



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TECNOLÓGICA E AMBIENTAL
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS
E ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA



OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
PARA O PREPARO DE SUSPENSÕES E
DETERMINAÇÃO DE FULERENO $n\text{-C}_{60}$ EM
MATRIZ AQUOSA

NÍVEL MESTRADO

Marileni de Souza Sallaberry Lopes

Rio Grande – RS

Janeiro de 2011

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA O PREPARO DE SUSPENSÕES E DETERMINAÇÃO DE FULERENO $n\text{-C}_{60}$ EM MATRIZ AQUOSA

por

Marileni de Souza Sallaberry Lopes

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de pesquisa em Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), como requisito parcial para obtenção grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Fillmann

Co-Orientador: Prof.Dr. Ednei G. Primel

Rio Grande, RS, Brasil

2011

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
PARA O PREPARO DE SUSPENSÕES E DETERMINAÇÃO DE
FULERENO $n\text{-C}_{60}$ EM MATRIZ AQUOSA**

elaborada por

Marileni de Souza Sallaberry Lopes

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Fillmann (orientador)

Prof. Dr. Ednei G. Primel (co-orientador)

Prof. Dr. Márcio Milani (FURG)

Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins (UFSM)

Rio Grande, Janeiro de 2011

*Dedico esse trabalho à paciência do meu esposo;
À perseverança de minha mãe;
À luz da minha vida, minha filha Mireya;
E ao meu pai, que apesar de não participar mais
dessa vida terrena, onde ele estiver sei que ainda olha por mim.*

Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma idéia vale uma vida...

Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós
Algo de uma criança...

Enquanto houver sol
Enquanto houver sol
Ainda haverá
Enquanto houver sol
Enquanto houver sol...

Quando não houver caminho
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando
Que se faz o caminho...

Quando não houver desejo
Quando não restar nem mesmo dor
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós
Aonde Deus colocou...

Enquanto houver sol
Enquanto houver sol
Ainda haverá.....

Sérgio Britto - Titãs

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** pela oportunidade de crescimento e evolução, e por ter permitido que eu chegasse até aqui.

À minha **mãe**, meu ‘porto seguro’ que me ensinou a nunca desistir, e que com fé e força chegaríamos lá. **Mãe** a senhora estava certa...

Ao **Jefferson** pela paciência que dedicou nesses anos e pelos incansáveis dias “e noites” de babá, onde cuidou carinhosamente da nossa princesinha **Mireya**;

À minha linda e maravilhosa filha, simplesmente por ser a minha linda e maravilhosa **FILHA**;

Aos cassineiros de plantão, **Mana, Ricardo, Mário, Lú, Rogério e Bruno**, pela torcida;

Aos meus **familiares** pelo apoio e incentivo;

Ao meu orientador Prof. Dr. **Gilberto Fillmann** pela oportunidade, confiança e até pelas “*brincas*”, que foram construtivas (por incrível que pareça);

Aos dois **anjos** que Deus colocou no meu caminho, **Patrícia e Micheli**, não tem como prever o que seria sem a ajuda de vocês;

Ao pessoal do Coneco pela torcida e pela disposição de me ajudar sempre que precisei;

A **Fabiola** que todo dia de manhã deixava o “forninho” ligado para aquecer o pão nosso de cada café;

Ao pessoal do LACOM, Prof. Dr. **Ednei** pela permissão de usar o DAD, Dr. **Fábio Capiti** que me ajudou tanto no início desse trabalho, a **Débora** minha babá no DAD, e a **Sergi** pela grandiosa ajuda no trabalho e pelas dicas que contribuíram muito;

A banca de defesa Prof. Dr. **Márcio Milani** e Dr. **Manoel Martins** por atenciosamente receber esse trabalho com tão pouco tempo para avaliação;

Ao coordenador da PPGQTA Prof. Dr. **Fábio Andrei** pela disposição de me ajudar todas as vezes que precisei;

Aos **Professores** do programa PPGQTA;

A todos os **amigos** que me acompanharam nessa caminhada e torceram por mim.

