

Desenvolvimento de métodos analíticos espectrofluorimétricos e eletroanalíticos para compostos de interesse farmacológico

Aluno: Juliano Leodônio Xavier Lima

Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio

1. Introdução

Com o crescente desenvolvimento e crescimento populacional ocorrido principalmente após a Primeira Revolução industrial, ocorrida no século XVIII, alguns recursos são sobrecarregados. Especificamente na produção de alimentos, o aumento de eficiência passa pela maior produtividade por área plantada e pelo controle de pragas. O manejo de culturas geneticamente modificadas, conhecidas como alimentos transgênicos, com resistência às pragas é ainda controverso e necessita de mais pesquisas a cerca dos impactos provenientes na flora e em possíveis efeitos colaterais decorrentes do seu consumo. A utilização de pesticidas é ainda a estratégia mais difundida para o controle de pragas, sendo essa prática extensiva depois da II Guerra Mundial por causa da introdução do DDT, BHC, aldrina, dietilaldrina, endrina e 2,4 – D. A constituição da produção de pesticidas possuem propriedades físicas dos constituintes, como causa diferentes classes de pesticidas podem ser usadas em combinação, como consequência pretende-se potencializar os efeitos para minimizar ou eliminar a presença de pragas nas culturas. Mesmo assim, ainda que usados corretamente, acidentes decorrentes do uso de pesticidas são comuns. Muitas classes de pesticidas podem prejudicar o meio ambiente além de ocasionar intoxicações graves nos seres vivos¹.

Os pesticidas desenvolvidos nos últimos anos possuem como característica uma alta persistência e permanência mais prolongada no meio ambiente o que acarreta um maior risco de contaminação tanto dos alimentos quanto do manipulador sem os devidos requisitos de segurança, podendo contaminar o solo, o ar e o lençol freático, tornando importante seu monitoramento quantitativo da presença dos mesmos. As estrobirulinas são uma classe de pesticidas naturais isolados principalmente de cogumelos, sendo facilmente degradados em plantas animais e água. As estrobirulinas sintéticas foram produzidas a partir das estrobirulinas naturais, sendo mais estáveis e potentes quando usados para controle de fungos na agricultura. As estrobilurinas inibem a respiração celular ligando-se a um local específico nas mitocôndrias, o local de oxidação do quinol (ou do ubiquinol) do citocromo b, e desse modo a transferência de elétrons entre o citocromo b e c cessa, o que leva a diminuição da taxa de oxidação do NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) e síntese do ATP (adenosina trifosfato). Como consequência, a produção de energia é parada e o parasito (fungo) morre². As estrobilurinas são mais conhecidas como fungicidas inibidores quinonas, cuja característica importante é a ação rápida e concentrada no primeiro período do ciclo de vida dos fungos, isto é, no estágio de esporos. Por causa desse modo de ação diferenciado, as estrobilurinas são degradadas rapidamente nas plantas, água e solo. A maioria dos fungicidas estrobilurinas tem um período residual de aproximadamente 21 dias. As quantidades esperadas para causar toxicidade aguda em indivíduos de 68 kg seriam as seguintes: de 500 até 5.000 mg/kg (ingestão oral), de 2.000 a 20.000 mg/kg (exposição cutânea) e de 2.0 a 20.0 mg/L (inalação)³. Até o ano de 2005 não havia relatos de efeitos teratogênicos e carcinogênicos decorrentes da exposição às estrobilurinas, no entanto, estas são tóxicas para peixes e invertebrados aquáticos, o que torna necessário o acompanhamento quando se faz a aplicação em torno de poços

d'água, estes cuidados são indicados nas embalagens dos produtos⁴. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA) é de 0,043 mg Kg⁻¹ para a picoxistrobina, 0,040 mg Kg⁻¹ para a piraclostrobina, 0,02 mg Kg⁻¹ para azoxistrobina e 0,03 mg Kg⁻¹ para trifloxistrobina⁵.

Metodologias analíticas tem sido desenvolvidas e pesquisadas visando uma determinação simultânea e prática de estrobirulinas. As técnicas cromatográficas estão sendo utilizadas e variações desenvolvidas para utilização em análises de amostras, tais como frutas, vegetais, sucos, vinhos e compartimentos ambientais como água e solo. A técnica de eletroforese capilar até o momento não foi aplicada para determinação de dimoxistrobina. O objetivo deste trabalho é desenvolver um novo método para determinação simultânea de sete estrobirulinas apresentados na Figura 1 (azoxistrobina, dimoxistrobina, piraclostrobina, picoxistrobina, trifloxistrobina, kresoxim-metil e fluoxastrobina) utilizando a técnica de eletroforese capilar micelar (MEKC). Esta técnica se baseia na aplicação de uma diferença de potencial visando à separação de analitos com diferentes mobilidades eletroforéticas dentro de um capilar preenchido com um eletrólito de separação, a detecção será por fotometria de absorção. Dentre as vantagens desta técnica estão a alta velocidade e eficiência, fácil manuseio da amostra, baixa produção de resíduos e baixo custo de operação.

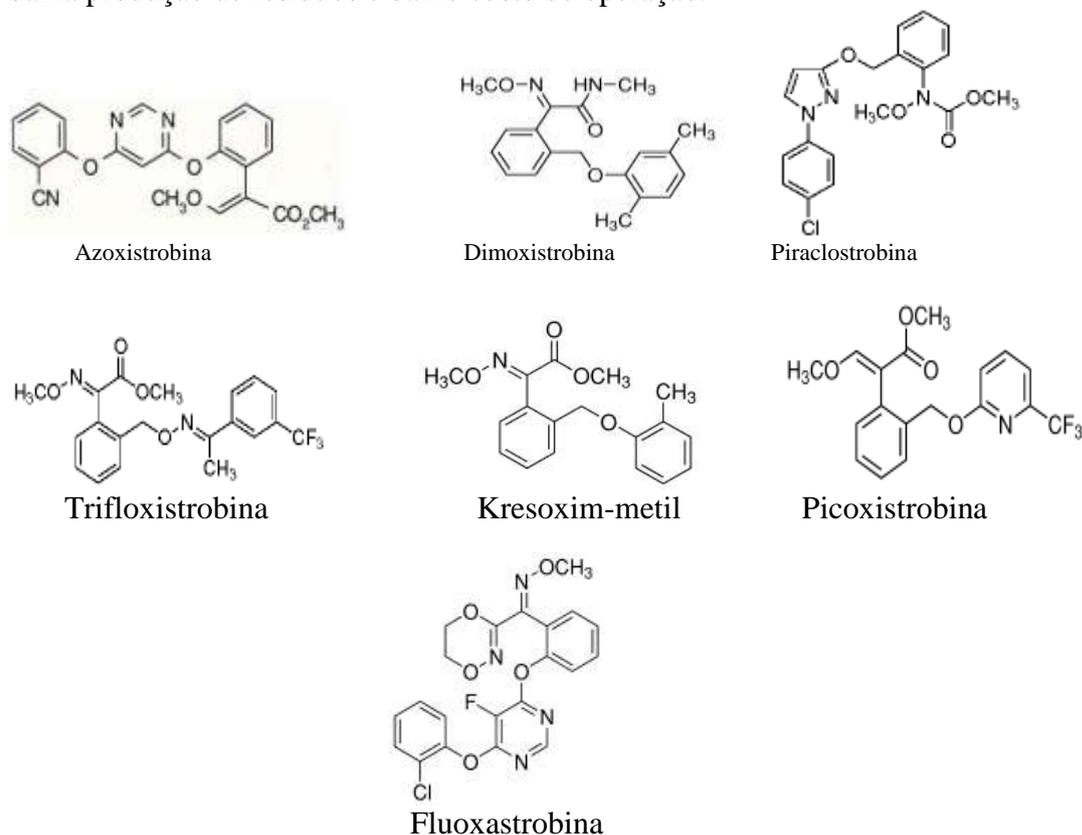


Figura 1: Estrutura das estrobirulinas selecionadas para este trabalho.

