

## 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  $\mu\text{m}$ ) (**Lab Anderson**);
- Coluna de guarda C18 (4,6 x 12,5 mm) (**Lab Anderson**);
- Solução padrão interno de carbamazepina na concentração de 1000  $\text{ng mL}^{-1}$  (2,0 mL);
- Leite desnatado livre de albendazol sulfóxido (matriz);
- Soluções padrão de albendazol sulfóxido nas seguintes concentrações: 100, 500, 1000, 5000, 10000  $\text{ng mL}^{-1}$  (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  $\mu\text{L}$  (1) e de 100-1000  $\mu\text{L}$  (1) e ponteiros 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)

### 2. Procedimento Experimental

#### 2.1. *Preparo da curva analítica (em duplicata) (n=2)*

- a. Adicionar 25  $\mu\text{L}$  de cada concentração da solução padrão de albendazol sulfóxido nos tubos Falcon® de 15 mL, separadamente;
- b. Adicionar 25  $\mu\text{L}$  do padrão interno (carbamazepina) em todos os tubos Falcon®;

- c. Adicionar 1,00 mL de leite desnatado;
- d. Adicionar 1000  $\mu$ L de acetonitrila gelada;
- e. Agitar os tubos em agitador do tipo “mixer” durante 20 segundos;
- f. Centrifugar os tubos durante 15 minutos em 3000 rpm.

## **2.2. Quantificação dos analitos na amostra desconhecida de leite (triplicata) (n=3)**

- a. Adicionar 25  $\mu$ L do padrão interno (carbamazepina) aos tubos;
- b. Adicionar 25  $\mu$ L de acetonitrila;
- c. Adicionar 1,00 mL **da amostra desconhecida** de leite;
- d. Adicionar 1000  $\mu$ L de acetonitrila gelada;
- e. Agitar os tubos em agitador do tipo “mixer” durante 20 segundos;
- f. Centrifugar durante 15 minutos em 3000 rpm.

## **2.3 Avaliação dos interferentes da matriz (análise do “Branco”) (n=1)**

- a. Adicionar 1,00 mL de leite desnatado ao tubo;
- b. Adicionar 50  $\mu$ L de acetonitrila;
- c. Adicionar 1000  $\mu$ L de acetonitrila gelada;
- d. Agitar em agitador do tipo “mixer” durante 20 segundos;
- e. Centrifugar durante 15 minutos em 3000 rpm.

## **2.4 Procedimento para a extração em fase sólida**

- a. Posicionar os cartuchos C8 no *manifold* (**Ver figura abaixo**);
- b. Posicionar os tubos para coleta do eluato no *manifold*;
- c. Adicionar 1,0 mL de metanol em cada cartucho, aplicar vácuo e proceder a eluição evitando a secagem do sorvente;
- d. Adicionar 1,0 mL de água ultrapura, aplicar vácuo e proceder a eluição evitando a secagem do sorvente;
- e. 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.

- f. Adicionar 3,0 mL de hexano, aplicar vácuo e proceder a eluição até completa secagem do sorvente durante 10 min;
- g. Após esse tempo, trocar os tubos que estão abaixo dos cartuchos e colocar tubos limpos (para coleta dos analitos)
- h. Eluir a amostra com 2,0 mL de metanol, a uma vazão aproximada de 2 mL/min;
- i. Coletar o eluato e centrifugá-lo durante 10 minutos em 3000 rpm;
- j. Recuperar 1 mL do sobrenadante;
- k. Secar o extrato resultante em fluxo de ar comprimido ou em centrífuga à vácuo;
- l. Solubilizar o resíduo em 150  $\mu$ L de fase móvel para posterior injeção no HPLC.

### **3. Condições Cromatográficas (Lab Prof. Anderson-Não precisa preparar)**

Será utilizado um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência, uma coluna analítica de octadecilsilano, C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e uma coluna de guarda C18 (12,5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). 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<sup>-1</sup>. A temperatura de análise será de 40 °C e a detecção será feita em 290 nm.