RESUMO

Com o aumento da produção do fulereno C_{60} e sua aplicação comercial é previsível que este composto acabe sendo liberado no ambiente, tornando-se um contaminante. Em razão das suas características físico-químicas e sua capacidade de formar agregados ($n-C_{60}$) quando em contato com a água, o C_{60} pode se tornar um carreador de outros contaminantes (como metais e compostos orgânicos), facilitando a sua entrada nos organismos. Neste sentido, a sua toxicidade (tanto de forma isolada como em associação com outros contaminantes) vem sendo avaliada. Sendo assim, a fim de viabilizar os estudos com C_{60} , uma metodologia para preparo de suspensões aquosas foi validada, sendo quantificada por CLAE/UV-Vis. As suspensões foram preparadas sem a adição de solvente de duas formas distintas, com aquecimento (50°C) e à temperatura ambiente ($\approx 20^{\circ}\text{C}$), onde se mantiveram sob agitação constante e exposição à luz artificial por até 2 meses. A cada 15 dias a suspensão foi quantificada. Além disso, três métodos distintos de extração e pré-concentração (extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) e micro-extração dispersiva líquido-líquido (MEDLL)) foram validados e comparados quanto a sua eficiência. Coeficientes de correlação $\geq 0,99$ foram obtidos para as curvas de calibração. Os LD_M e LQ_M foram de 0,08 e 0,3 ng mL^{-1} para EFS e ELL, considerando o fator de concentração de 500 vezes, e de 0,8 e 3,0 ng mL^{-1} para a MEDLL, considerando o fator de concentração de 50 vezes, respectivamente. A precisão (intermediária e repetitividade) variou entre 0,46 e 4,03 (%RSD_{pi}) e entre 0,69 e 3,59 (%RSD_r), enquanto que a exatidão ficou entre 72,3 e 85,6% para ELL, 86,1 e 115,5% para a EFS e 87,9 e 111,4% para MEDLL. Com base nestes parâmetros relativos a análise de suspensões aquosas de C_{60} , a EFS foi considerada o método mais eficiente. O aquecimento se mostrou relevante no tamanho dos agregados, que foram significativamente maiores na suspensão sem aquecimento, porém o tempo de preparo da suspensão não influenciou na concentração final da suspensão. Portanto, recomenda-se o preparo das suspensões aquosas de C_{60} sem aquecimento por um período de agitação de 30-45 dias.

Palavras-chave: fulereno C_{60} , suspensão aquosa, ELL, EFS, MEDLL

ABSTRACT

With the increment of fullerene production and its commercial application, it is inevitable that some residues of fullerene reach the environment. Once in the water, this contaminant forms aggregates ($n\text{-C}_{60}$), which could act as carriers of other contaminants, such as metals and organic compounds, facilitating their assimilation by organisms. In this sense, its toxicity (isolated or in combination with other contaminants) is being assessed. Thus, a methodology for preparation aqueous suspensions of C_{60} has been validated and quantified by HPLC/UV-Vis. The suspensions were prepared without any organic solvent under heating ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) and room temperature ($\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) conditions, and constant agitation and light exposure for up to 2 months. The suspensions were quantified every 15 days. In addition, three distinct methods of extraction and pre-concentration (liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) and dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME)) were evaluated. Correlations above 0.99 were obtained for the calibration curves. The LD_M e LQ_M were 0.08 and 0.3 ng mL^{-1} for SPE and LLE, considering a pre-concentration of 500-fold, and 0.8 and 3.0 ng mL^{-1} for DLLME, considering a pre-concentration of 50-fold, respectively. The precision (intermediate and repeatability) ranged between 0.46 and $4.03\text{ (\%RSD}_{pi})$ and 0.69 and $3.59\text{ (\%RSD}_r)$, while accuracy varied between 72.3 and 85.6% for LLE, 86.1 and 115.5% for SPE, and 87.9 and 111.4% for DLLME. Based on the parameters, SPE was considered the most efficient method. The heating was relevant in the size of the aggregates, which were significantly larger in the procedure without heating, whereas time of preparation did not influence the final concentration of the suspensions. Therefore, the aqueous suspensions of C_{60} should be prepared without heating for a period of 30-45 days of stirring.

