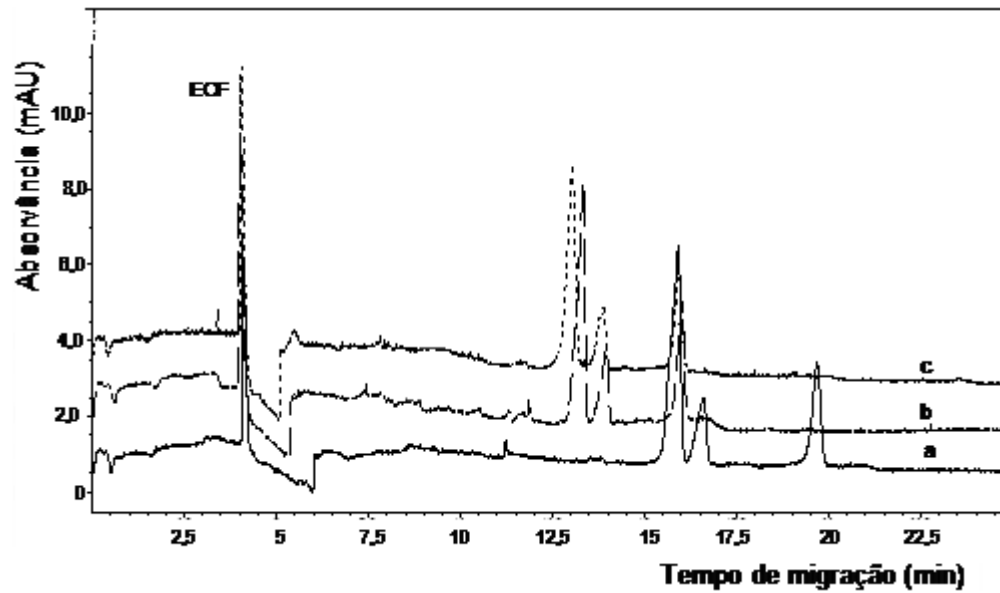


Figura 16: Estudo da influência do pH na resolução e tempo de análise. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup>, capilar de 50 cm x 75 µm d.i. Injeção por pressão por 10 segundos, V= 25kV, T= 25°C e detecção em 200 nm. Variação do pH em (a) 8,06, (b)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

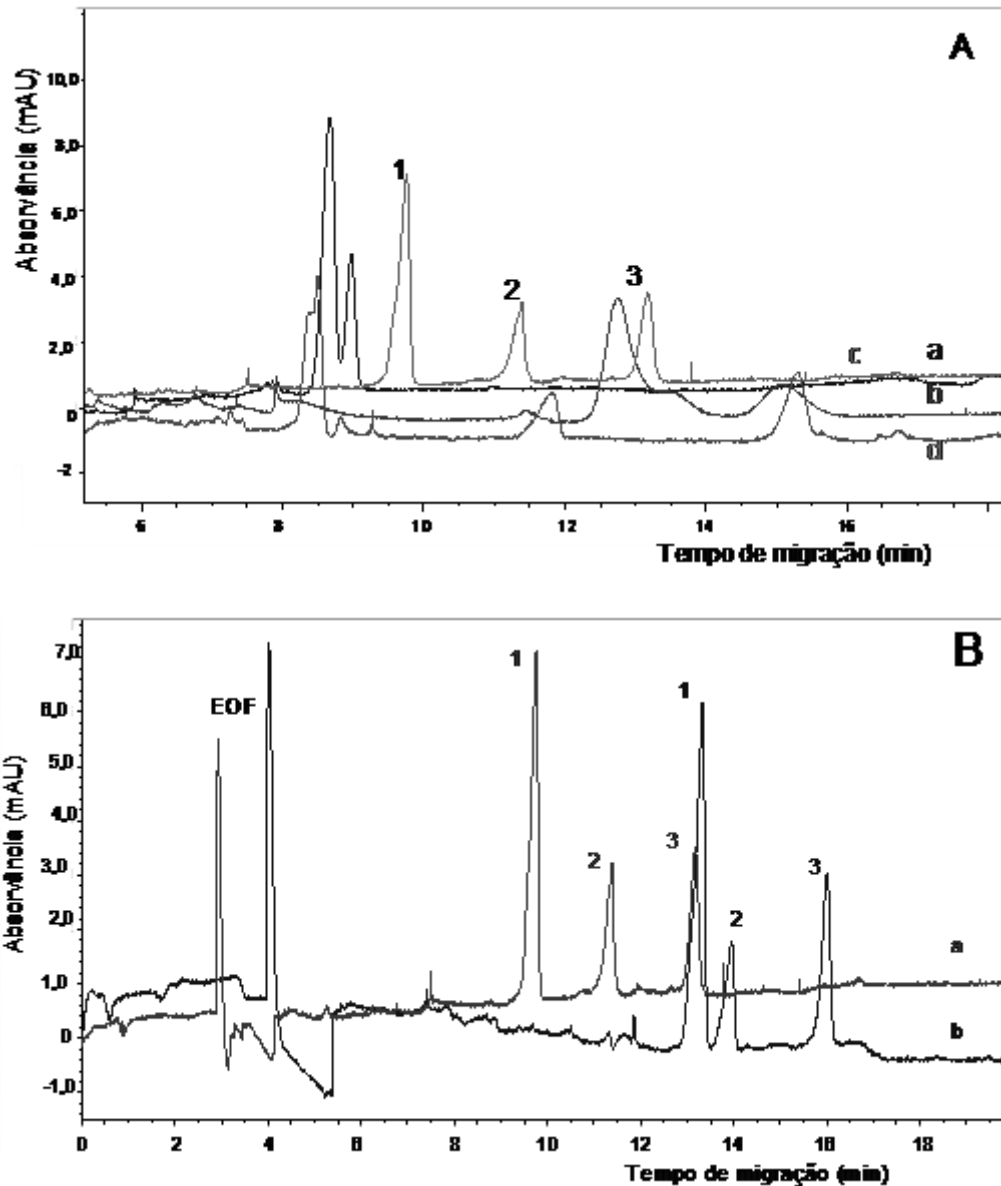


Figura 17: Comparação entre MeOH e ACN como modificador. Figura A: (a) 5, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 % de ACN. Figura B: (a) 15% de ACN e (b) 20% de MeOH. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, tampão borato 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,5, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., V= 25 kV, T = 25°C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

