**Experimento 1 - SPE-HPLC**

*Determinação de contaminantes veterinários em leite e análise por HPLC após precipitação proteica seguida por SPE*

1. **Materiais equipamentos e Reagentes (por grupo)**
* Sistema cromatográfico (Shimadzu) (**Lab Anderson**);
* Coluna cromatográfica de octadecilsilano, C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) (**Lab Anderson**);
* Coluna de guarda C18 (4,6 x 12,5 mm) (**Lab Anderson**);
* Solução padrão interno de carbamazepina na concentração de 1000 ng mL-1 (2,0 mL);
* Leite desnatado livre de albendazol sulfóxido (matriz);
* Soluções padrão de albendazol sulfóxido nas seguintes concentrações: 100, 500, 1000, 5000, 10000 ng mL-1 (2,0 mL de cada solução);
* Sistema para extração em fase sólida (*manifold*) (1) – **Ver figura abaixo**
* Cartuchos para extração em fase sólida C8 (12)
* Centrífuga
* Pipeta volumétrica de 1,00 mL (1)
* Micropipeta de 10-100 µL (1) e de 100-1000 µL (1) e ponteiras para as mesmas
* Solventes grau HPLC: metanol (50 mL); hexano (100 mL); acetonitrila gelada (50 mL);
* Água ultrapura (50 mL)
* Tubos do tipo Falcon para centrifugar as amostras (12)
* Tubos para descarte de interferentes e coleta do analito durante a SPE (24)
1. **Procedimento Experimental**
	1. ***Preparo da curva analítica (em duplicata) (n=2)***
2. Adicionar 25 µL de cada concentração da solução padrão de albendazol sulfóxido nos tubos Falcon® de 15 mL, separadamente;
3. Adicionar 25 µL do padrão interno (carbamazepina) em todos os tubos Falcon®;
4. Adicionar 1,00 mL de leite desnatado;
5. Adicionar 1000 µL de acetonitrila gelada;
6. Agitar os tubos em agitador do tipo “mixer” durante 20 segundos;
7. Centrifugar os tubos durante 15 minutos em 3000 rpm.
	1. ***Quantificação dos analitos na amostra desconhecida de leite (triplicata) (n=3)***
8. Adicionar 25 µL do padrão interno (carbamazepina) aos tubos;
9. Adicionar 25 µL de acetonitrila;
10. Adicionar 1,00 mL **da amostra desconhecida** de leite;
11. Adicionar 1000 µL de acetonitrila gelada;
12. Agitar os tubos em agitador do tipo “mixer” durante 20 segundos;
13. Centrifugar durante 15 minutos em 3000 rpm.
	1. ***Avaliação dos interferentes da matriz (análise do “Branco”) (n=1)***
14. Adicionar 1,00 mL de leite desnatado ao tubo;
15. Adicionar 50 µL de acetonitrila;
16. Adicionar 1000 µL de acetonitrila gelada;
17. Agitar em agitador do tipo “mixer” durante 20 segundos;
18. Centrifugar durante 15 minutos em 3000 rpm.
	1. **Procedimento para a extração em fase sólida**
19. Posicionar os cartuchos C8 no *manifold* (**Ver figura abaixo**);
20. Posicionar os tubos para coleta do eluato no *manifold;*
21. Adicionar 1,0 mL de metanol em cada cartucho, aplicar vácuo e proceder a eluição evitando a secagem do sorvente;
22. Adicionar 1,0 mL de água ultrapura, aplicar vácuo e proceder a eluição evitando a secagem do sorvente;
23. Adicionar o sobrenadante da curva analítica, “branco” ou amostra desconhecida (sobrenadante das etapas 2.1; 2.2. e 2.3) nos cartuchos; aplicar vácuo e proceder a eluição evitando a secagem do sorvente.
24. Adicionar 3,0 mL de hexano, aplicar vácuo e proceder a eluição até completa secura do sorvente durante 10 min;
25. Após esse tempo, trocar os tubos que estão abaixo dos cartuchos e colocar tubos limpos (para coleta dos analitos)
26. Eluir a amostra com 2,0 mL de metanol, a uma vazão aproximada de 2 mL/min;
27. Coletar o eluato e centrifugá-lo durante 10 minutos em 3000 rpm;
28. Recuperar 1 mL do sobrenadante;
29. Secar o extrato resultante em fluxo de ar comprimido ou em centrífuga à vácuo;
30. Solubilizar o resíduo em 150 µL de fase móvel para posterior injeção no HPLC.
31. **Condições Cromatográficas (Lab Prof. Anderson-Não precisa preparar)**