Keywords: fullerene C_{60} , aqueous suspensions, LLE, SPE, DLLME

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura do Fulereño (C_{60})..... | 5 |
| Figura 2: Preparo das suspensões de $n-C_{60}$ com aquecimento ($50^{\circ}C$) e sem aquecimento ($\approx 20^{\circ}C$)..... | 18 |
| Figura 3: Sistema utilizado na filtração das suspensões de $n-C_{60}$ | 19 |
| Figura 4: Sistema de extração de fase sólida (EFS) | 21 |
| Figura 5: Concentração dos extratos utilizando o fluxo de nitrogênio | 22 |
| Figura 6: Microscópio de Força Atômica | 29 |
| Figura 7: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes solventes extratores para MEDLL nas suspensões de $n-C_{60}$ ($n=3$)..... | 32 |
| Figura 8: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes solventes dispersores para MEDLL nas suspensões de $n-C_{60}$ ($n=3$) | 33 |
| Figura 9: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes volumes do solvente extrator para MEDLL nas suspensões de $n-C_{60}$ ($n=3$) | 33 |
| Figura 10: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes volumes do solvente dispersor para MEDLL nas suspensões de $n-C_{60}$ ($n=3$)..... | 34 |
| Figura 11: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes modificadores ($NaCl$ e $Mg(ClO_4)_2$) na extração das suspensões de $n-C_{60}$ | 35 |
| Figura 12: Espectro da varredura da solução analítica de 2500 ng mL^{-1} de C_{60} obtido por CLAE/DAD | 36 |
| Figura 13: Imagem da caracterização por microscopia atômica tipo varredura por sonda da suspensão de $n-C_{60}$ preparadas sem aquecimento por 60 dias de agitação (SA_60d)..... | 42 |
| Figura 14: Imagem da caracterização por microscopia atômica tipo varredura por sonda da suspensão de $n-C_{60}$ preparadas com aquecimento por 60 dias de agitação CA_60d..... | 42 |
| Figura 15: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de $n-C_{60}$ nas suspensões preparadas com aquecimento (CA) e extraídas por EFS ($n=3$). | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 16: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas com aquecimento (CA) e extraídas por ELL (n=3)..... | 45 |
| Figura 17: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e extraídas por EFS (n=3)..... | 46 |
| Figura 18: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e extraídas por ELL (n=3)..... | 47 |
| Figura 19: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas sem (SA) e com aquecimento (CA) e analisadas por EFS (n=3)..... | 48 |
| Figura 20: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas sem (SA) e com aquecimento (CA) e analisadas por ELL (n=3)..... | 49 |
| Figura 21: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e analisadas por ELL e EFS (n=3)..... | 50 |
| Figura 22: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C ₆₀ nas suspensões preparadas com aquecimento (CA) e analisadas por ELL e EFS (n=3)..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do C ₆₀ | 6 |
| Tabela 2 - Condições cromatográficas para análise do C ₆₀ por CLAE/ UV-Vis encontrados na literatura..... | 15 |
| Tabela 3 – Amostras das suspensões aquosas de <i>n</i> -C ₆₀ com (CA) e sem aquecimento (SA):..... | 18 |
| Tabela 4 – Densidade e solubilidade dos solventes em água e solubilidade do C ₆₀ nos solventes | 22 |
| Tabela 5 - Parâmetros de otimização da composição e vazão da FM..... | 24 |
| Tabela 6 – Resultados obtidos para o teste do método ELL..... | 31 |
| Tabela 7 - Resultados obtidos para a otimização do método EFS..... | 31 |
| Tabela 8 - Condições testadas para definir a composição e vazão da FM | 36 |
| Tabela 9 - Condições cromatográficas para análise das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ | 37 |
| Tabela 10 – Curvas analíticas obtidas na faixa linear de trabalho de | 37 |
| Tabela 11 – LD e LQ (instrumento) e LD _M e LQ _M (método) (ng mL ⁻¹) calculado com base em 3 curvas de calibração..... | 38 |
| Tabela 12 - Comparação de alguns resultados encontrados na literatura para a quantificação de <i>n</i> -C ₆₀ em matriz aquosa | 39 |
| Tabela 13 – Resultados dos ensaios de precisão (média ± desvio padrão) obtidos para o instrumento e os distintos métodos (n = 3) | 40 |
| Tabela 14 – Dados dos ensaios de exatidão (média ± desvio padrão) obtidos para os distintos métodos (n=3) | 41 |
| Tabela 15 – Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ preparadas com aquecimento (CA) em relação ao tempo de preparo e aos métodos de extração EFS e ELL..... | 45 |
| Tabela 16 - Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ preparadas sem aquecimento (SA) em relação ao tempo de preparo e aos métodos de extração EFS e ELL..... | 46 |
| Tabela 17 - Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ preparadas por diferentes tempos e analisadas por EFS e ELL em relação à temperatura (sem (SA) e com (CA) aquecimento) | 48 |