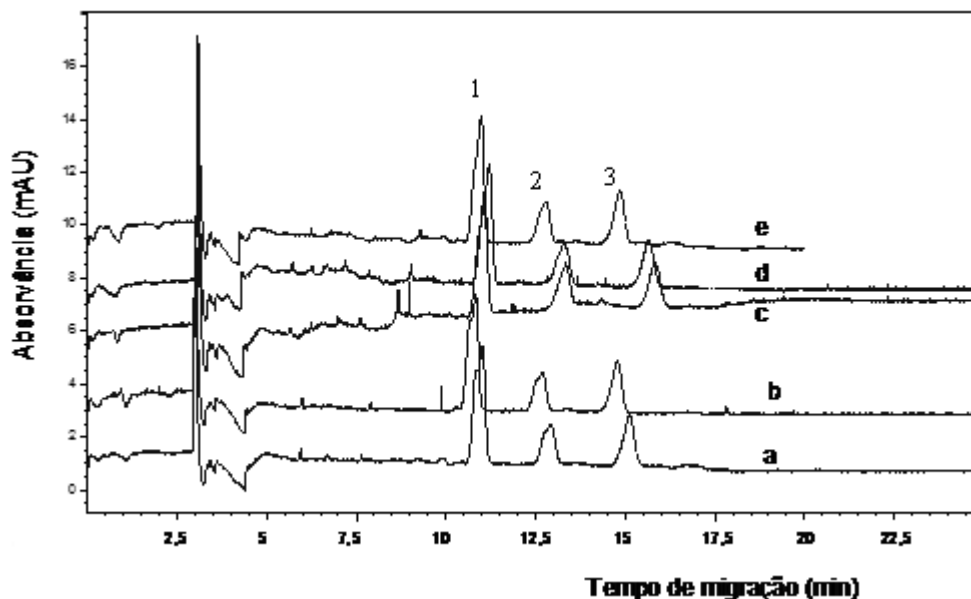


Figura 18: Variações na concentração do tampão. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Concentração de borato: (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 e (e) 50 mmol L<sup>-1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

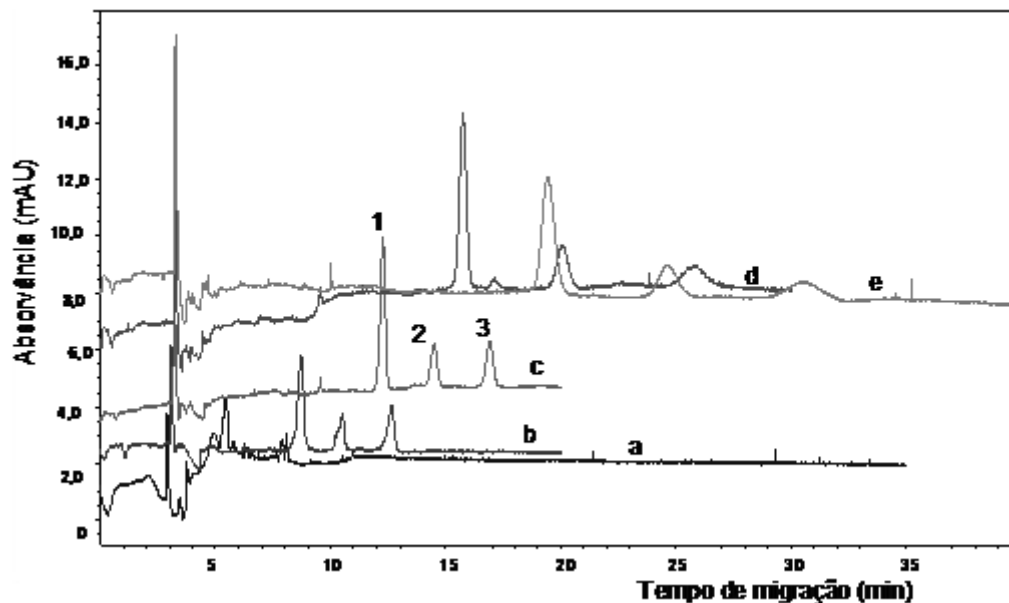


Figura 19: Variações na concentração do surfactante (SDS). Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Concentrações de SDS (a) 10, (b) 20, (c) 30 (d) 40 e (e) 50 mmol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

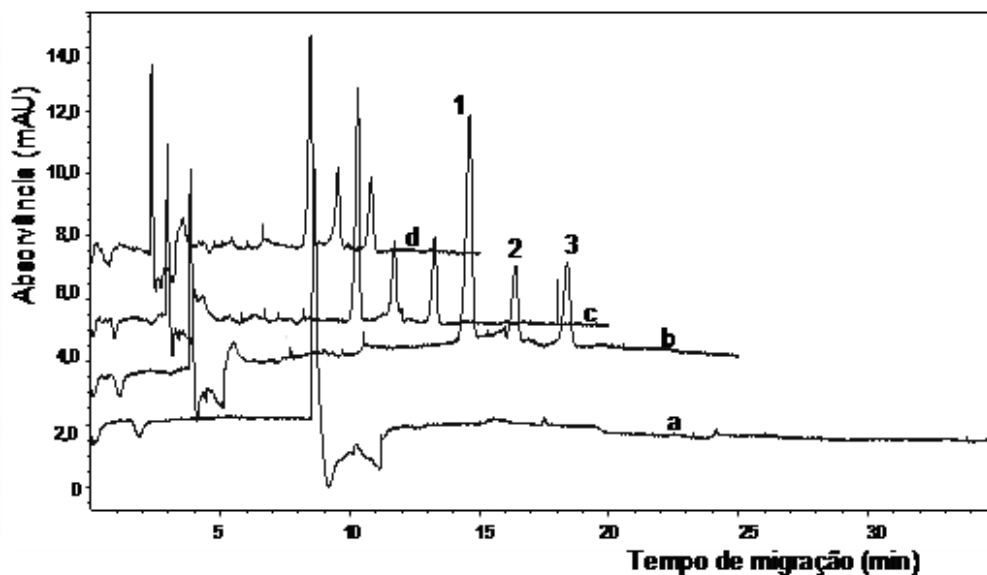


Figura 20: Variações no potencial aplicado. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 μm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Potenciais aplicados: (a) 10, (b) 20, (c) 25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