1.1 Cromatografia eletrocinética capilar micelar - MEKC

O processo de eletroforese é definido como “o movimento ou migração diferenciada de espécies carregadas pela atração ou repulsão em um campo elétrico”. Na eletroforese capilar 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 (MEKC) 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. MEKC 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 1984⁶.

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.*⁷ 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. MEKC é um caso especial de EKC, na qual a fase secundária é uma fase micelar dispersa no capilar⁸.

Em MEKC, 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 eletroosmose. Solutos neutros com diferentes coeficientes de partição (P_{mw}) entre a fase aquosa (eletrólito) e a fase micelar podem ser separados^{6,8} (Figura 2). Em MEKC 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}). MEKC 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. MEKC 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 solvente⁶.

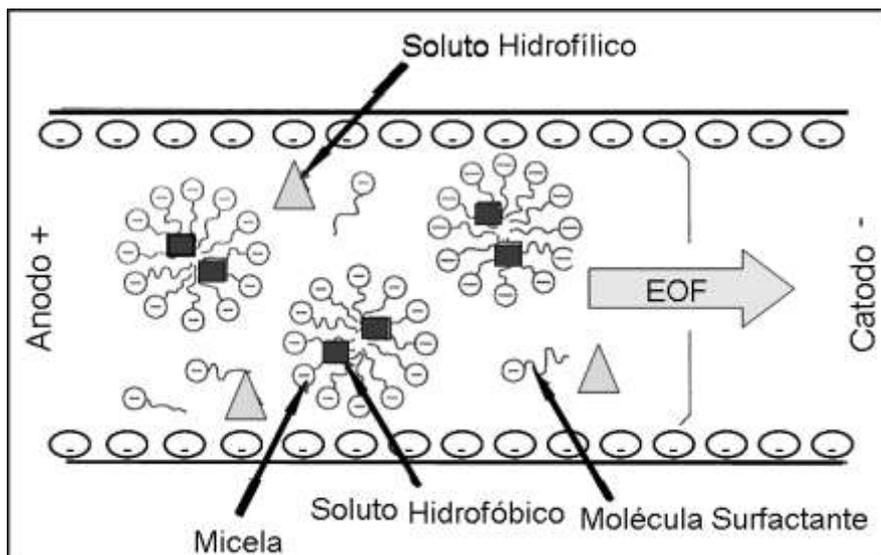


Figura 2: Esquema representativo da separação por MEKC usando micelas aniônicas (adaptado da ref.9).

1.1.1 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 anfotero; 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 Erro! Indicador não definido.

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)¹⁰.

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-micela¹⁰. Para o sucesso da separação é necessário que essa interação seja diferente para os diversos solutos.

1.1.2 Migração em MEKC

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 MEKC. 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 MEKC 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 capilar⁶(Figura 3).

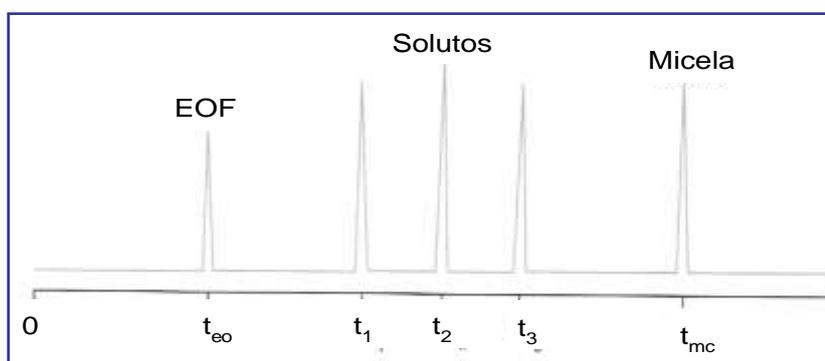


Figura 3: Esquema da janela de eluição em MEKC (adaptado da ref. 11).

2. Proposta de Trabalho

A proposta de trabalho foi desenvolver um método analítico para determinação simultânea de pesticidas em alimentos através da técnica de cromatografia eletrocínética capilar micelar. Os pesticidas analisados foram azoxistrobina, dimoxistrobina, piraclostrobina, picoxistrobina, trifloxistrobina, kresoxim-metil e fluoxastrobina, que pertencem a uma classe conhecida como estrobirulina. As condições instrumentais e experimentais para a separação dos pesticidas foram otimizadas.

3. Procedimento experimental

3.1 Materiais e reagentes

Azoxistrobina, dimoxistrobina, piraclostrobina, picoxistrobina, trifloxistrobina, kresoxim-metil e fluoxastrobina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Soluções estoque 1×10^{-3} mol L^{-1} , preparadas em acetonitrila grau HPLC (Merck - Darmstadt, Alemanha), foram utilizadas no preparo das soluções de trabalho através de diluições posteriores. Todas as soluções foram filtradas com filtros Milipore de $0,45 \mu m$ (membranas de PTFE) antes da injeção nos sistemas eletroforese capilar. O eletrólito de corrida contendo tampão borato, SDS e acetonitrila foi preparado diariamente e o pH ajustado com NaOH $1 \text{ mol } L^{-1}$. O ácido bórico e o SDS (docecil sulfato de sódio) foram obtidos da Merck.

4. Instrumentação

As análises por eletroforese capilar foram realizadas em um equipamento comercial Hewlett-Packard (HP) CE – Agilent. O instrumento era equipado com um detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos de operação na faixa de 190 a 600 nm, um controlador de temperatura do tipo Peltier, um sistema automático de injeção de amostra e um programa de aquisição e tratamento de dados desenvolvido pela Agilent. As separações foram conduzidas em capilar de sílica fundida de 56 cm de comprimento total (47,5 cm até o detector) e 75 µm de diâmetro interno. A diferença de potencial aplicada durante as análises foi de +25 kV e a temperatura mantida constante em 25 °C. As injeções das amostras foram realizadas em modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar por 15 segundos.

5. Resultados e discussão

5.1 Estudo visando à determinação de pesticidas por CE

O primeiro estudo foi realizado com intuito de separar duas estrobilurinas (azoxistrobina e dimoxistrobina) utilizando o método MEKC, uma vez que os analitos são neutros em solução. Estudos realizados anteriormente com duas estrobilurinas, picoxistrobina e piraclostrobina, indicaram que apenas a interação analito-micela não era suficiente para que ocorresse a separação desses analitos. A separação das estrobilurinas só ocorreu após a adição de modificador orgânico ao eletrólito de trabalho (BGE), e o estudo mostrou que a adição de acetonitrila (ACN) apresentava melhores resultados em termos de resolução do que a presença de metanol¹².

Devido a estudos anteriores, os estudos iniciais de separação da azoxistrobina e dimoxistrobina foram realizados utilizando como eletrólito de trabalho uma solução contendo 40 mmol L⁻¹ Borato, 30 mmol L⁻¹ SDS, pH = 8,61 e os parâmetros instrumentais estabelecidos nos seguintes valores: temperatura = 25 °C; voltagem = 25kV e tempo de injeção = 15 segundos. Soluções estoques dos pesticidas foram preparados a partir de seus padrões analíticos em ACN na concentração de 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ e estocados a 4 °C no escuro. Soluções de trabalho foram diluídas em água nas concentrações desejadas. O eletrólito de trabalho foi preparado diariamente com ajuste de pH com auxílio de um pHmetro.

Um estudo univariado dos parâmetros experimentais que tem maior influência na separação dos analitos foi realizado para otimizar a separação entre azoxistrobina e dimoxistrobina. O tempo de análise, representado pelo tempo de migração do último pico, e a resolução entre os picos foram as respostas avaliadas na escolha das condições experimentais. A melhoria da resolução foi verificada pela adição de ACN no eletrólito de trabalho variando sua proporção entre 15 e 25%, em volume (Figura 4). Uma porcentagem maior de solvente foi evitada por causa do possível efeito deletério na formação das micelas. A melhor resolução entre os picos foi obtida com 21% de ACN apesar de uma pequena degradação do pico da dimoxistrobina (pico em 4,6 minutos), essa porcentagem foi estabelecida para os próximos testes.