| | |
|---|----|
| Tabela 18 - Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de n-C ₆₀ preparadas por diferentes tempos e temperatura em relação aos métodos de extração..... | 50 |
|---|----|

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|---|----|
| Equação 1: Cálculo do % de recuperação | 20 |
| Equação 2: Cálculo do desvio padrão relativo | 20 |
| Equação 3: Cálculo do fator de retenção (k) | 24 |
| Equação 4: Cálculo do Limite de Detecção..... | 26 |
| Equação 5: Cálculo do Limite de Quantificação | 26 |
| Equação 6: Cálculo do desvio padrão..... | 27 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1 - Concentrações (ng mL^{-1}) das suspensões de C_{60} determinadas por ELL | 61 |
| Anexo 2 - Concentrações (ng mL^{-1}) das suspensões de C_{60} determinadas por EFS | 62 |
| Anexo 3 - Cromatograma da suspensão de C_{60} extraída por MEDLL e analisada por CLAE/UV-Vis..... | 63 |
| Anexo 4 - Cromatograma comparativo dos métodos de extração EFS e ELL das suspensões de C_{60} com branco e matriz analisados por CLAE/UV-Vis | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Å – angstrom
- ACN – Acetonitrila
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- As – Fator de assimetria
- $\bar{C}_{\text{experimento}}$ – Concentração obtida na análise
- $C_{\text{teórico}}$ – Concentração fortificada
- CA – Com aquecimento
- CA_60d – Com aquecimento 60 dias
- CAS – Serviço de Sumários Químicos do inglês, *Chemical Abstracts Service*
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- CLAE/DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos, o inglês *Diode Array Detection*
- CLAE/UV-Vis – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector Ultravioleta-Visível
- CONECO – Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática
- CRM – Material de Referência Certificado, do inglês *Certified Reference Material*
- CV – Coeficiente de Variação
- C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
- C₆₀ – Fulereo com 60 átomos de carbono
- *C₆₀ – Fulereo em estado alterado de energia
- C₇₀ – Fulereo com 70 átomos de carbono
- C₂₄₀ – Fulereo com 240 átomos de carbono
- C₅₄₀ – Fulereo com 540 átomos de carbono
- C₇₂₀ – Fulereo com 720 átomos de carbono
- d.i. – diâmetro interno
- DP – Desvio Padrão
- DPa – Desvio Padrão do intercepto com o eixo do y
- EAO – Espécies Ativas de Oxigênio
- EFS – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
- ELL – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- FC – Fator de Concentração
- FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel
FURG – Universidade Federal do Rio Grande
GSH – Glutathione
IC – Inclinação da curva de calibração
ICH – *International Conference on Harmonization*
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial
IPR – regra dos pentágonos isolados, do inglês *Isolated Pentagon Rule*
ISO – *International Standard Organization*
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
 k – Fator de retenção
 K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água
LD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
 LD_M – Limite de Detecção do método
 $LD_{M(EFS)}$ – Limite de Detecção do método ou técnica de Extração em Fase Sólida
 $LD_{M(ELL)}$ – Limite de Detecção do método ou técnica de Extração Líquido-Líquido
LQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
 LQ_M – Limite de Quantificação do método
 $LQ_{M(EFS)}$ – Limite de Quantificação do método ou técnica de Extração em Fase Sólida
 $LQ_{M(ELL)}$ – Limite de Quantificação do método ou técnica de Extração Líquido-Líquido
mm - milímetro
MEDLL – Micro Extração Dispersiva Líquido-Líquido, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*
min – minuto
mL – mililitros
MVS – Microscópio de Varredura por Sonda
N – Número de pratos teórico
 n – número de medições de réplicas
(n -C₆₀) – Agregados de C₆₀
NI – Não Informado
nm – nanômetros
NP – Fase Normal, do inglês *Normal Phase*
pH – potencial Hidrogeniônico
PVP – Polivinilpirrolidona
R % – Percentual de Recuperação
 r – Coeficiente de correlação