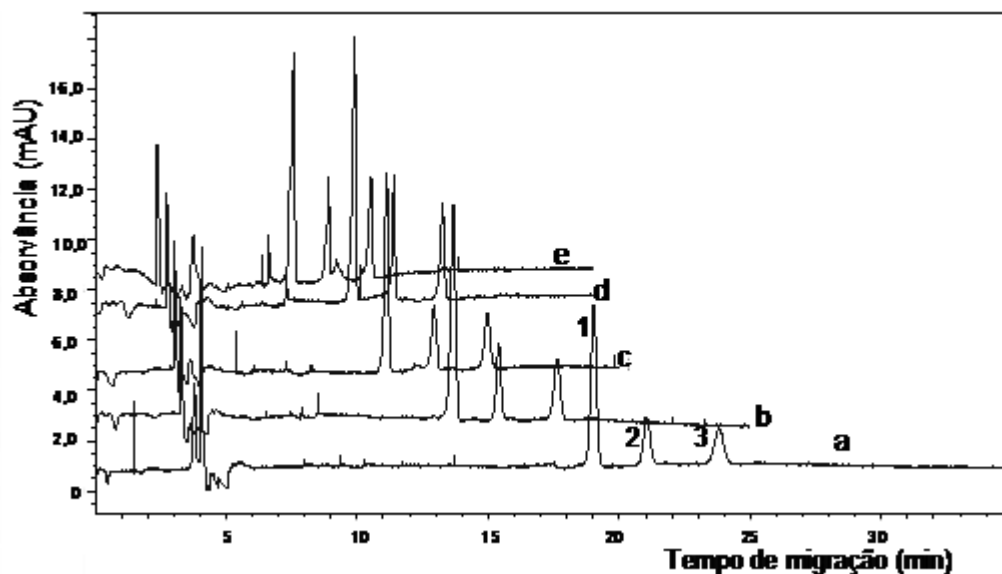


Figura 21: Variações na temperatura de análise. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Temperaturas estudadas: (a) 10, (b) 20, (c)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

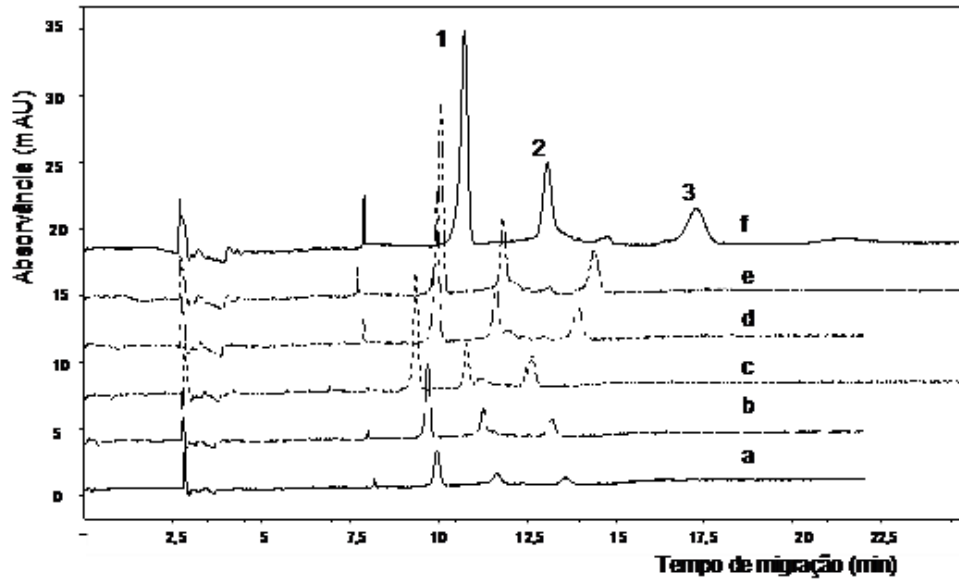


Figura 22: Variações no tempo de injeção. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., injeção por 10 segundos, V = 25 kV, T = 25°C e detecção em 200 nm. Os tempos de injeção variaram em: (a) 5, (b) 7,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

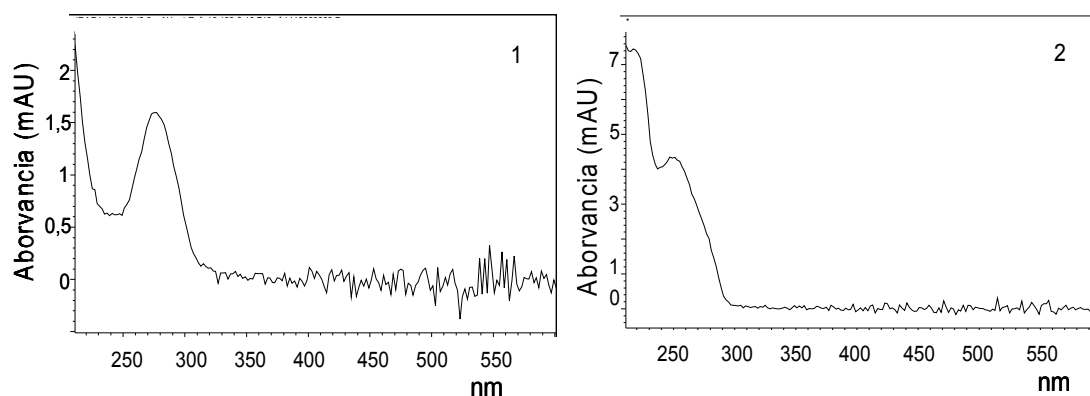


Figura 23: Espectro de absorção dos compostos piraclostrobina (1) e picoxistrobina (2).