### **4. Relatório:**

- 4.1. 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)**
- 4.2. 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)**

4.3. Por que é necessário a utilização de uma técnica de preparo de amostra anterior a injeção no sistema cromatográfico para amostras “complexas”? **(1 ponto)**

4.4. Na etapa de precipitação proteica qual outro método (além da precipitação com solvente) poderia ser utilizado para a precipitação das proteínas? Explique. **(2 pontos)**

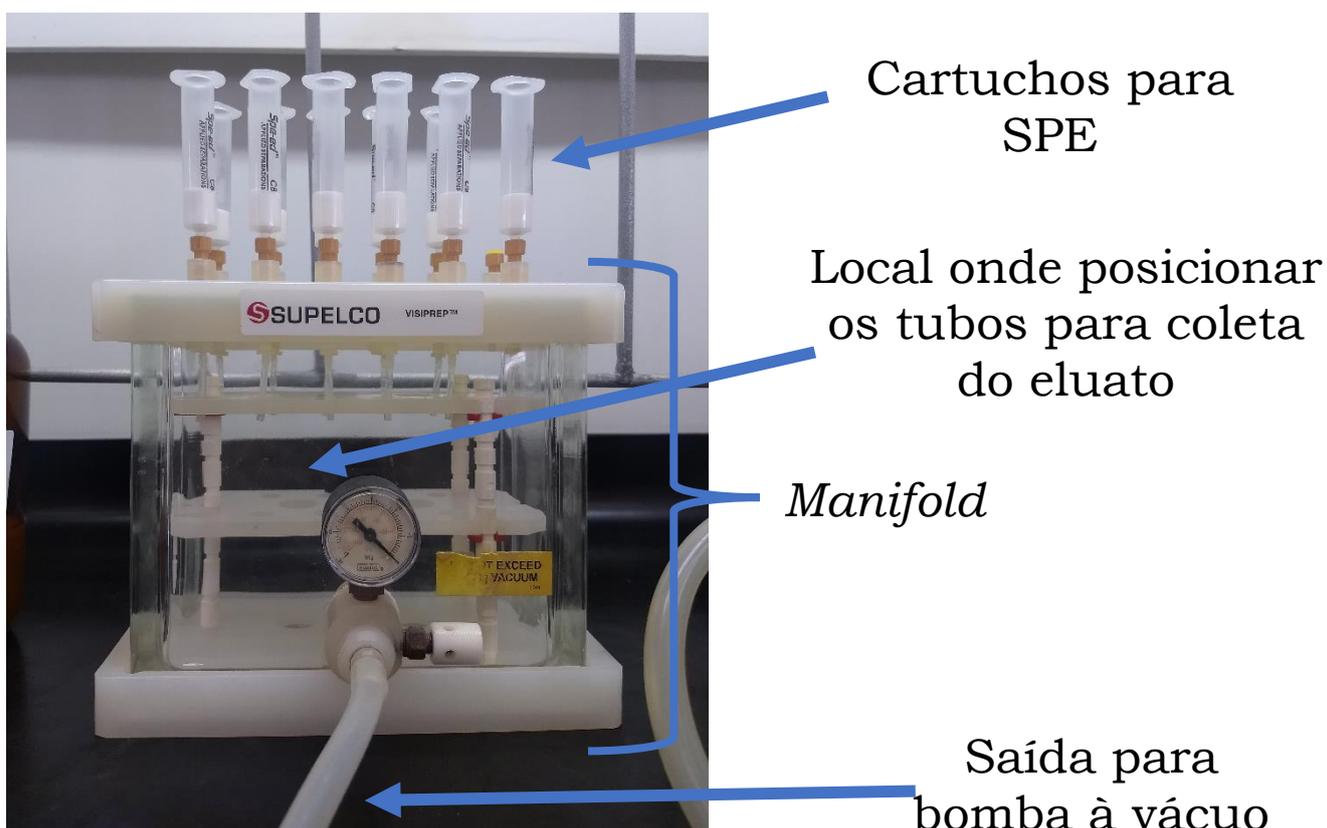
4.5. Qual a função do padrão interno (P.I) nas análises quantitativas? Quais critérios devem ser levados em consideração para escolha de um P.I? **(2 pontos)**

4.6. 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



## **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  $\mu\text{L}$
- 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  $\mu\text{m}$  di do poro
- Padrão de cafeína
- Amostras de chá
- Sistema para cromatografia líquida de alta eficiência: Detector: Arranjo de Diodo – ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).
- Injetor Rheodyne com loop (alça de amostragem) de 20  $\mu\text{L}$ .
- Coluna C18 Zorbax ODS (250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ).
- Microseringa 100  $\mu\text{L}$

### **2. Condições cromatográficas**

- Fase móvel: metanol: solução aquosa ácida pH 3,5 (70:30 v/v)
- Vazão: 1,2 mL/min
- Alça de amostragem: 20  $\mu\text{L}$
- Temperatura de análise: ambiente

### **3. Procedimento experimental**

#### **3.1. Preparo da curva analítica da cafeína (n = 2).**

Partindo da solução-padrão de cafeína na concentração  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preparar 10,00 mL das soluções-padrão diluídas nas seguintes concentrações: 0,0025, 0,005, 0,010, 0,020 e  $0,030 \mu\text{g mL}^{-1}$ . 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.