Será utilizado um sistema para cromatografia liquida de alta eficiência, uma coluna analítica de octadecilsilano, C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) e uma coluna de guarda C18 (12,5 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel será composta de metanol e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% v/v (70:30 v/v), com vazão de 0,8 mL/min-1. A temperatura de análise será de 40 ºC e a detecção será feita em 290 nm.

1. **Relatório:**
	1. Apresentar, em tabelas, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas para cada replicata (apresentar também os valores de área do PI para cada concentração). **(0,5 ponto)**
	2. Apresentar a figura da curva analítica (por padronização interna) com a equação da reta e coeficiente de correlação. Apresentar, logo abaixo dessa figura, em forma de tabela a concentração obtida de albendazol sulfóxido da amostra na forma de média e desvio padrão (atenção para o uso correto de algarismos significativos). Apresentar os valores de área usados para o cálculo da concentração. **(3,5 pontos)**
	3. Por que é necessário a utilização de uma técnica de preparo de amostra anterior a injeção no sistema cromatográfico para amostras “complexas”? **(1 ponto)**
	4. Na etapa de precipitação proteica qual outro método (além da precipitação com solvente) poderia ser utilizado para a precipitação das proteínas? Explique. **(2 pontos)**
	5. Qual a função do padrão interno (P.I) nas análises quantitativas? Quais critérios devem ser levados em consideração para escolha de um P.I? **(2 pontos)**
	6. Qual modo empregado nessa análise: reverso ou normal? Explique. **(1 ponto)**

**SPE-HPLC**

*Determinação de contaminantes veterinários em leite e análise por HPLC após precipitação proteica seguida por SPE*

**Alguns Equipamentos**



Cartuchos para SPE

Local onde posicionar os tubos para coleta do eluato

*Manifold*

Saída para bomba à vácuo

**Experimento 2 - HPLC – Injeção direta (HPLC-ID)**

*Quantificação de cafeína em amostras de chá por injeção direta da amostra*

1. **Materiais, reagentes e instrumentação**
* 6 balões volumétricos de 10,00 mL
* 3 balões volumétricos de 10,0 mL
* 3 béqueres de 100 mL com vidro de relógio
* Chapa de aquecimento
* 1 micropipeta de 100-1000 µL
* Proveta de 100,00 mL
* 1 Termômetro de 100°C
* 3 frascos do tipo Eppendorf de 2,0 mL
* 1 Bastão de vidro médio
* 1 Microseringa de vidro
* 1 Bacia com gelo
* Água do tipo I
* Membrana 0,45 μm di do poro
* Padrão de cafeína
* Amostras de chá
* Sistema para cromatografia liquida de alta eficiência: Detector: Arranjo de Diodo – (λ = 254 nm).
* Injetor Rheodyne com loop (alça de amostragem) de 20 µL.
* Coluna C18 Zorbax ODS (250 mm x 4,6 mm; 5 µm).
* Microsseringa 100 µL
1. **Condições cromatográficas**
* Fase móvel: metanol: solução aquosa ácida pH 3,5 (70:30 v/v)
* Vazão: 1,2 mL/min
* Alça de amostragem: 20 µL
* Temperatura de análise: ambiente
1. **Procedimento experimental**
	1. ***Preparo da curva analítica da cafeína (n = 2).***

Partindo da solução-padrão de cafeína na concentração 500 µg mL-1, preparar 10,00 mL das soluções-padrão diluídas nas seguintes concentrações: 0,0025, 0,005, 0,010, 0,020 e 0,030 µg mL-1. Estas soluções diluídas deverão ser preparadas empregando a fase móvel como diluente. Posteriormente injetar em duplicata cada uma das concentrações nas condições indicadas no item 2.