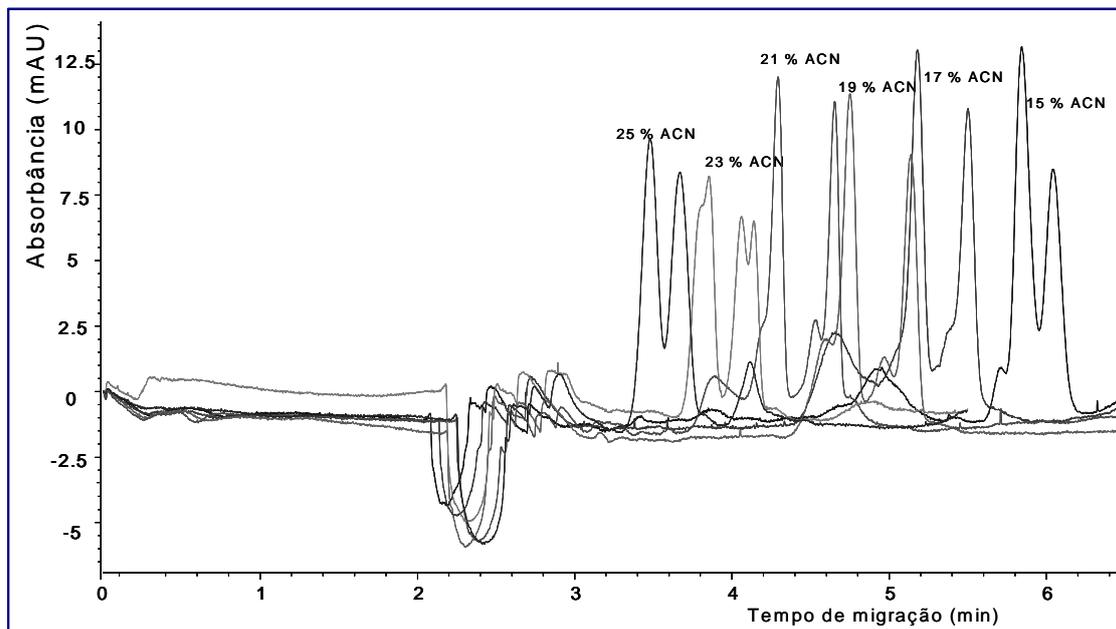


Figura 4: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Variação da porcentagem de ACN no eletrólito. Eletrólito de trabalho: 30 mmol L^{-1} de SDS, 40 mmol L^{-1} Borato, pH 8,5, capilar de sílica fundida de $50 \text{ cm} \times 75 \text{ } \mu\text{m d.i.}$ ($42,5 \text{ cm}$ até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos . O potencial aplicado (V) foi de 25 kV , temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm .

O efeito da concentração do surfactante (SDS) foi otimizada numa faixa de concentração entre $27 - 42 \text{ mmol L}^{-1}$ (faixa de concentração acima da CMC – $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ - do surfactante em água). Os resultados foram apresentados na Figura 5 abaixo. O aumento da concentração de surfactante provocou um aumento no tempo de migração, melhorou a resolução e aumentou na área dos picos, aumentando a sensibilidade do método. Com uma concentração de 27 mmol L^{-1} , o tempo total da análise foi de aproximadamente $3,78 \text{ minutos}$, já com a concentração de 42 mmol L^{-1} a análise teve um tempo alterado para $5,42 \text{ minutos}$. A concentração de 42 mmol L^{-1} de SDS foi escolhida para otimização do próximo parâmetro.

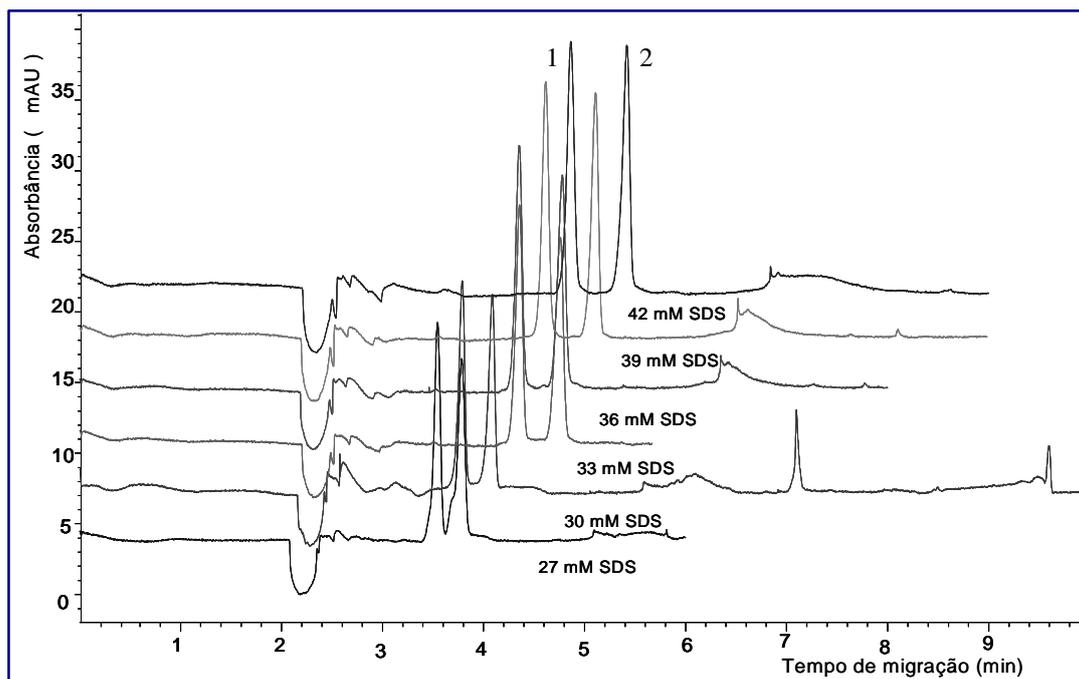


Figura 5: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Variação da concentração de SDS no eletrólito. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L^{-1} Borato, pH 8,5 e 21% ACN; capilar de sílica fundida de 50 cm x $75 \mu\text{m}$ d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm. 1 = azoxistrobina, 2 = dimoxistrobina.

Um ajuste fino de pH foi feito com o tampão borato, com pequenas variações, dentro da faixa entre 8,51 e 9,01 (Figura 6). A separação dos picos foi observada em todos os valores de pH testados dentro da faixa do tampão borato e não houve diferença significativa na resolução dos picos, assim como no tempo de análise. Assim, o pH entre de 8,81 e 9,01 pode ser usado nos 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.