#### **3.2. 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  $80^{\circ}\text{C}$  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  $0,45 \mu\text{m}$ , 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.

### **4. Relatório**

- 4.1. Apresentar, em tabelas, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas para cada concentração e replicata. **(0,5 ponto)**
- 4.2. 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)**
- 4.3. Discuta como ficaria a análise caso a fase móvel fosse metanol: solução aquosa ácida pH 3,5 (50:50 v/v). **(1 ponto)**

- 4.4. Discuta como ficaria a análise caso a coluna tivesse a seguinte dimensão: 150 mm x 4,6 mm D.I., diâmetro da partícula 5  $\mu\text{m}$ . **(1 ponto)**
- 4.5. Discuta como ficaria a análise caso fosse injetado 40  $\mu\text{L}$  da amostra **(1 ponto)**
- 4.6. Discuta como ficaria a análise caso fosse utilizado uma coluna C8, com a mesma dimensão da utilizada no experimento. **(1 ponto)**
- 4.7. 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)

#### **2. Procedimento:**

##### **2.1. Condições cromatográficas:**

- Programação de temperatura da coluna: temperatura inicial de 50 °C durante 3 min, posteriormente, aquecer com a rampa de 50°C/min. Manter nesta temperatura durante 2 min.
- Temperatura do injetor: 160°C
- Temperatura do detector: 225°C
- 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  $\mu\text{L}$ , Split 50:1

## 2.2. 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  $\mu\text{L}$  da solução padrão 0,5% do padrão interno (*terc*-butanol).

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

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Padrão % (m/v)</b>	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%	0,5%
<b>Metanol e Etanol</b>	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
<b>Terc-butanol (PI)</b>	200 $\mu\text{L}$				
<b>1-butanol (diluyente)</b>	750 $\mu\text{L}$	700 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
<b>Volume Total</b>	1000 $\mu\text{L}$				

Agitar as soluções vigorosamente. Injetar 0,5  $\mu\text{L}$  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).

## 2.3. Preparo da amostra de biodiesel

Em um frasco do tipo Eppendorf de 2,0 mL, previamente tarado, pesar aproximadamente **100  $\mu\text{L}$**  da amostra de biodiesel, acrescentar **200  $\mu\text{L}$**  da solução estoque *terc*-butanol (PI) e **700  $\mu\text{L}$**  do diluyente 1-butanol (volume total 1000  $\mu\text{L}$ ). **(CUIDADO PARA NÃO DEIXAR CAIR BIODIESEL NA BALANÇA)**. Injetar 0,5  $\mu\text{L}$  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.

### **3. 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.

#### **2. Procedimento experimental**

##### **2.1. Condições cromatográficas**

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

A temperatura do injetor e do detector serão 175 °C e 225 °C, 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.

## **2.2. Preparação da curva analítica para análise quantitativa de etanol**

- a. Preparar uma solução mãe de etanol 1% (v/v) em um balão de 25,00 mL, utilizando acetona como solvente diluente;
- b. 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);
- c. Adicionar 5  $\mu$ L de acetonitrila em cada balão e completar o volume com acetona;
- d. Agitar vigorosamente as soluções;
- e. Transferir para os respectivos vials de CG e injetar as soluções no sistema cromatográfico.

## **2.3. Análise qualitativa de metanol**

- a. Pipetar 5  $\mu$ L de metanol em um balão de 5,00 mL e completar o volume com acetona (solução de 0,1% v/v) e agitar bem;
- b. Pipetar 20  $\mu$ L 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;
- c. Transfira para o vial do CG e injetar as soluções no sistema cromatográfico (não é necessário realizar em duplicata).

## **2.4. Preparo da amostra desconhecida para análise de etanol (n=3)**

- a. Pipetar 20  $\mu$ L da bebida\* em cada um dos três balões volumétricos de 10,00 mL;
- b. Pipete 10  $\mu$ L de acetonitrila em cada balão e complete o balão com acetona;
- c. Agite bem, transfira para os vials de CG e injete as soluções no sistema cromatográfico.
- d. 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.*

### **2.5. Preparo da amostra para análise de metanol (n = 2)**

- a. Transferir a bebida diretamente para os vials do CG;
- b. 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 alcólicas? **(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 estacionária em CG? **(1 ponto)**.