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.

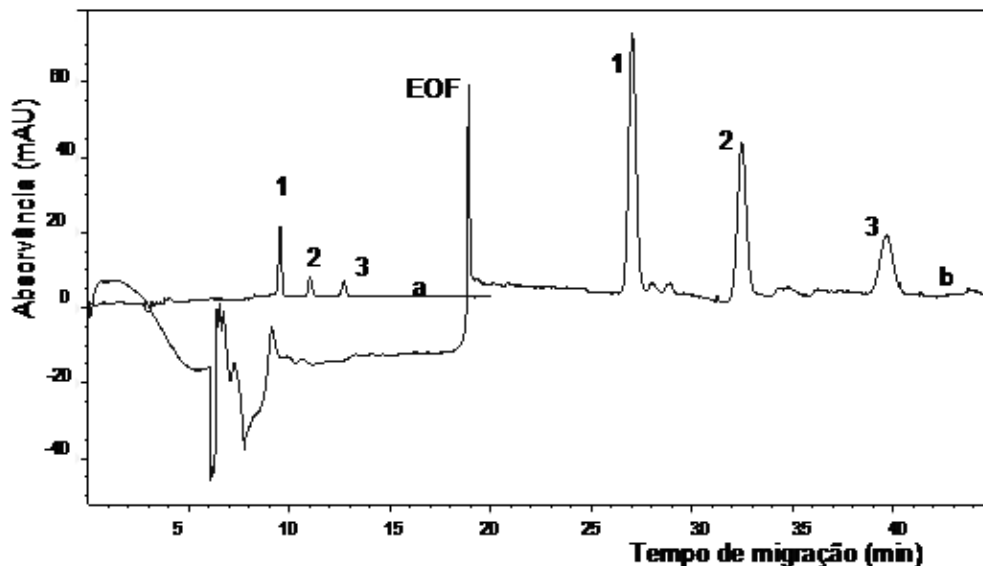


Figura 24: Diferença entre o uso da capilar normal e capilar acoplado a cela de caminho óptico alongado; (a) eletroferograma da solução padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) analisada no capilar normal e (b) eletroferograma da mesma solução padrão em capilar acoplado a cela de caminho óptico 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).

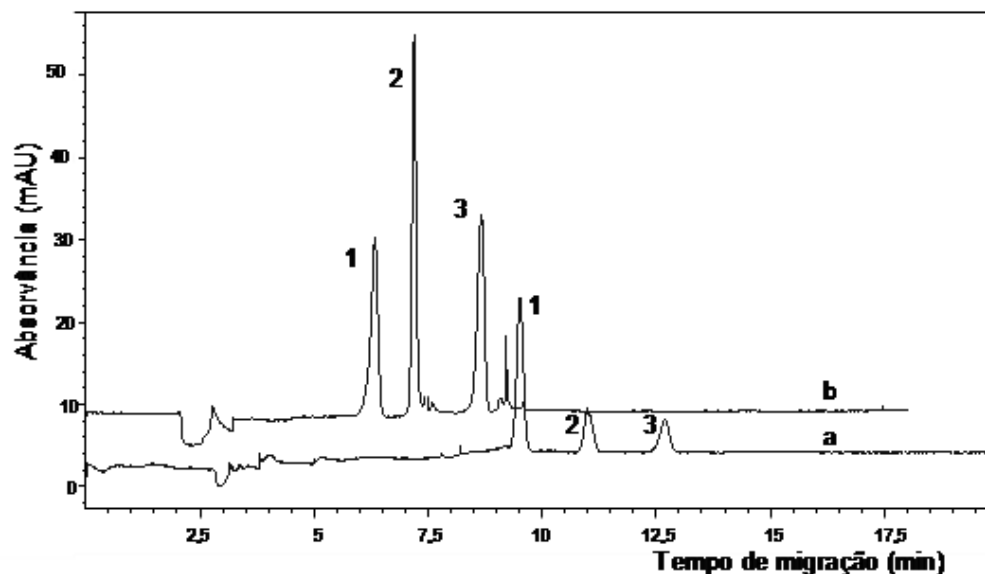


Figura 25: Aplicação da pré-concentração em linha em solução padrão dos pesticidas; (a) eletroferograma de uma solução padrão dos pesticidas (todos em  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) diluída em acetonitrila: água ultrapurificada 6:94% v/v; (b) eletroferograma no modo pré-concentração em linha 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.



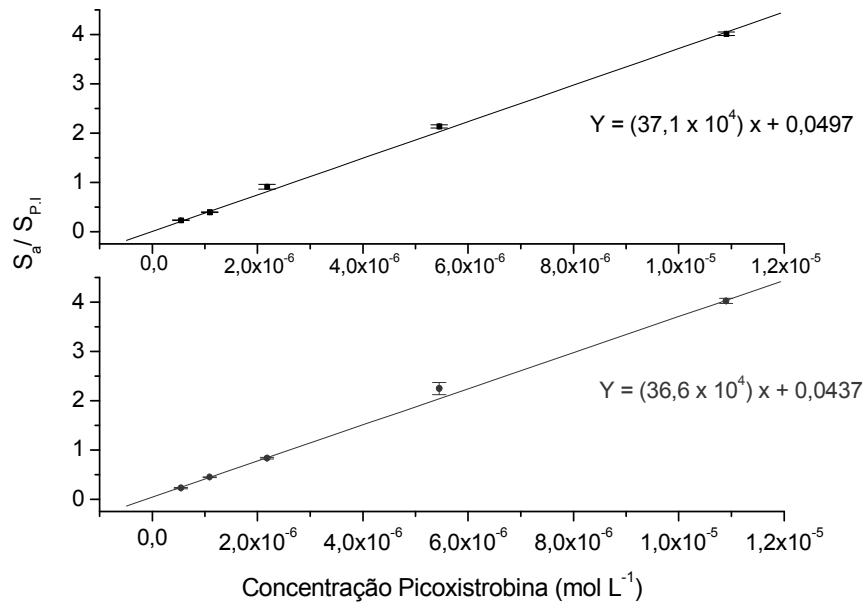


Figura 26: Curva analítica para picoxistrobina por padronização interna.  $S_a$  = área do analito e  $S_{p,i}$  = área padrão interno.