* 1. ***Preparo da amostra de “chá” (n = 3).***

Pesar a massa correspondente a um sachê de chá. Mergulhar a amostra de chá em um béquer de 100 mL contendo água do tipo I à 80º C por 10 minutos. Após atingir à temperatura ambiente, pipetar 1,0 mL da amostra em um balão volumétrico de 10,00 mL e completar o volume com a fase móvel. Filtrar, com auxílio da microseringa de vidro em membrana com porosidade 0,45 µm, recolher o filtrado em um frasco do tipo Eppendorf e injetar no sistema cromatográfico nas condições indicadas no item 2. Fazer esse procedimento todo em triplicata. Com o auxílio da curva analítica, calcule a concentração de cafeína nas amostras.

1. **Relatório**
	1. Apresentar, em tabelas, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas para cada concentração e replicata. (**0,5 ponto**)
	2. Apresentar a figura da curva analítica com a equação da reta e coeficiente de correlação. Apresentar, logo abaixo dessa figura, em forma de tabela a concentração obtida de cafeína da amostra na forma de média e desvio padrão (atenção para o uso correto de algarismos significativos). Apresentar os valores de área usados para o cálculo da concentração. (**3 pontos**)
	3. Discuta como ficaria a análise caso a fase móvel fosse metanol: solução aquosa ácida pH 3,5 (50:50 v/v). (**1 ponto**)
	4. Discuta como ficaria a análise caso a coluna tivesse a seguinte dimensão: 150 mm *x* 4,6 mm D.I., diâmetro da partícula 5 µm. (**1 ponto**)
	5. Discuta como ficaria a análise caso fosse injetado 40 μL da amostra (**1 ponto**)
	6. Discuta como ficaria a análise caso fosse utilizado uma coluna C8, com a mesma dimensão da utilizada no experimento. (**1 ponto**)
	7. Caso o diâmetro da partícula da coluna fosse diminuído, como a eficiência cromatográfica seria afetada? Explique com base na equação de Van Deemter. (**2,5 pontos**)

**Experimento 3 - GC-Biodiesel**

*Determinação da concentração de metanol e/ou etanol em amostras de Biodiesel*

***OBS: trazer luvas e máscara para essa aula prática***

1. **Equipamento, materiais e reagentes**
* Sistema para Cromatografia gasosa Shimadzu GC 2010 e Auto injetor AOC-20i.
* Coluna: OV-1, Bonded 30 m x 0,32mm, 3,0 µm.
* Frasco do tipo Eppendorf de 2,0 mL
* Pipeta Pasteur
* Micropipeta de 10 a 1000 µL
* Béquer de 25 mL
* Padrões: metanol e etanol – grau HPLC
* Padrão Interno: *terc*-butanol - PA
* Solvente para diluição: 1-butanol - PA
* Solução estoque (mistura):1% dos padrões de metanol e 1% etanol (m/v) utilizando o 1-butanol como diluente (preparado pelos técnicos)
* Solução estoque de 0,5 % (m/v) de *terc*-butanol (padrão interno) utilizando o 1-butanol - como diluente (preparado pelos técnicos)
1. **Procedimento:**
	1. ***Condições cromatográficas:***
* Programação de temperatura da coluna: temperatura inicial de 50 ºC durante 3 min, posteriormente, aquecer com a rampa de 50ºC/min. Manter nesta temperatura durante 2 min.
* Temperatura do injetor: 160ºC
* Temperatura do detector: 225ºC
* Gás de arraste: nitrogênio
* Vazão de hidrogênio: 30 mL/min
* Vazão de nitrogênio + Make up: 10 mL/min
* Vazão de ar sintético: 300 mL/min
* Volume injeção da amostra de 0,5 µL, Split 50:1
	1. ***Preparo da Curva Analítica***

Partindo da solução estoque da **mistura de 1% de metanol e 1% etanol (m/v)**, efetuar as diluições nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,20, 0,40 e 0,60 % (m/v) em tubo tipo “Eppendorf” de 2,0 mL, conforme indicado a Tabela 1, abaixo. A cada solução diluída dos padrões (metanol e etanol), adicionar um volume constante de 200 µL da solução padrão 0,5% do padrão interno (*terc*-butanol).