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

## **Experimento 5 - LLE-Eletroforese Capilar (LLE-EC)**

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

### **1. Materiais, Equipamentos e Reagentes (por grupo):**

- Equipamento para eletroforese capilar (1) (**Lab Anderson – Ver figura abaixo**);
- Capilar de sílica fundida não recoberto (75  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$  (1), micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$  (1), ponteiras para micropipetas;
- Filtro Millex de 0,45  $\mu\text{m}$  (2);
- Solução padrão de mirtazapina 1  $\text{mg mL}^{-1}$  (2,0 mL) (padrão interno);
- Solução padrão de venlafaxina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2,0 mL de cada);
- Hidróxido de sódio 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (50 mL);
- Hidróxido de sódio 1  $\text{mol L}^{-1}$  (5 mL);
- Solução de ácido clorídrico 1  $\text{mol L}^{-1}$  (5 mL);
- Solução tris-fosfato 50  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 3,0 (50 mL);
- Água ultrapura (30 mL);
- Metanol (grau HPLC) – 5 mL;
- Acetato de etila grau HPLC (100 mL);

## 2. Procedimento Experimental

### 2.1. Preparo da curva analítica empregando a ELL (n = 2)

- a. Adicionar 20  $\mu\text{L}$  do padrão interno mirtazapina aos tubos Falcon® de 15 mL;
- b. Adicionar 40  $\mu\text{L}$  de cada concentração de venlafaxina, separadamente, aos tubos Falcon® de 15 mL ( $n = 2$ );
- c. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>;
- d. Agitar as amostras em mixer durante 5 segundos;
- e. Adicionar 1,0 mL de acetato de etila e fechar os tubos;
- f. Levar os tubos ao agitador (Vibrax®) e agitar durante 15 minutos a 1000 rpm;
- g. Após, centrifugar as amostras durante 5 minutos a 4000 rpm;
- h. Coletar o sobrenadante (parte orgânica – 800  $\mu\text{L}$ ), 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**);
- i. Solubilizar o resíduo em 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, transferir para os vials de “amostra” e colocar no equipamento para análise.

### 2.2. Preparo do branco empregando a ELL (n = 1)

- a. Pipetar 500  $\mu\text{L}$  da amostra para 1 tubo de ensaio;
- b. Adicionar 60  $\mu\text{L}$  de metanol (para igualar o solvente do padrão interno e do padrão de venlafaxina adicionado na curva);
- c. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>;
- d. Realizar a extração a partir do item d, do tópico 2.1;

### 2.3. Preparo das amostras desconhecidas empregando a ELL

- e. Pipetar 500  $\mu\text{L}$  **da amostra desconhecida** para 5 tubos de ensaio;
- f. Adicionar 20  $\mu\text{L}$  do padrão interno em todas as amostras;
- g. Adicionar 40  $\mu\text{L}$  de metanol em todas as amostras (para igualar o solvente do padrão de venlafaxina adicionado na curva);

- h. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 mol  $\text{L}^{-1}$  em 3 amostras e 10  $\mu\text{L}$  de HCl 1 mol  $\text{L}^{-1}$  nas outras 2 amostras;
- i. Realizar as extrações a partir do item d, do tópico 2.1;
- j. Determinar a concentração de venlafaxina nas amostras desconhecidas baseado na equação da reta obtida na curva analítica.

#### **2.4. Soluções empregadas na análise por EC**

- a. Filtrar as soluções de NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e solução de tris-fosfato 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  utilizando os filtros millex de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- b. Transferir as soluções filtradas e água ultrapura para tubos Falcon;
- c. Levá-los ao ultrassom durante 5 minutos;
- d. Transferir 1,8 mL de cada solução para seus respectivos vials de eletroforese capilar.

### **3. 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  $\text{L}^{-1}$ , 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  $\text{L}^{-1}$  pH 3,0 e capilar de sílica fundida não recoberto medindo 50 cm de comprimento efetivo e 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno. Aplicar uma tensão de +22 kV e temperatura de análise de 25°C. Empregar a injeção hidrodinâmica: 0,5 psi durante 5 segundos. Monitorar os analitos em 195 nm.