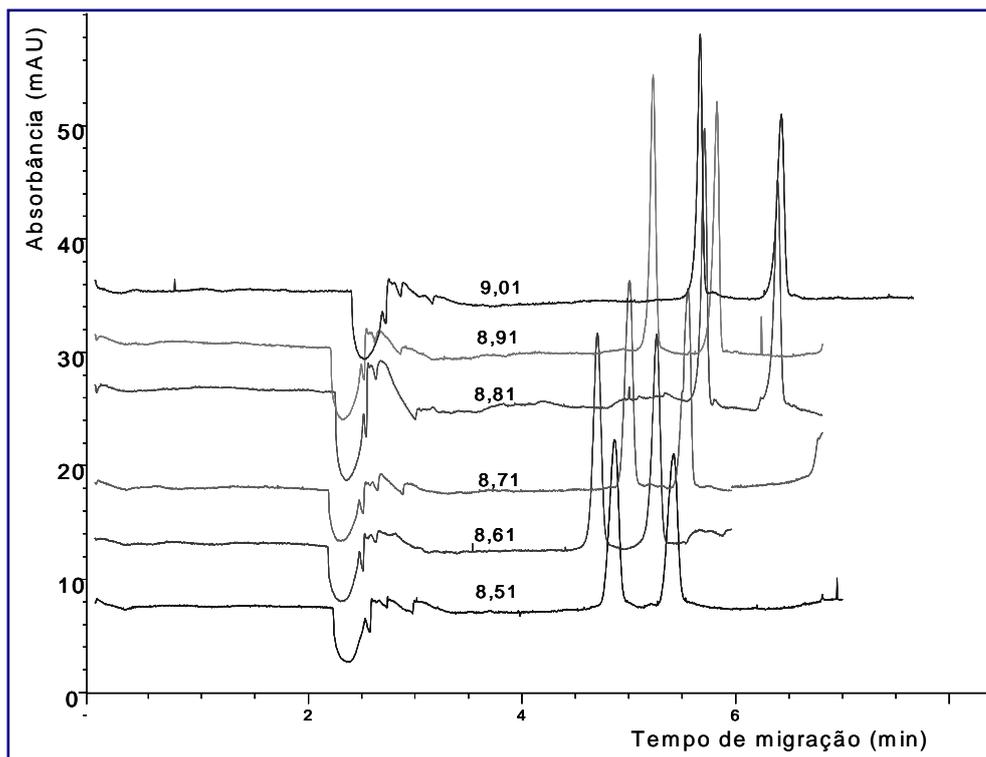


Figura 6: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Variação do pH do eletrólito. Eletrólito de trabalho: 42 mmol L^{-1} de SDS; 40 mmol L^{-1} Borato, 21% ACN, capilar de sílica fundida de $50 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm.

As condições estabelecidas até aqui foram: eletrólito de trabalho contendo: 42 mmol L^{-1} de SDS, 40 mmol L^{-1} Borato, 21% ACN e ajuste de pH com hidróxido de sódio entre 8,81 e 9,01. Os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos com aplicação de potencial aplicado de 25 kV e temperatura de 25°C .

O estudo com as estrobilurinas foi ampliado pela inclusão no método de outros pesticidas da classe como, piraclorobina, picoxistrobina, trifloxistrobina, kresoxim-metil, metominostrobin e fluoxastrobina.

A condição de contorno já estabelecida foram utilizadas para a realização de 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 possa ser realizado. Esses condicionamentos são fundamentais para 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.

As condições estabelecidas anteriormente foram utilizadas para iniciar os estudos de separação das sete estrobilurinas selecionadas. O primeiro teste de separação foi realizado variando a concentração de ACN (15, 17 e 20%) no eletrólito de trabalho

(Figura 7). Os sete picos referentes aos analitos foram identificados, mas alguns analitos migraram juntos. A melhor resolução entre os picos foi obtida com 15% de ACN.

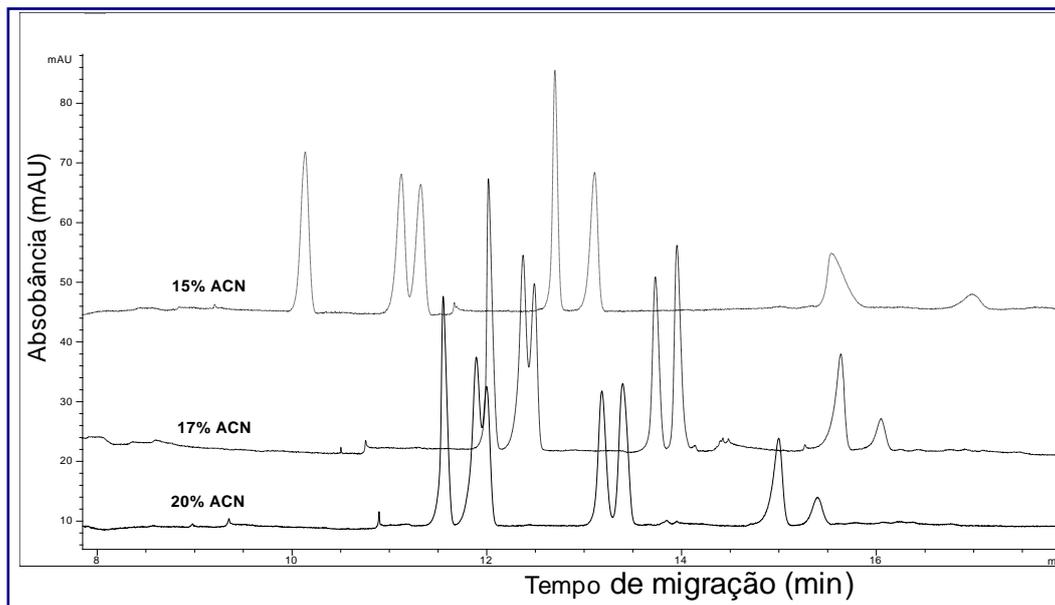


Figura 7: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Variação da porcentagem de ACN no eletrólito de trabalho: 42 mmol L^{-1} de SDS; 40 mmol L^{-1} Borato, pH 9,0, capilar de sílica fundida de $50 \text{ cm} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$ d.i. ($42,5 \text{ cm}$ até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos . O potencial aplicado (V) foi de 25 kV , temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm .

O efeito da concentração do tampão no eletrólito foi realizado para verificar a possível separação dos analitos. O resultado apresentado na Figura 8 mostra que a variação da concentração do tampão não teve efeito significativo na resolução entre os picos. A concentração de 80 mmol L^{-1} foi selecionada para os próximos testes por apresentar um menor alargamento dos últimos picos.

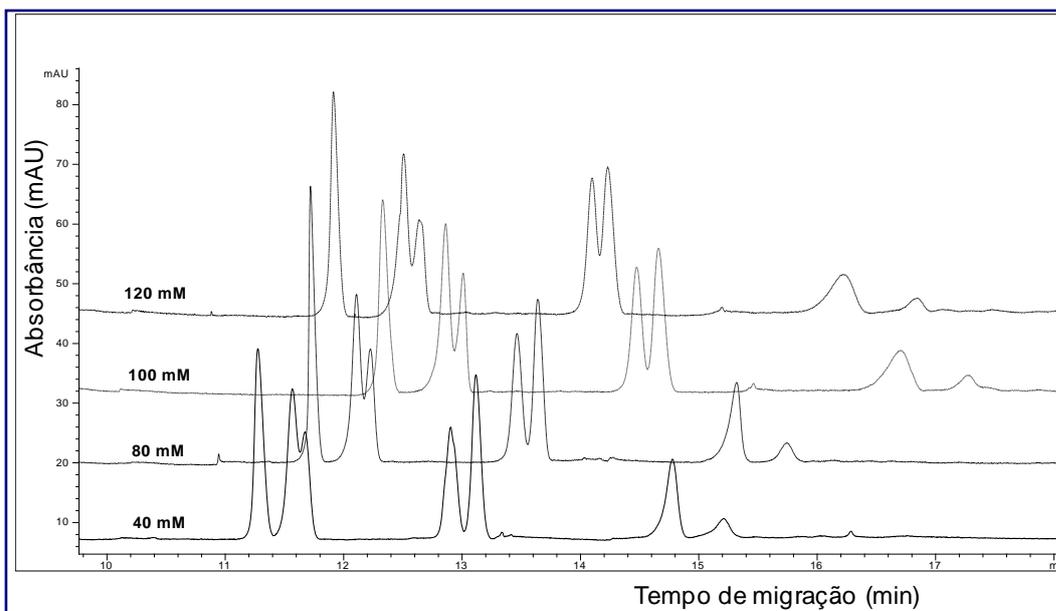


Figura 8: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Variação da concentração do tampão no eletrólito de trabalho: 42 mmol L^{-1} de SDS; 15 % ACN, pH 9,0 capilar de sílica fundida de 50 cm x 75 μm d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm.