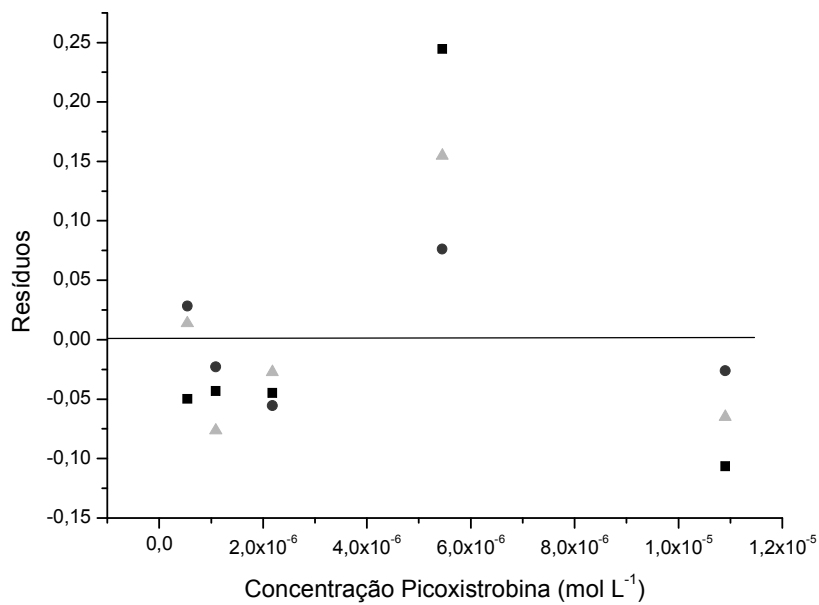


Figura 27: Gráfico de resíduo da picoxistrobina por padronização interna.

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

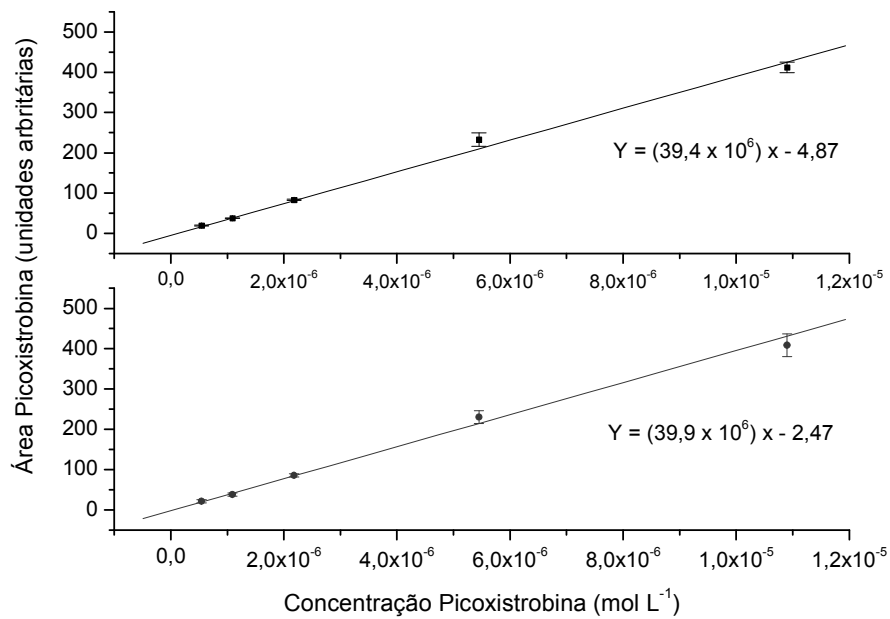


Figura 28 Curva analítica para picoxistrobina sem considerar o padrão interno.

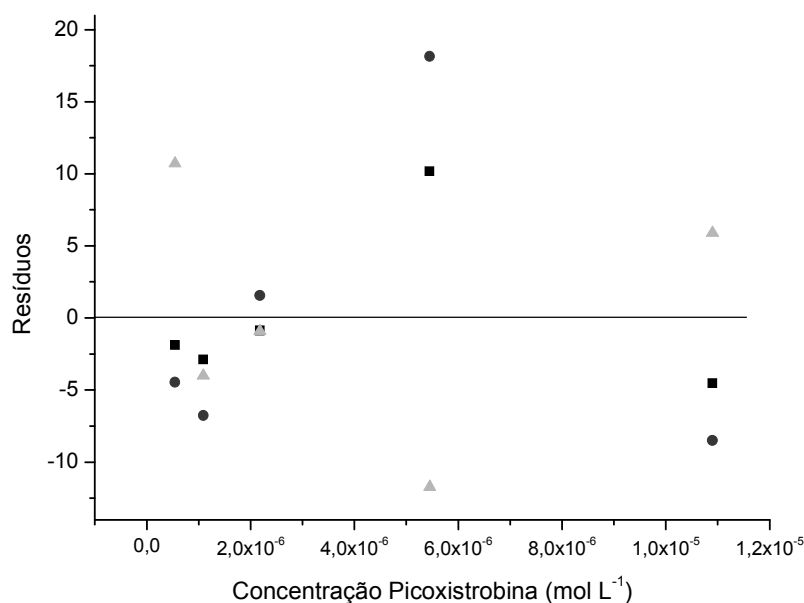


Figura 29: Gráfico de resíduos da curva analítica da picoxistrobina sem considerar padrão interno.