RP – Fase Reversa, do inglês *Reversed Phase*

rpm – rotações por minuto

Rs – Resolução

RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

%RSD_{pi} – Percentual do Desvio Padrão Relativo aplicado à precisão intermediária

%RSD_r – Percentual do Desvio Padrão Relativo aplicado à precisão em termos de repetitividade

s – Estimativa do desvio padrão

SA – Sem Aquecimento

SA_60d – Sem Aquecimento 60 dias

THF – Tetrahidrofurano

t_R – Tempo de Retenção

t_M – Tempo retenção do analito não retido

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

X_i – Valor individual de uma medição

X_{média} – Média aritmética do número de medições

μL – microlitros

μm – micrometros

λ – comprimento de onda

% v/v – percentual volume por volume

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| AGRADECIMENTOS | vi |
| RESUMO..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| LISTA DE EQUAÇÕES | xv |
| LISTA DE ANEXOS | xvi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xvii |
| SUMÁRIO..... | xx |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 Geral | 4 |
| 2.2 Específicos..... | 4 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 O fulereno C ₆₀ | 5 |
| 3.2 Relevância ambiental e toxicológica | 8 |
| 3.3 C ₆₀ em matriz aquosa..... | 9 |
| 3.3.1 Extração líquido-líquido..... | 10 |
| 3.3.2 Extração em fase sólida..... | 11 |
| 3.3.3 Microextração dispersiva líquido-líquido | 13 |
| 3.4 Análise cromatográfica do C ₆₀ | 14 |
| 3.5 Validação do método..... | 15 |
| 4. METODOLOGIA..... | 16 |
| 4.1 Reagentes..... | 16 |
| 4.2 Limpeza Vidraria | 16 |
| 4.3 Descarte Resíduos..... | 17 |
| 4.4 Suspensões aquosas de n-C ₆₀ | 17 |
| 4.5 Soluções de trabalho..... | 19 |
| 4.6 Teste e otimização das metodologias de extração..... | 20 |
| 4.6.1 Método ELL..... | 20 |
| 4.6.2 Método EFS | 20 |
| 4.6.3 Método MEDLL | 21 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.7 | Otimização do sistema cromatográfico | 23 |
| 4.8 | Sistema cromatográfico para o C ₆₀ | 24 |
| 4.9 | Validação dos métodos | 25 |
| 4.9.1 | Curva analítica e linearidade | 25 |
| 4.9.2 | Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)..... | 26 |
| 4.9.3 | Precisão | 27 |
| 4.9.4 | Exatidão | 28 |
| 4.10 | Análise das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ | 29 |
| 4.11 | Caracterização das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ | 29 |
| 4.12 | Análise estatística | 30 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 | Otimização das metodologias de extração..... | 30 |
| 5.1.1 | Método ELL..... | 30 |
| 5.1.2 | Método EFS | 31 |
| 5.1.3 | Método MEDLL | 32 |
| 5.2 | Otimização do sistema cromatográfico | 35 |
| 5.3 | Validação dos métodos | 37 |
| 5.3.1 | Curva analítica e linearidade | 37 |
| 5.3.2 | LD e LQ..... | 38 |
| 5.3.3 | Precisão | 40 |
| 5.3.4 | Exatidão | 41 |
| 5.4 | Caracterização físicas das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ | 41 |
| 5.5 | Análise das suspensões de <i>n</i> -C ₆₀ | 43 |
| 5.5.1 | Efeito do tempo, temperatura e método analítico..... | 44 |
| 5.6 | Integração dos parâmetros avaliados | 51 |
| 6. | CONCLUSÕES | 53 |
| 7. | RECOMENDAÇÕES FUTURAS | 53 |
| | REFERÊNCIAS..... | 55 |
| | ANEXOS | 60 |