**Tabela 1.** Preparar diluições para volume final de 1,00 mL de 1-butanol

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Padrão % (m/v)** | 0,05% | 0,1% | 0,2% | 0,4% | 0,5% |
| **Metanol e Etanol** | 50 µL | 100 µL | 200 µL | 400 µL | 500 µL |
| ***Terc*-butanol (PI)** | 200 µL | 200 µL | 200 µL | 200 µL | 200 µL |
| **1-butanol (diluente)** | 750 µL | 700 µL | 600 µL | 400 µL | 300 µL |
| **Volume Total** | 1000 µL | 1000 µL | 1000 µL | 1000 µL | 1000 µL |

Agitar as soluções vigorosamente. Injetar 0,5 µL cada solução padrão diluída no sistema cromatográfico (GC-FID). Identificar os picos de etanol ou metanol, *terc*-butanol e seus respectivos tempos de retenção. Obter as áreas dos picos de metanol e/ou etanol e *terc*-butanol (padrão interno). Obter as curvas analíticas (uma para o metanol e outra para o etanol).

* 1. ***Preparo da amostra de biodiesel***

Em um frasco do tipo Eppendorf de 2,0 mL, previamente tarado, pesar aproximadamente **100** µL da amostra de biodiesel, acrescentar **200** µL da solução estoque *terc*-butanol (PI) e **700** µL do diluente 1-butanol (volume total 1000 µL). (**CUIDADO PARA NÃO DEIXAR** **CAIR BIODIESEL NA BALANÇA**). Injetar 0,5 µL da amostra de biodiesel com o padrão interno no GC-FID. Fazer o procedimento em triplicata. Com o auxílio da curva analítica (padronização interna) calcule a concentração de etanol e ou metanol nas amostras.

1. **Relatório**

3.1. Apresentar, em tabelas, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas para cada replicata (apresentar também os valores de área do PI para cada concentração). (**0,5 ponto**)

3.2. Apresentar a figura da curva analítica com a equação da reta e coeficiente de correlação. Apresentar, logo abaixo dessa figura, em forma de tabela a concentração obtida de metanol e etanol da amostra na forma de média e desvio padrão (atenção para o uso correto de algarismos significativos). Apresentar os valores de área usados para o cálculo da concentração. (**3,5 pontos**)

3.3. Calcular a resolução cromatográfica e números de pratos dos analitos. (**2,0 pontos**)

3.4. Por que, em cromatografia gasosa, usa-se o modo de eluição por programação da temperatura? (**1,0 ponto**)

3.5. A escolha do padrão interno empregado nesta análise foi adequada? Explique. (**1,0 ponto**)

3.6. A concentração de etanol e ou metanol determinadas na amostra encontra-se dentro do estabelecido pela legislação. Explique. (**1,0 ponto**)

3.7. Por que determinar a presença de metanol e etanol em biodiesel? (**1,0 ponto**)

**Experimento 4 - CG-Destilados**

*Análise quantitativa de etanol e qualitativa de metanol em bebidas destiladas*

1. **Materiais, Equipamento e reagentes**
* Sistema cromatográfico Shimadzu GC 2010; Sistema AOC-20i
* Coluna OV-1 Bonded (30 m x 0,32 mm; 3,0 µm).
* 12 Balões volumétricos de 5,0 mL;
* 3 Balões volumétricos de 10,0 mL;
* 1 Balão volumétrico de 25,0 mL;
* 2 Pipetas de Pasteur;
* 1 Béquer de 50 mL;
* 13 Vials para GC;
* Micropipetas (1000 µL; 10 µL; 100 µL; 200 µL e 5000 µL);
* Padrão interno: acetonitrila grau HPLC;
* Padrão de álcool etílico absoluto (grau UV/HPLC) e metanol (grau UV/HPLC);
* Solvente diluente: Acetona 99% (v/v).
* Amostras de bebidas alcoólicas compradas no comércio local.
1. **Procedimento experimental**
	1. **Condições cromatográficas**