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.

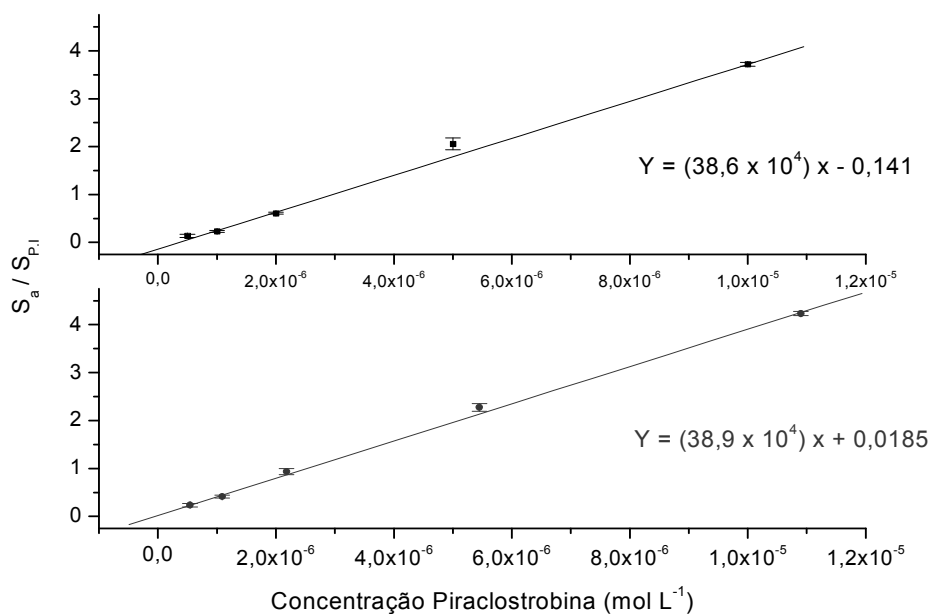


Figura 30: Curva analítica para piraclostrobina por padronização interna ( $S_a$  = área do analito,  $S_{P,I}$  = área padrão interno).

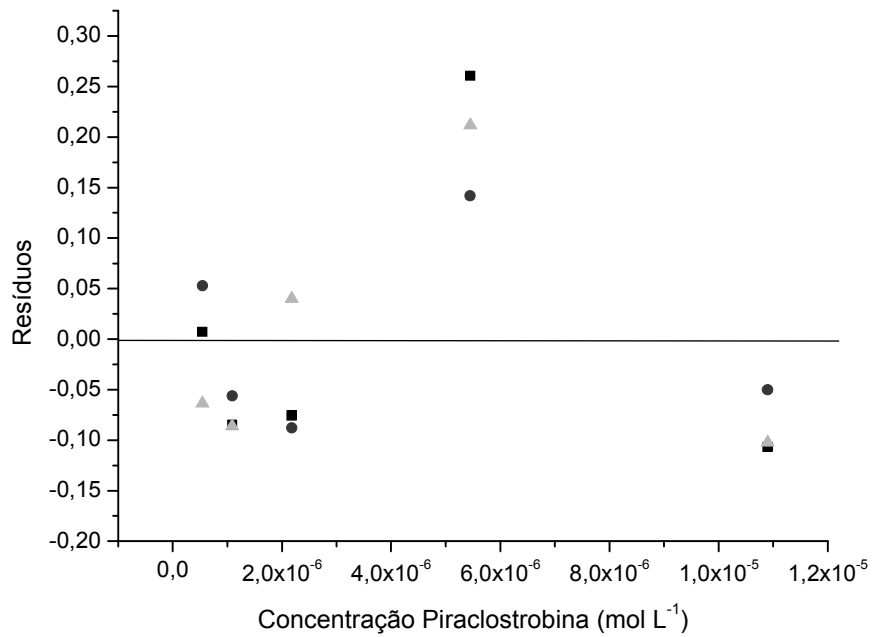


Figura 31: Gráfico de resíduos da curva analítica da piraclostrobina por padronização interna.

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

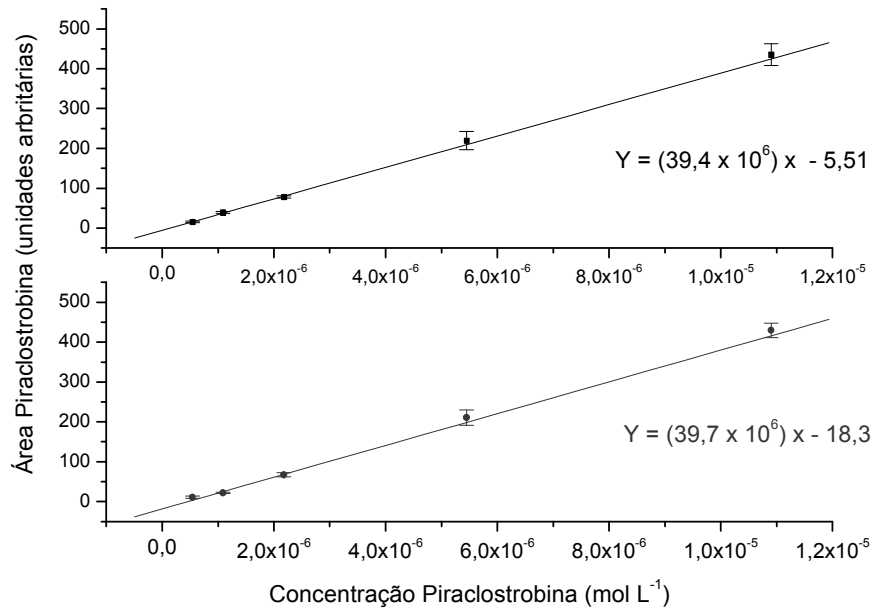


Figura 32: Curva analítica para piraclostrobina sem considerar o padrão interno.