Um planejamento experimental foi realizado para fazer um ajuste das condições experimentais. A amplitude de cada parâmetro foi ajustada de acordo com os resultados obtidos nos estudos univariados apresentados anteriormente. Um planejamento experimental composto central (CCD) 2^3 foi utilizado e as variáveis consideradas foram: porcentagem de ACN, concentração de SDS e o pH do eletrólito de trabalho. O procedimento foi realizado com replicatas autênticas (3) no ponto central. Os níveis escolhidos e estabelecidos para os parâmetros estão apresentados na Tabela 1.

A resolução foi calculada pela Equação 1, onde utilizou o critério da largura do pico a meia altura¹³.

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

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.

Tabela 1: Níveis estabelecidos dos parâmetros escolhidos para CCD 2^3 .

Parâmetro	+ 1,682	+ 1	0	- 1	- 1,682
% ACN	23,0	21	18	15	12,9
pH	9,8	9,5	9,0	8,5	8,2
Concentração SDS (mol L^{-1})	48,4	45	40	35	31,5

A Figura 8 e 9 apresenta o gráfico de pareto dos resultados obtidos para a resolução entre os analitos denominados 2, 3, 4 e 5 seguindo a ordem de eluição. A porcentagem de ACN no eletrólito de trabalho é o termo mais relevante e tem

contribuição linear para a resolução entre os analitos 2 e 3 e contribuição linear e quadrática para a resolução entre os analitos 4 e 5. Não foi detectada a interação entre os parâmetros seleccionados neste planeamento.

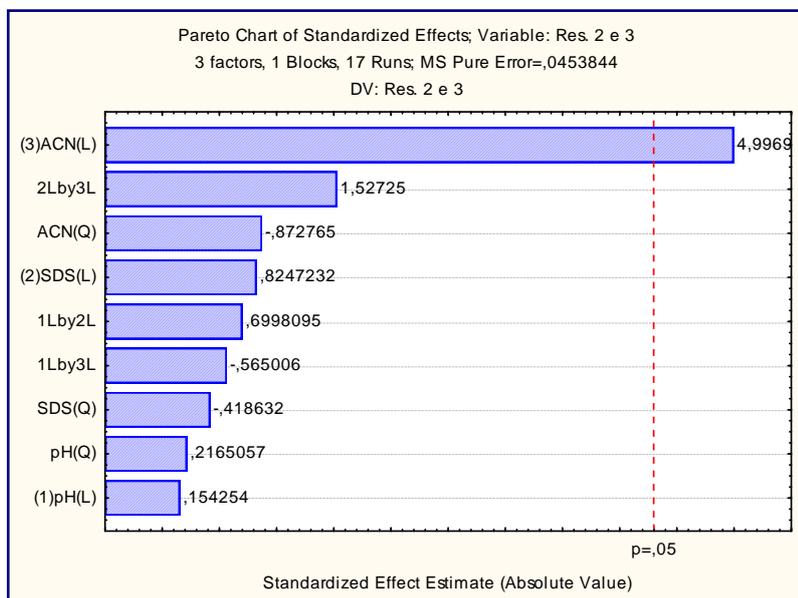


Figura 8: Gráfico de pareto considerando como resposta a resolução entre os analitos 2 e 3.

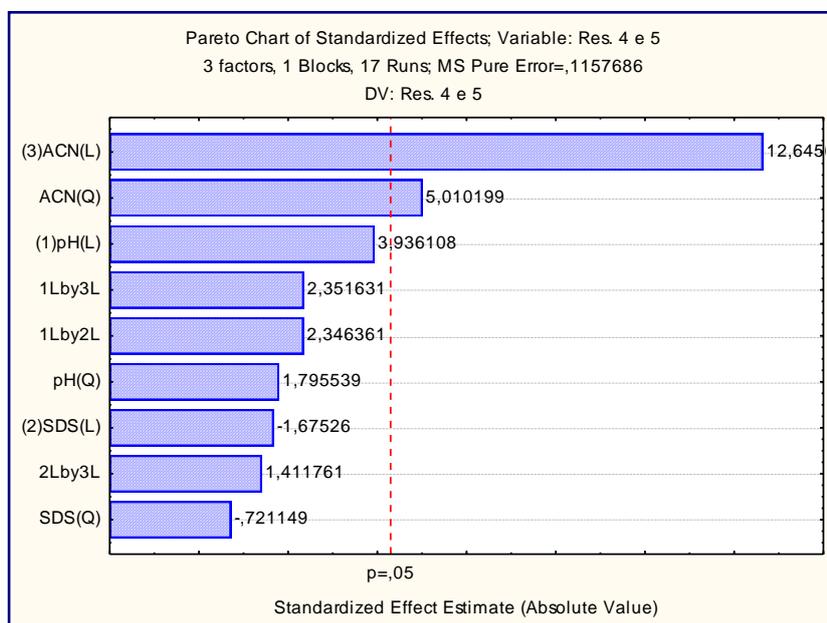


Figura 9: Gráfico de pareto considerando como resposta a resolução entre os analitos 4 e 5.

A Figura 10 apresenta um eletroferograma que mostra a melhor resolução obtida experimentalmente quando realizado o planeamento. Um novo planeamento experimental composto central 2^2 considerando apenas as variáveis, concentração de SDS e % ACN no eletrólito de trabalho foi realizado para melhorar a resolução entre os

picos 2 e 3. O pH do eletrólito foi fixado em 9,0 para o novo planejamento. No eletroferograma abaixo podemos ver que para um valor de pH igual a 9,0 foi obtido uma boa resolução entre os demais analitos com exceção dos analitos 2 e 3 que ainda tiveram tempos de migração muito próximos.

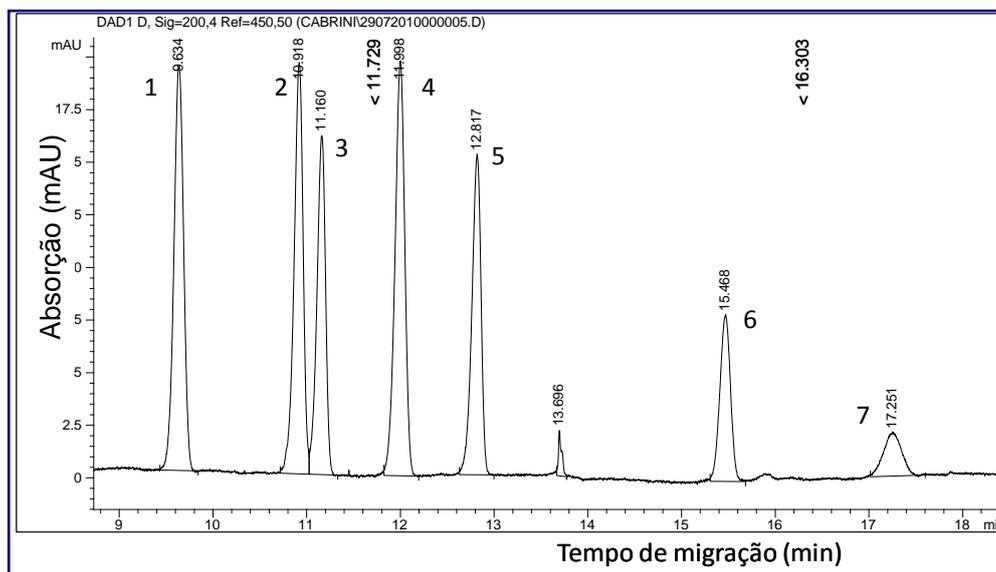


Figura 10: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Eletrólito de trabalho: 40 mmol L^{-1} de SDS; 23% ACN, pH 9,0 capilar de sílica fundida de $50 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm.

Os níveis dos parâmetros selecionados para a realização do novo planejamento experimental composto central 2^2 estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Níveis estabelecidos dos parâmetros escolhidos para CCD 2^2 .