A programação de temperatura da coluna iniciará em 40 ºC, o qual será mantido por 4 min, seguido de uma rampa de 20 ºC/min até atingir a temperatura de 60 ºC, a qual será mantida por 2 min. Em seguida a temperatura retornará à condição inicial.

A temperatura do injetor e do detector serão 175 ºC e 225 ºC, respectivamente. O gás de arraste será o nitrogênio com vazão de 10 mL/min. A vazão de hidrogênio será de 30 mL/min, e a vazão de ar sintético de 300 mL/min. O volume de injeção será de 0,5 µL e será adotado o modo split na proporção de 75:1.

* 1. **Preparação da curva analítica para análise quantitativa de etanol**
1. Preparar uma solução mãe de etanol 1% (v/v) em um balão de 25,00 mL, utilizando acetona como solvente diluente;
2. Utilizando a solução mãe de etanol, realizar diluições nas concentrações de 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,1% e 0,5% utilizando os balões de 5,00 mL e em duplicata (n = 2);
3. Adicionar 5 µL de acetonitrila em cada balão e completar o volume com acetona;
4. Agitar vigorosamente as soluções;
5. Transferir para os respectivos vials de CG e injetar as soluções no sistema cromatográfico.
	1. **Análise qualitativa de metanol**
6. Pipetar 5 µL de metanol em um balão de 5,00 mL e completar o volume com acetona (solução de 0,1% v/v) e agitar bem;
7. Pipetar 20 µL da solução anterior e transferir para um novo balão de 5,00 mL, completando o volume com acetona (solução de 0,0004% v/v) e agite bem;
8. Transfira para o vial do CG e injetar as soluções no sistema cromatográfico (não é necessário realizar em duplicata).
	1. **Preparo da amostra desconhecida para análise de etanol (n=3)**
9. Pipetar 20 µL da bebida\* em cada um dos três balões volumétricos de 10,00 mL;
10. Pipete 10 µL de acetonitrila em cada balão e complete o balão com acetona;
11. Agite bem, transfira para os vials de CG e injete as soluções no sistema cromatográfico.
12. Com o auxílio da curva analítica (padronização interna), e levando em consideração os cálculos de diluição, calcule a concentração de etanol nas amostras.

*\* Esses volumes foram calculados para bebidas com teores de etanol de até 40%, caso a bebida escolhida tenha um teor maior refaça os cálculos para que a concentração de etanol fique dentro da faixa linear da curva analítica.*

* 1. **Preparo da amostra para análise de metanol (n = 2)**
1. Transferir a bebida diretamente para os vials do CG;
2. Injete as amostras e observe no tempo de retenção do metanol se há algum pico.
3. **Relatório**

3.1. Apresentar, em tabela, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas e replicatas. (**0,5 ponto**)

3.2. Apresentar a figura da curva analítica (por padronização interna) com a equação da reta e coeficiente de correlação. Apresentar, logo abaixo dessa figura, em forma de tabela a concentração obtida de etanol da amostra na forma de média e desvio padrão (atenção para o uso correto de algarismos significativos). Apresentar os valores de área usados para o cálculo da concentração. (**3,5 pontos**)

3.3. A concentração de etanol determinada na amostra encontra-se dentro do estabelecido pela legislação? Explique. (**0,5 ponto**)