1. INTRODUÇÃO

As necessidades e tendências que impulsionaram tecnologicamente a humanidade sempre foram prioridades para o estudo científico e para o desenvolvimento de novas pesquisas. Foi por conta dessas tendências que surgiu a nanotecnologia, definida como uma tecnologia que utiliza substâncias com dimensões que variam entre 1 e 100 nm, os chamados nanocompostos. Estes compostos são provenientes da manipulação de átomos e moléculas, formando novos materiais e ferramentas para serem utilizados no desenvolvimento de produtos e bens de consumo em geral (Owen & Depledge, 2005).

O objetivo da nanotecnologia é criar novos materiais, sistemas e estruturas com significativa melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas no decorrer do processamento do composto e manufatura dos produtos, almejando o controle operacional em nível atômico, molecular e supramolecular (Moore, 2006). Tudo isso visando conferir amplos benefícios ao ambiente, pois a idéia é oferecer uma grande eficiência em tamanho minúsculo, o que seria em tese, economia de tempo, dinheiro e matéria prima (Owen & Depledge, 2005). Entretanto, na prática talvez seja um pouco diferente, pois existem evidências que a utilização de materiais na escala nano pode desenvolver características diferentes das existentes nos materiais usados em escala normal, podendo desencadear efeitos ainda desconhecidos (Colvin, 2003). Dentre as várias diferenças observadas entre as escalas, duas se destacam merecendo uma melhor atenção: a proporção superfície/volume do composto e a sua reatividade química (Valcarcel *et al.*, 2008).

Devido às evidências constatadas a respeito das mudanças das características dos nanocompostos, a preocupação a cerca da contaminação ambiental por parte destes vem ganhando dimensão, uma vez que os compostos antes considerados como descobertas importantes e inofensivas, hoje podem se mostrar prejudiciais ao ambiente, podendo apresentar propriedades persistentes. Com certeza esses novos compostos proporcionam a criação de produtos e serviços de amplo benefício social e econômico, mas ainda existe uma escassez de informação em relação aos efeitos causados ao ambiente e à saúde humana (Chen & Elimelech, 2006).

Dentre os diversos compostos atualmente utilizados na nanociência, o fulereno C_{60} se destaca devido suas inúmeras aplicabilidades. É um alótropo do

carbono, formado por 60 átomos com estrutura esférica semelhante a uma bola de futebol. Foi descoberto em 1985 pelos cientistas Kroto Curl e Smalley, fato este que, onze anos mais tarde, lhes rendeu o prêmio Nobel de química (Rocha-Filho, 1996). Desde então, devido as suas interessantes propriedades foto-físicas, eletroquímicas e químicas (Rocha-Filho, 1996; Colvin, 2003; Faria, 2004), o C_{60} vem sendo muito utilizado nas mais diversas áreas, como equipamentos eletrônicos, farmacologia, medicina, dentre tantas outras (Colvin, 2003). A sua vasta aplicação rendeu um aumento no seu consumo, passando de aproximadamente 10 ton/ano em 2007 (Fortner *et al.*, 2005) para mais de 40 ton/ano em 2010 (Paschoalino *et al.*, 2010). Essa crescente demanda pela indústria tecnológica tem preocupado a ciência, já que este é um potencial contaminante e seu comportamento no ambiente ainda é desconhecido (Chen & Elimelech, 2006).