### **4. Relatório**

- 4.1. Apresentar, em tabela, as concentrações usadas nas curvas com as respectivas áreas obtidas e replicatas. **(0,5 ponto)**
- 4.2. 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)**

4.3. Baseado nas características físico-química dos analitos discuta porque a análise foi realizada em pH 3,0. **(1,5 ponto)**.

4.4. Caso a análise fosse realizada em pH 10, como ficaria a separação dos analitos? **(1 ponto)**

4.5. Baseado nas características físico-química dos analitos discuta porque a extração foi realizada em pH alcalino. **(1,5 ponto)**

4.6. Como a informação do Log P da molécula pode ajudar no planejamento da extração líquido-líquido? **(1 ponto)**

4.7. 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 líquido-líquido*

#### Alguns Equipamentos



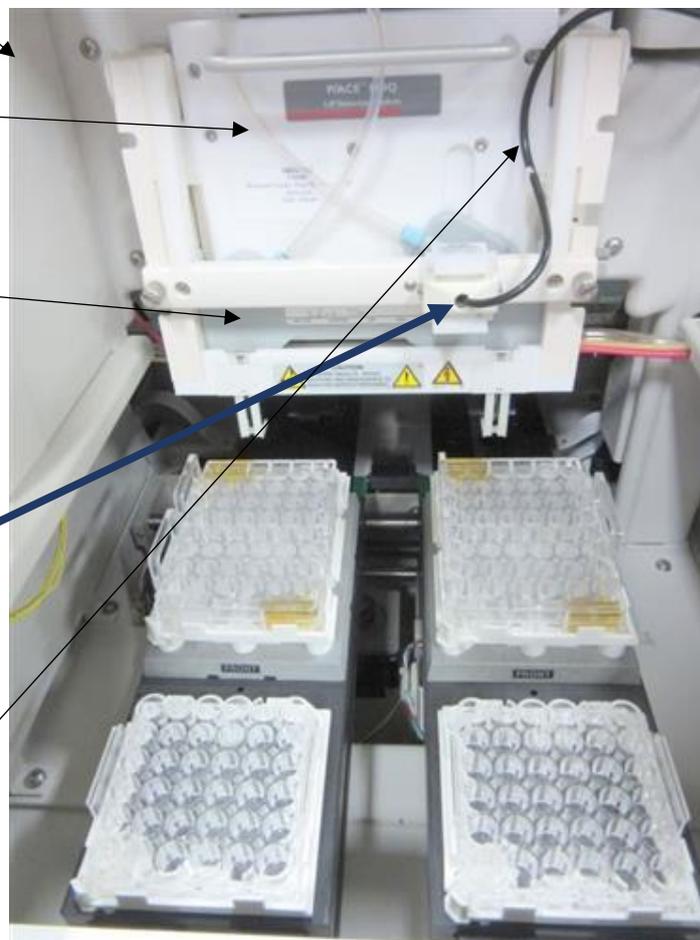
Sistema para Eletroforese capilar  
Abaixo, onde as amostras são inseridas após abrir a "porta" do equipamento (no círculo azul)

Tubo por onde passa o "coolant" (líquido que controla a temp. do capilar) e o capilar

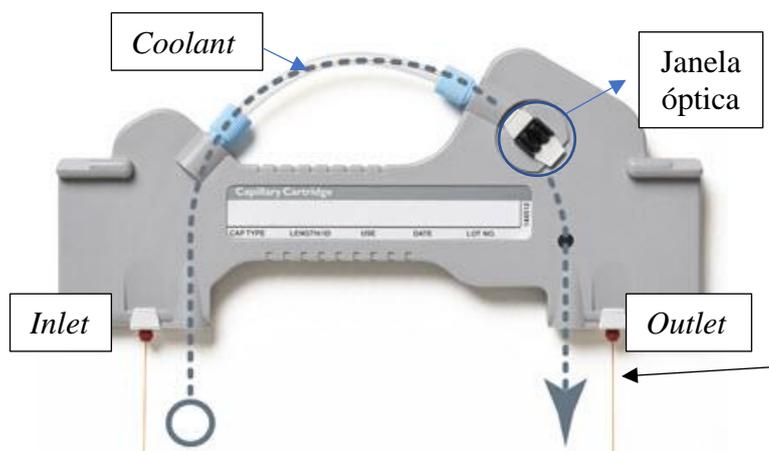
Cassete que suporta o capilar no interior do equipamento

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



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.