Parâmetro	+ 1,414	+ 1	0	- 1	- 1,414
% ACN	28,2	27	24	21	19,8
Concentração SDS (mol L^{-1})	64	60	50	40	36

A Figura 11 apresenta os gráficos da curva de nível e pareto tendo como resposta a resolução entre os picos 2 e 3. O gráfico da curva de nível mostra que para obter um maior valor de resolução entre os analitos 2 e 3 é necessário aumentar a concentração de SDS (aproximadamente 70 mmol L^{-1}) e também a porcentagem de acetonitrila (aproximadamente 29%). O gráfico de pareto mostra que os fatores mais relevantes são a concentração de SDS no eletrólito e há interação entre os fatores, ambos apresentam uma contribuição linear para a resolução.

A Figura 12 mostra os gráficos obtidos da curva de nível e pareto para a resolução entre os picos 4 e 5. Esses analitos haviam sido resolvidos no primeiro planejamento, mas é importante verificar a resolução entre todos dos picos que

apresentam tempos de migração próximos. A resposta da curva de nível teve um comportamento muito próximo ao obtido para a resolução entre os analitos 2 e 3. Ambos os fatores tiveram contribuição relevante, a concentração de SDS tem uma contribuição linear assim como a interação entre os fatores, a porcentagem de ACN teve uma contribuição linear e quadrática.

A resolução entre os analitos 3 e 4 também foi investigada, pois estes estavam bem resolvidos no primeiro planejamento (Figura 10), mas alteração na resolução foi observada durante o planejamento 2^2 . A Figura 13 apresenta o resultado encontrado para a resolução entre os analitos 3 e 4. Pelo gráfico da curva de nível verificamos que para obter uma melhor resolução entre os analitos 3 e 4 não podemos aumentar a concentração de SDS no eletrólito de trabalho como indicado nos resultados anteriores. A porcentagem de acetonitrila foi o único fator relevante para esta resolução.

A Figura 14 apresenta um eletroferograma obtido utilizando os resultados obtidos com o planejamento CCD 2^2 . Foi verificado que com o aumento da concentração de SDS para 70 mmol L^{-1} e a porcentagem de ACN para 27% é possível separar todos os analitos em um tempo de análise de aproximadamente 36 minutos. Com 80 mmol L^{-1} de SDS o tempo de análise foi de aproximadamente 48 minutos e os analitos 3 e 4 não tiveram boa resolução. O eletrólito de trabalho para determinação dos 7 analitos deve conter 70 mmol L^{-1} de SDS e 27% de ACN com pH igual a 9,00.

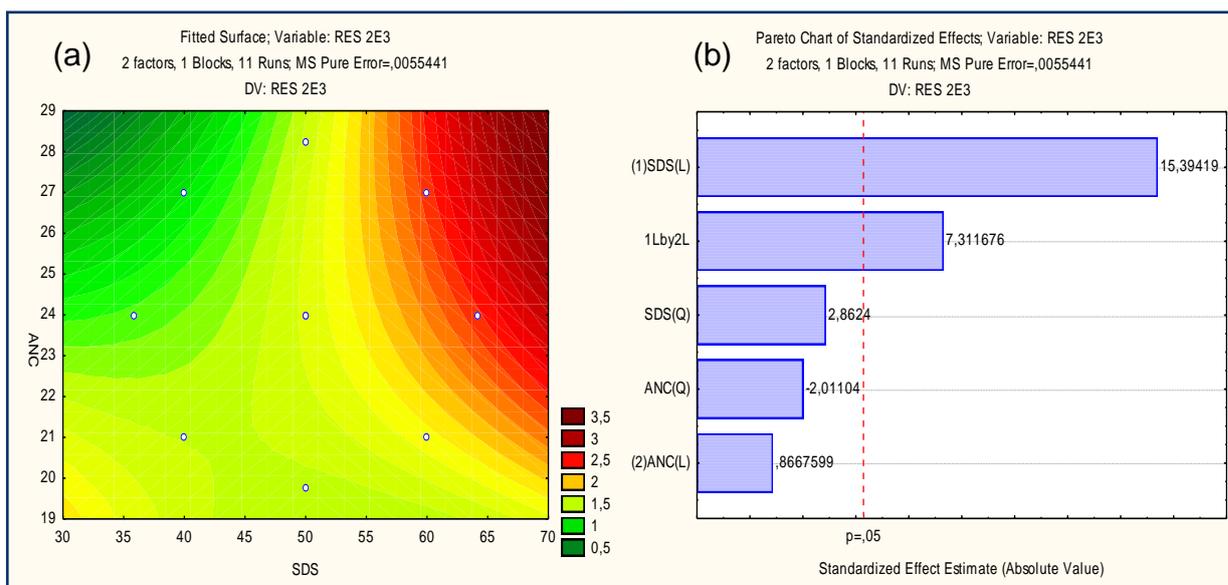


Figura 11: Gráfico da curva de nível (a) e pareto (b) para a resolução entre os analitos 2 e 3.

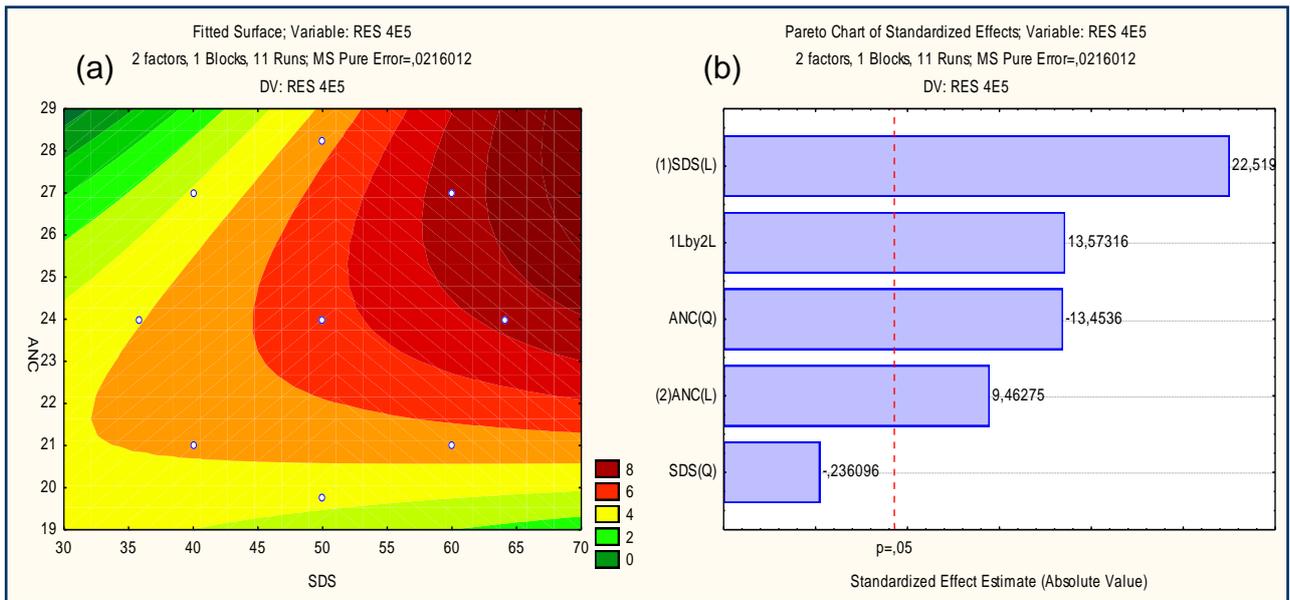


Figura 12: Gráfico da curva de nível (a) e pareto (b) para a resolução entre os analitos 4 e 5.