3.4. Por que determinar a presença de metanol em bebidas alcóolicas? (**1,0 ponto**)

3.5. Qual a diferença entre o detector de ionização em chama e o espectrômetro de massas? (**1 ponto**)

3.6. Qual a diferença entre injeção split e splitless. (**1,5 pontos**)

3.7. Como a polaridade do analito influencia na escolha da fase estacionaria em CG? (**1 ponto**).

3.8. Por que usar o método de padronização interna em análises quantitativas? (**1 ponto**).

**Experimento 4 - LLE-Eletroforese Capilar (LLE-EC)**

*Determinação de resíduos de medicamentos em águas por eletroforese capilar após extração líquido-liquido*

1. **Materiais, Equipamentos e Reagentes (por grupo):**
* Equipamento para eletroforese capilar (1) (**Lab Anderson – Ver figura abaixo**);
* Capilar de sílica fundida não recoberto (75 μm di x 50 cm) (1) **(Lab-Anderson);**
* Microvials para amostra (eletroforese capilar, 17) (**Levar do Lab-Anderson para Lab didático);**
* Agitador de tubos (Vibrax) (1) (**Levar do Lab-Anderson para Lab didático– Ver figura abaixo**);
* Vials do CE para solução tampão/água/NaOH (eletroforese capilar, 6) **(Levar do Lab-Anderson para Lab didático;**
* Agitador de tubos tipo “mixer” (1);
* Tubos tipo Falcon de 15 mL (40);
* Micropipeta de 10-100 μL (1), micropipeta de 100-1000 μL (1), ponteiras para micropipetas;
* Filtro Millex de 0,45 μm (2);
* Solução padrão de mirtazapina 1 mg mL-1 (2,0 mL) (padrão interno);
* Solução padrão de venlafaxina (100 µg mL-1; 200 µg mL-1; 400 µg mL-1; 600 µg mL-1  e 1000 µg mL-1, 2,0 mL de cada);
* Hidróxido de sódio 0,1 mol L-1 (50 mL);
* Hidróxido de sódio 1 mol L-1 (5 mL);
* Solução de ácido clorídrico 1 mol L-1 (5 mL);
* Solução tris-fosfato 50 mmol L-1 pH 3,0 (50 mL);
* Água ultrapura (30 mL);
* Metanol (grau HPLC) – 5 mL;
* Acetato de etila grau HPLC (100 mL);
1. **Procedimento Experimental**
	1. **Preparo da curva analítica empregando a ELL (n = 2)**
2. Adicionar 20 μL do padrão interno mirtazapina aos tubos Falcon® de 15 mL;
3. Adicionar 40 μL de cada concentração de venlafaxina, separadamente, aos tubos Falcon® de 15 mL (*n = 2*);
4. Adicionar 500 µL de água ultrapura e 10 μL de NaOH 1 mol L-1;
5. Agitar as amostras em mixer durante 5 segundos;
6. Adicionar 1,0 mL de acetato de etila e fechar os tubos;
7. Levar os tubos ao agitador (Vibrax®) e agitar durante 15 minutos a 1000 rpm;
8. Após, centrifugar as amostras durante 5 minutos a 4000 rpm;
9. Coletar o sobrenadante (parte orgânica – 800 μL), transferir para tubos limpos do tipo Falcon® previamente identificados e em seguida evaporar o solvente até secura total com ajuda do ar comprimido ou centrífuga à vácuo (**Lab. Prof. Anderson**);
10. Solubilizar o resíduo em 100 μL de água ultrapura, transferir para os vials de “amostra” e colocar no equipamento para análise.
	1. **Preparo do branco empregando a ELL (n = 1)**
11. Pipetar 500 µL da amostra para 1 tubo de ensaio;
12. Adicionar 60 μL de metanol (para igualar o solvente do padrão interno e do padrão de venlafaxina adicionado na curva);
13. Adicionar 10 μL de NaOH 1 mol L-1;
14. Realizar a extração a partir do item d, do tópico 2.1;
	1. **Preparo das amostras desconhecidas empregando a ELL**
15. Pipetar 500 µL **da amostra** **desconhecida** para 5 tubos de ensaio;
16. Adicionar 20 μL do padrão interno em todas as amostras;
17. Adicionar 40 μL de metanol em todas as amostras (para igualar o solvente do padrão de venlafaxina adicionado na curva);
18. Adicionar 10 μL de NaOH 1 mol L-1 em 3 amostras e 10 μL de HCl 1 mol L-1 nas outras 2 amostras;
19. Realizar as extrações a partir do item d, do tópico 2.1;
20. Determinar a concentração de venlafaxina nas amostras desconhecidas baseado na equação da reta obtida na curva analítica.
	1. **Soluções empregadas na análise por EC**
21. Filtrar as soluções de NaOH 0,1 mol L-1 e solução de tris-fosfato 50 mmol L-1 utilizando os filtros millex de 0,45 μm;
22. Transferir as soluções filtradas e água ultrapura para tubos Falcon;
23. Levá-los ao ultrassom durante 5 minutos;
24. Transferir 1,8 mL de cada solução para seus respectivos vials de eletroforese capilar.
25. **Condições de análise**