O C_{60} dispõe de uma estrutura que oferece possibilidades de diferentes reações, tornando-o quimicamente atrativo. É um composto hidrofóbico que forma agregados em contato com a água, podendo oferecer perigo ao ambiente pela sua capacidade de se unir a outros contaminantes e facilitar, graças a sua lipofilicidade, a sua entrada nos organismos (Fortner *et al.*, 2005). Estudos recentes indicam a toxicidade do C_{60} em micróbios, peixes e células humanas (Sayes *et al.*, 2004; Sayes *et al.*, 2005). Outras duas características reativas do C_{60} causam preocupação em relação aos danos que possam oferecer aos ecossistemas. Uma é sua foto-sensibilidade, que proporciona um estado alterado de energia quando a molécula de C_{60} é exposta à luz UV, podendo causar danos oxidativos às células (Arbogast *et al.*, 1991). A outra está relacionada à nuvem eletrônica ocasionada pelos elétrons deslocalizados presentes na molécula, o que garante uma eletroafinidade consideravelmente alta, propiciando a formação de radicais livres (Sayes *et al.*, 2004).

Desde a sua descoberta, ocorreram muitos avanços em técnicas analíticas, permitindo a manipulação e a análise do C_{60} a nível industrial. Porém, há uma clara defasagem em relação aos estudos de impacto ambiental decorrente do seu uso. Existe uma carência de metodologias que permitam monitorar o seu comportamento no ambiente e os possíveis problemas decorrentes da exposição no ambiente (Chen *et al.*, 2008). Um grande obstáculo encontrado para determinação dos riscos ambientais e ecotoxicológicos gerados pelo C_{60} é conseguir reproduzir em laboratório as condições em que o composto

seria encontrado no ambiente (Hasselov *et al.*, 2008). Até recentemente, a maior parte das metodologias de preparo da suspensão aquosa de C_{60} utilizava solventes orgânicos como co-solubilizantes (Murthy *et al.*, 2010). Porém, foi constatado que nanopartículas de C_{60} contém espaços vazios entre si, os quais podem propiciar o aprisionamento de solventes (Chen & Elimelech, 2006), podendo assim relacionar os efeitos toxicológicos do C_{60} com os resíduos de solvente aprisionados nos agregados e não somente ao C_{60} (Lyon *et al.*, 2006). Portanto, para fins de pesquisa ambiental e toxicológica, o C_{60} deve ser solubilizado em água sem a interferência de solventes orgânicos. Esta é a forma mais representativa das reais circunstâncias encontradas no ambiente e a mais adequada para julgar os efeitos associados somente ao C_{60} , evitando os possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos associados aos solventes orgânicos (Oberdorster *et al.*, 2006).

Mesmo sabendo das propriedades físico-químicas do C_{60} e as suas possíveis interações com o ambiente, a formação de agregados em contato com a água é indiscutivelmente a maior preocupação apontada nas pesquisas científicas (Chen & Elimelech, 2006). O tamanho da partícula pode ser o fator direto da patologia, toxicidade e biodegradabilidade, ocasionando uma consequência de extrema relevância biológica (Moore, 2006). Sendo assim, analisaram-se os poucos dados encontrados na literatura a respeito dos estudos ambientais do C_{60} e sua crescente demanda no mercado tecnológico, observando-se então uma nítida necessidade quanto à otimização de um método para solubilizar o C_{60} em água pura e também quanto à otimização e validação de um método analítico adequado para medir a concentração dessa suspensão, visando contribuir para futuras pesquisas ambientais e toxicológicas acerca desse composto.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Otimizar e validar uma metodologia para preparo da suspensão e análise do nanocomposto fulereno C_{60} em matriz aquosa usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (CLAE/UV-Vis).

2.2 Específicos

I. Otimizar diferentes metodologias de extração e pré-concentração (extração líquido-líquido, extração em fase sólida, micro extração dispersiva líquido-líquido) das suspensões aquosas de C_{60} ;

II. Selecionar, com base nas figuras de mérito: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (ensaios de recuperação), qual das metodologias otimizadas apresenta o melhor desempenho analítico;

III. Otimizar e validar a metodologia instrumental utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis (CLAE/UV-Vis);

IV. Determinar se o tempo de preparo e a temperatura influenciam na concentração final da suspensão aquosa e na formação dos agregados ($n-C_{60}$).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O fulereno C_{60}

A simetria com que os átomos de carbono se arranjam na molécula de fulereno forma figuras geométricas regulares caracterizadas pela combinação de hexágonos e pentágonos. É também chamado de gaiola ou “cluster” de carbono, denominação devida a molécula apresentar forma semelhante a uma esfera oca. O fulereno mais conhecido é o C_{60} (CAS N° 99685-96-8), formado por 60 átomos de carbono e com estrutura poliédrica de 32 faces (20 hexagonais e 12 pentagonais), assemelhando-se a uma bola de futebol (Figura 1) (Rocha-Filho, 1996). Porém, também existem outros fulerenos, como o C_{70} que, juntamente com o C_{60} , corresponde aos fulerenos leves e o C_{240} , C_{540} e o C_{720} que corresponde aos fulerenos pesados (Baena *et al.*, 2002).