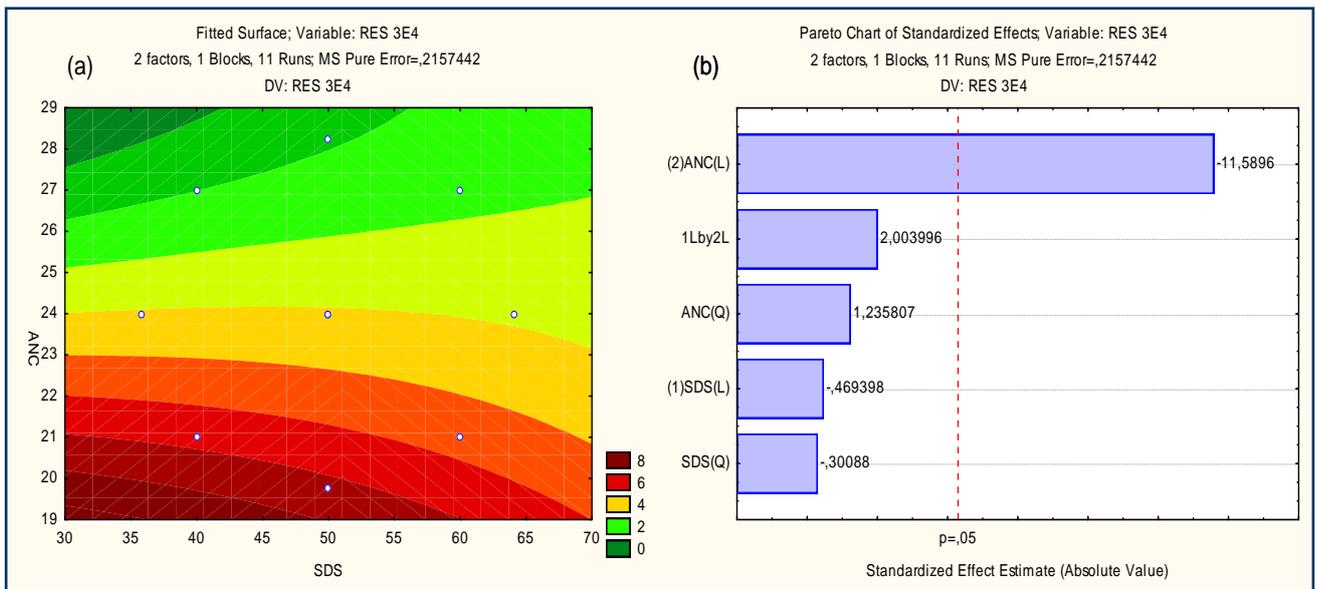


Figura 13: Gráfico da curva de nível (a) e pareto (b) para a resolução entre os analitos 3 e 4.

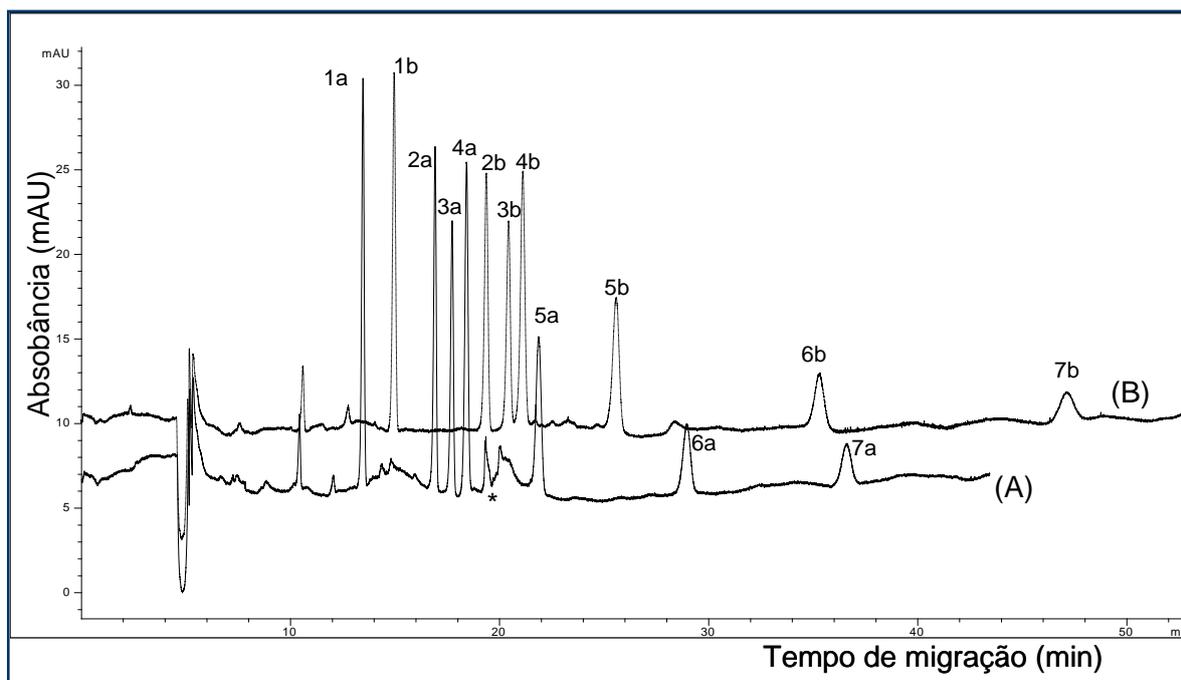


Figura 14: Análise de uma solução padrão das estrobilurinas ($1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método MEKC. Eletrólito de trabalho: 70 e 80 mmol L^{-1} de SDS; 27% ACN, pH 9,0 capilar de sílica fundida de 50 cm x 75 μm d.i. (42,5 cm até o detector), os analitos foram injetados hidrodinamicamente, com pressão de 50 mbar por 15 segundos. O potencial aplicado (V) foi de 25 kV, temperatura (T) de 25°C e detecção em 200 nm.

Com a resolução dos sete picos, a identificação dos analitos no eletroferograma foi realizada através da medição dos espectros de absorção com o próprio detector utilizado para as análises eletroforéticas (detector espectrofotométrico do tipo arranjo de diodos). Um espectro foi obtido para cada pico no eletroferograma da mistura contendo todos os sete analitos (Figura 12), e estes espectros foram comparados com os espectros obtidos para as soluções das substâncias puras, nas mesmas condições. A ordem de saída dos analitos foi determinada como: Azoxistrobina, Dimoxistrobina, Kresoxim-metil, Fluoxastrobina, Picoxistrobina, Piraclostrobinæ Trifloxistrobina. Os espectros de absorção estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