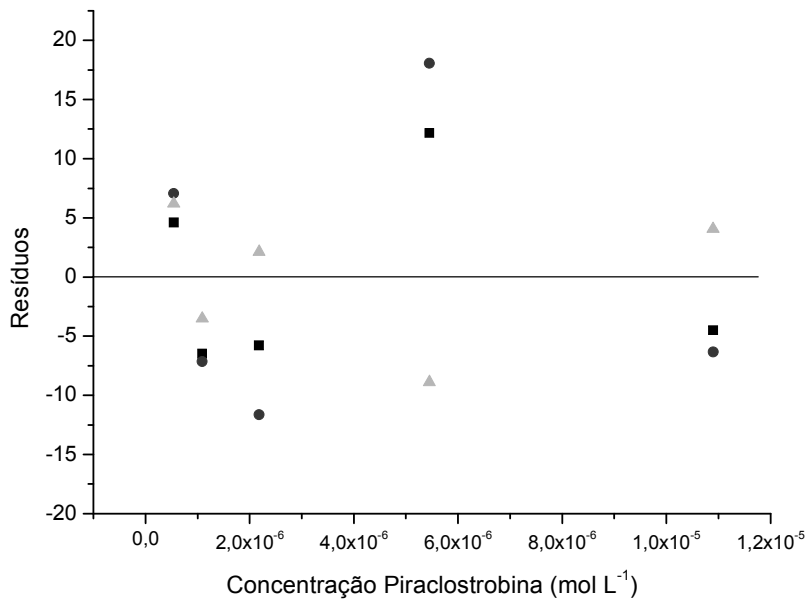


Figura 33: Gráfico de resíduos da piraclostrobina sem considerar o padrão interno.

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

Parâmetros	Curva 1	Curva 2
Coefficiente angular	$(39,4 \pm 1,2) \times 10^6$	$(39,7 \pm 3,04) \times 10^6$
Coefficiente 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).

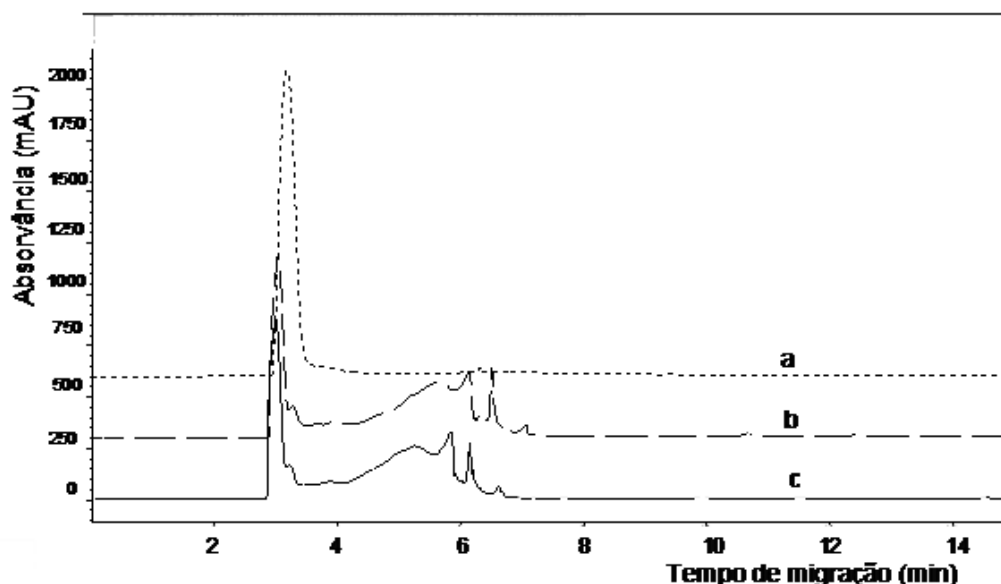


Figura 34: Análise das estrobilurinas em amostra de urina enriquecidas ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75  $\mu\text{m}$  d.i., injeção por pressão (pressão 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).

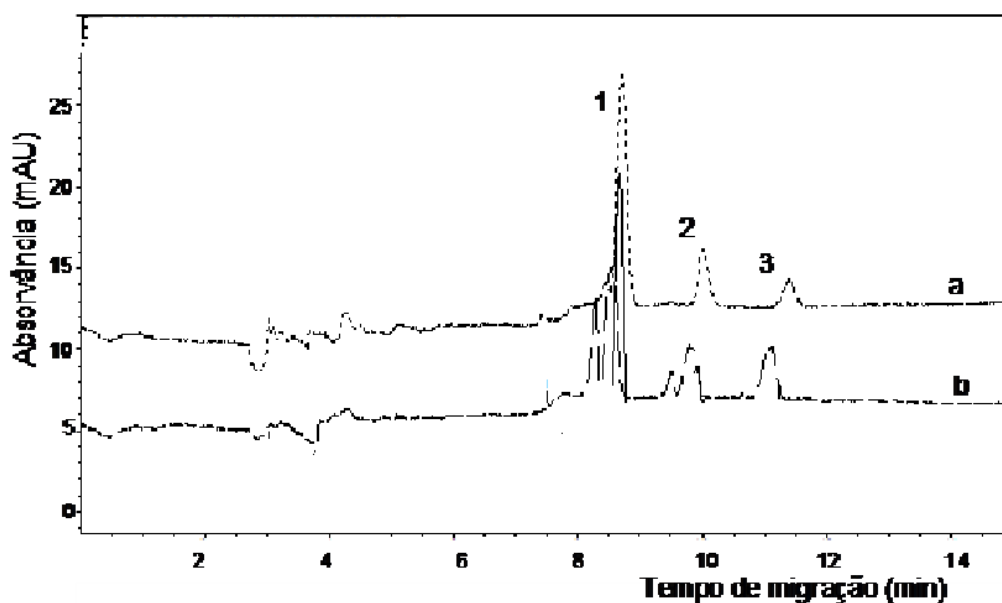


Figura 35: Análise das estrobilurinas em solução padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m d.i.}$ , injeção por pressão (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.