Anterior as análises, realizar o pré-condicionamento do capilar da seguinte forma: lavar o capilar durante 1 minuto com NaOH 0,1 mol L-1, durante 1 minuto com água ultrapura e 2 minutos com a solução tampão de análise.

Realizar separação dos analitos empregando uma solução tris-fosfato 50 mmol L -1 pH 3,0 e capilar de sílica fundida não recoberto medindo 50 cm de comprimento efetivo e 75 μm de diâmetro interno. Aplicar uma tensão de +22 kV e temperatura de análise de 25oC. Empregar a injeção hidrodinâmica: 0,5 psi durante 5 segundos. Monitorar os analitos em 195 nm.

1. **Relatório**
	1. Apresentar, em tabela, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas e replicatas. (**0,5 ponto**)
	2. Apresentar a figura da curva analítica (por padronização interna) com a equação da reta e coeficiente de correlação. Apresentar, logo abaixo dessa figura, em forma de tabela a concentração obtida de venlafaxina na amostra na forma de média e desvio padrão (atenção para o uso correto de algarismos significativos). Apresentar os valores de área usados para o cálculo da concentração. (**3,5 pontos**)
	3. Baseado nas características físico-química dos analitos discuta porque a análise foi realizada em pH 3,0. (**1,5 ponto**).
	4. Caso a análise fosse realizada em pH 10, como ficaria a separação dos analitos? (**1 ponto**)
	5. Baseado nas características físico-química dos analitos discuta porque a extração foi realizada em pH alcalino. (**1,5 ponto**)
	6. Como a informação do Log P da molécula pode ajudar no planejamento da extração líquido-líquido? (**1 ponto**)
	7. Qual a importância do “branco” (item 2.2) nas análises? (**1 ponto**)

Nas páginas abaixo seguem algumas imagens de alguns equipamentos utilizados no experimento

**ExpERIMENTO**

**LLE-Eletroforese Capilar**

*Determinação de resíduos de medicamentos em águas por eletroforese capilar após extração liquido-liquido*

**Alguns Equipamentos**



Sistema para Eletroforese capilar

Abaixo, onde as amostras são inseridas após abrir a “porta” do equipamento (no círculo azul)



Tubo por onde passa o “coolant” (liquido que controla a temp. do capilar) e o capilar

Cassete que suporta o capilar no interior do equipamento

Janela óptica por onde incide a radiação eletromagnética

Fibra óptica que leva a informação até o espectrofotômetro

Nesses suportes são colocados os vials das amostras, NaOH, água, e solução tampão

Cassete utilizados no Sistema para Eletroforese capilar, no qual é inserido o capilar. Em destaque o *inlet, outlet, coolant* e a janela óptica.

Capilar

*Inlet*

*Outlet*

*Coolant*

Janela óptica



Sistema para agitar as amostras (Vibrax). Os tubos são suportados por essa base de acrílico. A agitação é do tipo “orbital” e você controla a rpm.