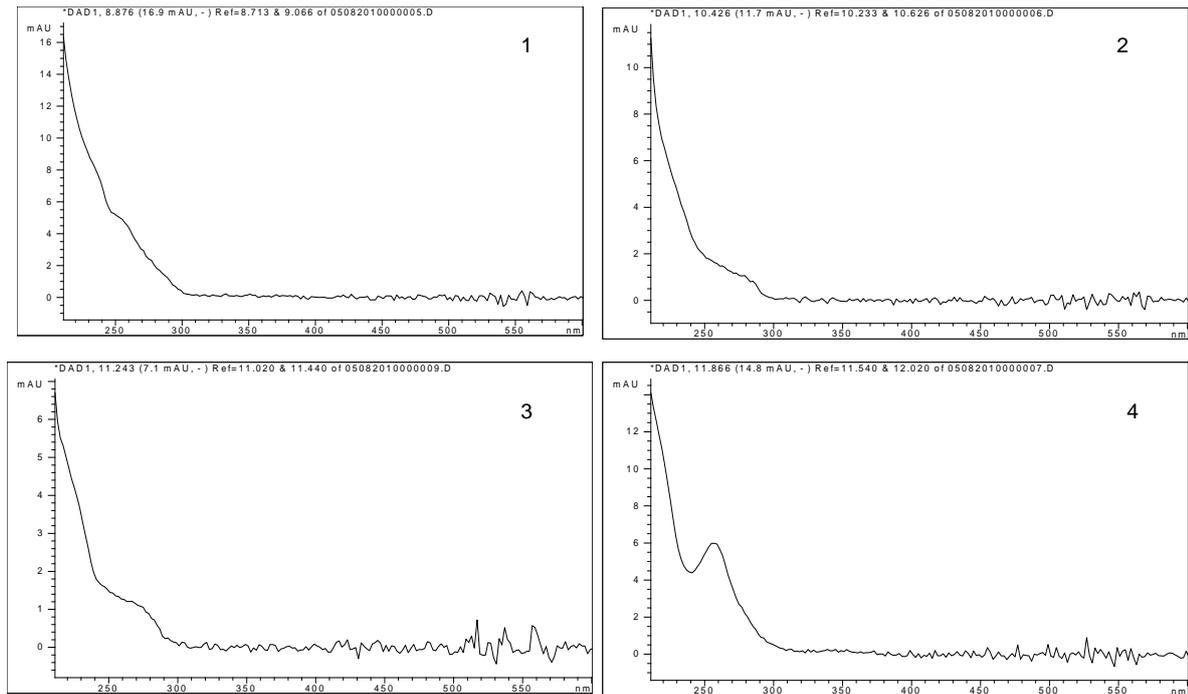


Figura 15: Espectros de absorção das estrobilurinas: (1) Azoxistrobina, (2) Dimoxistrobina, (3) Kresoxim-metil, (4) Fluoxistrobina.

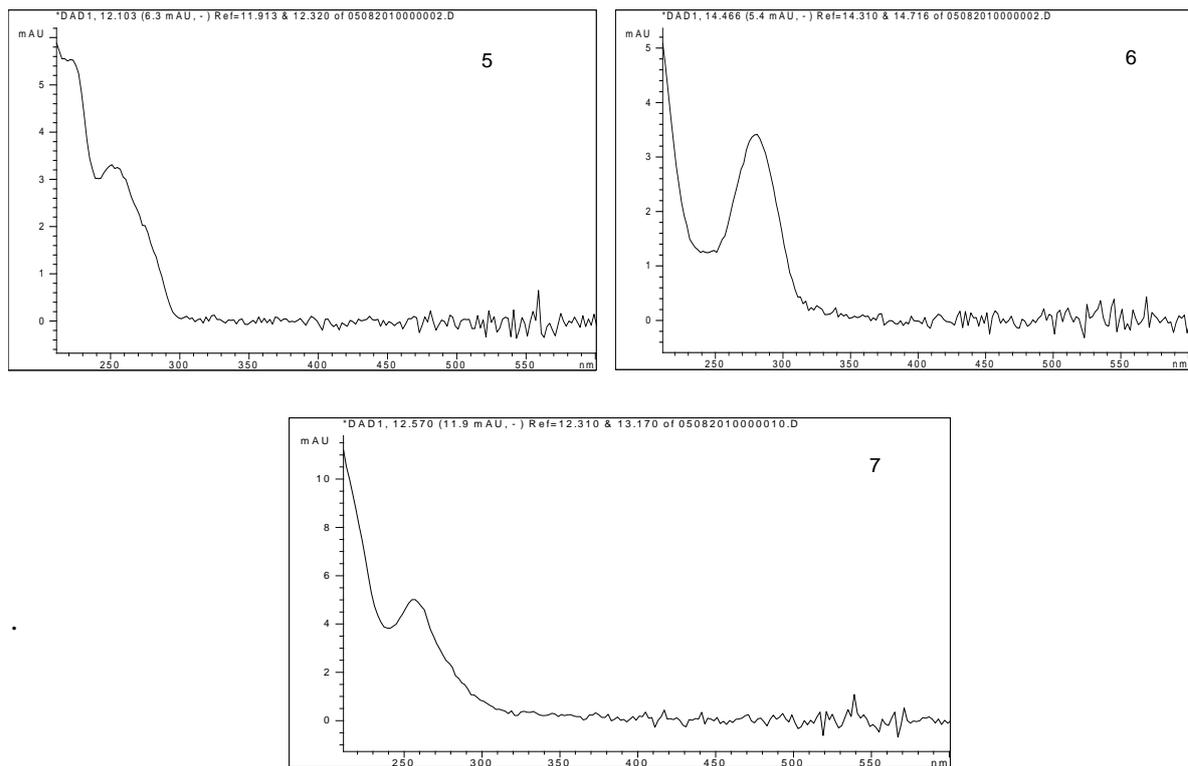


Figura 16: Espectros de absorção das estrobilurinas: (5) Picoxistrobina, (6) Piraclostrobina, (7) Trifloxistrobina .

6. Conclusão:

Os parâmetros experimentais e instrumentais do método analítico baseado em MEKC foram otimizados para determinação de sete estrobilurinas. O método foi inicialmente otimizado para apenas duas estrobilurinas (azoxistrobina e dimoxistrobina) para avaliar a capacidade de separação das condições já existente no método desenvolvido anteriormente no laboratório¹². Uma ótima separação para esse dois picos foi obtida com boa simetria e resolução. O planejamento composto central (2^3 e 2^2) foi realizado tendo como variáveis a concentração de SDS, a porcentagem de ACN e o pH do eletrólito de trabalho. Com a realização dos planejamentos foi possível encontrar as melhores condições para promover a separação dos sete analitos utilizando o método MEKC. Os valores obtidos para os parâmetros otimizados no eletrólito de trabalho foram 70 mmol L⁻¹ para a concentração de SDS, 27% de ACN e pH igual a 9,00. O desenvolvimento do método se encontra em andamento. Será realizada a validação do método, que é muito importante para avaliar o desempenho das análises na eletroforese capilar. Em busca de aumentar a sensibilidade será estudada a possibilidade da aplicação pré-concentração em linha. O método será aplicado em amostra de alimentos com diferentes procedimentos de preparo de amostra.

7. Referências Bibliográficas:

¹ KEITH. S. D., Pesticidas Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends, **Department of Agriculture Extension Service National Agriculture Pesticide Impact Assessment Program special project**, v. 1121, p. 1 - 7, 2000.

² BALBA, H., *Review of Strobilurin Fungicides Chemicals*, **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, p. 441 – 451, 2007.

³ Índice Monográfico, Monografia de produtos Agrotóxicos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVIA, P26, P46, P50 e T54.

⁴ FISHEL, F.M., *Pesticide Toxicity Profile: Strobilurins Pesticides*, PI – 67, **U. F. IFAS Extension**, 2005.

⁵ Índice Monográfico, Monografia de produtos Agrotóxicos, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVIA, P26, P46, P50 e T54.

⁶ KHALEDI, M. G, *High-Performance Capillary Electrophoresis – Theory, Techniques, and Applications*, **Chemical Analysis**, v. 146, 1998.

⁷ TERABE, M. F. M.; QUIRINO, J. P.; INOUE, N., *Reversed Migration Micellar Electrokinetic Chromatography with Off-Line and On-Line Concentration Analysis of Phenylurea Herbicides*, **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 187 – 194, 2000.

⁸ PYELL, U., *Electrokinetic Chromatography, Theory, Instrumentation e Applications*, **Wiley**, 2006.

⁹ NURSTEN, R. M. A., *Capillary Electrophoresis for Food Analysis – Method Development*, **Royal Society of Chemistry**, 2000.

¹⁰ TAVARES, M. F. M., *Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos*, **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173 – 181. 1996.

¹¹ HEIGER, D., *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*, **Hewlett – Packard**, Publicação número 5968-9963E, 2000.

¹² SOUZA, C. F. DE; CUNHA, A. L. M. C. DA, AUCELIOR, R. Q.; Determination of Picoxystrobin and Pyraclostrobin by MEKC with On-Line Analyte Concentration, *Chromatographia*, v. 70, p. 1461–1466, 2009.

¹³ NEUE, D. U., *HPLC Columns: Theory, Thechnology, and Praticce*, **Wiley**, 1997.