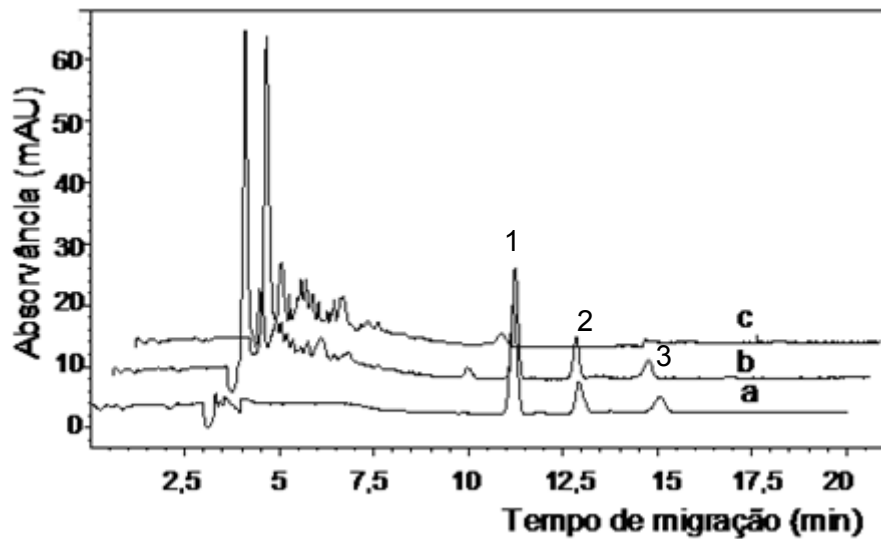


Figura 36: Comparação entre solução padrão e amostra de urina. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 µm d.i., os analitos foram injetados por pressão (pressão 50 mbar, 15 segundos), V = 25 kV, T = 25°C e 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) Piraclisotrobina.

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

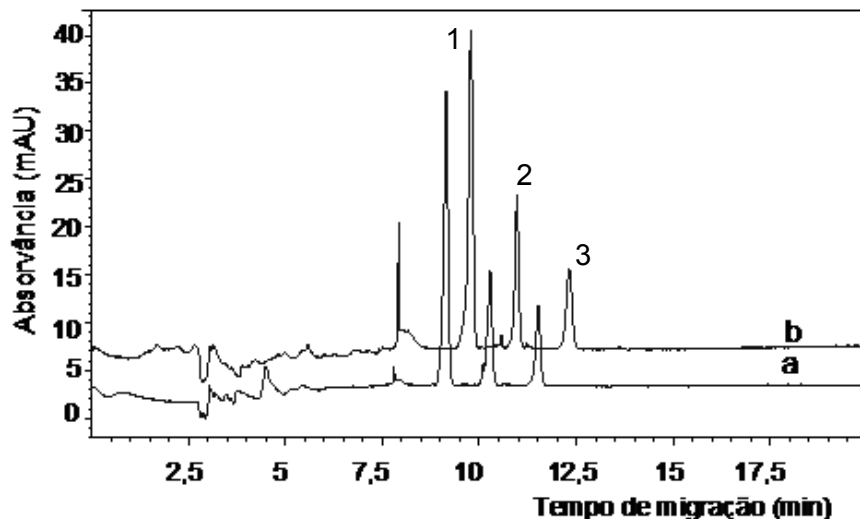


Figura 37: Análise das estrobilurinas em amostras de água do riacho enriquecidas com os fungicidas e solução padrão ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Eletrólito de trabalho:  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de borato,  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de  $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  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.

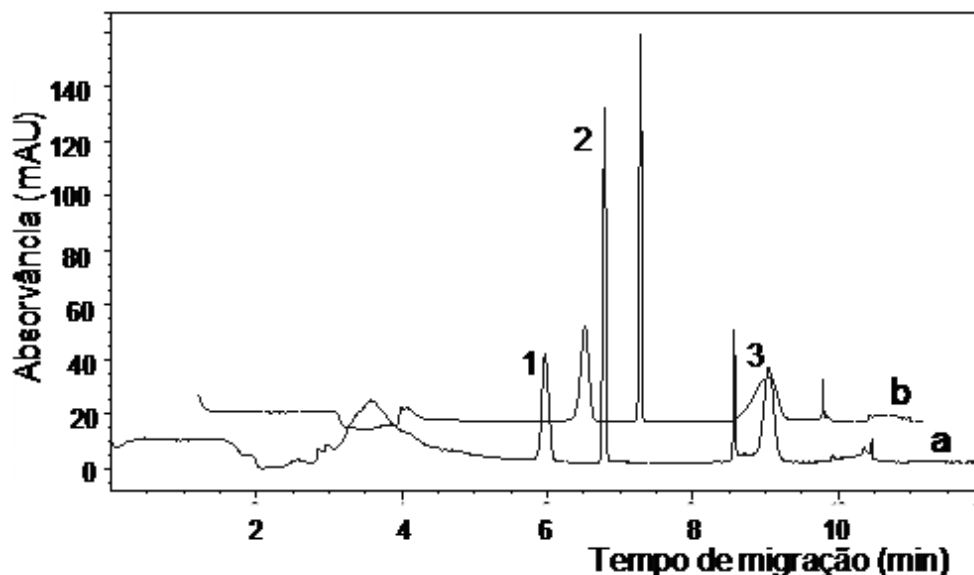


Figura 38: Aplicação da pré-concentração em linha em amostra de urina (a) e água do riacho (b) enriquecidas com os fungicidas. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L<sup>-1</sup> de borato, 30 mmol L<sup>-1</sup> de SDS, pH 8,50, 15% v/v de ACN, capilar de 50 cm x 75 μm d.i., os analitos foram injetados por 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.
<b>Picoxistrobina</b>						
1	3	5	2	8	3	14
2	2	3	1	3	0,4	4
3	3	5	1	2	1	0,01
<b>Piraclostrobina</b>						
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.