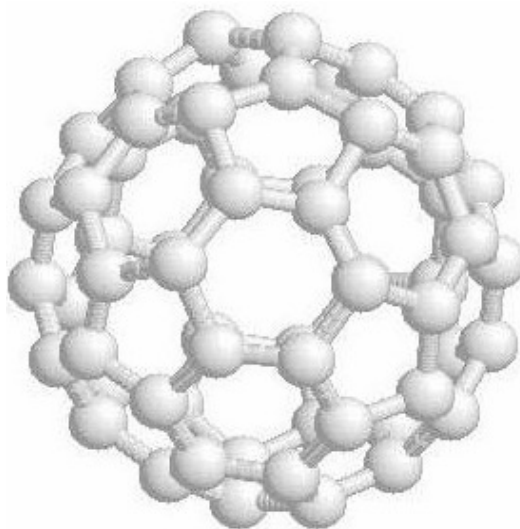


Figura 1: Estrutura do Fulereno (C_{60}).

Fonte: (Souza, 2006)

A descoberta do C_{60} não foi intencional, já que os cientistas pesquisavam a origem das cadeias carbônicas longas presentes no meio interestelar. Para tanto, utilizaram a técnica de vaporização por laser, que consiste na vaporização de carbono a altas temperaturas numa atmosfera de gás inerte (hélio) (Kroto *et al.*, 1985). Desde então, o C_{60} vem sendo produzido industrialmente desta forma, ou através da utilização de arcos voltaicos usando como matéria prima eletrodos de grafite (Rocha-Filho, 1996).

O C_{60} é considerado o “carro chefe” da nanotecnologia, pois suas propriedades físico-químicas (Tabela 1) o tornam único, podendo ser aplicado nas mais diversas áreas da ciência. Por exemplo, a característica de eletroafinidade permite o uso do C_{60} nas áreas de farmacologia, química, bioquímica e médica (Colvin, 2003); a característica de fotoreatividade tem aplicação na biomedicina (Arbogast *et al.*, 1991; Bosi *et al.*, 2003) e a característica de condutividade nos eletrônicos (Amador, 2006).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do C_{60}

| Parâmetro | | Referência |
|-----------------------------|--|------------|
| Massa Molecular | 720,66 g mol ⁻¹ | 1 |
| Massa Específica | 1,72 g cm ⁻³ | 2 |
| Ponto de Ebulição | Sublima a 800 K | 3 |
| Pressão de Vapor | 5 x 10 ⁻⁶ mm Hg (temperatura ambiente) | 4 |
| Diâmetro Médio da Esfera | < 1 nm | 5 |
| K_{ow} | 6,67 | 6 |
| Solubilidade em Água (25°C) | 1,3 x 10 ⁻¹³ µg L ⁻¹ | 7 |

1 - disponível em <<http://webbook.nist.gov>> Acesso em 23/05/2009;

2,3,4,5 - disponível em <<http://sesres.com>> Acesso em 02/03/2009;

6 – Jafvert & Kulkarni (2008);

7 - Heymann (1996).

A estrutura esférica da molécula é sem dúvida um fator de influência na sua reatividade devido ao arranjo piramizado dos átomos de carbono (Filho & Fagan, 2007). Além da curvatura da molécula, ocasionada pelos pentágonos, sua conseqüente forma tridimensional favorece muito as reações do tipo adição nucleofílicas e via radicais, cicloadições, hidrogenações, reduções, oxidações e formação de complexos com metais alcalinos, tornando o composto muito rico quimicamente (Kroto *et al.*, 1985; Vollhardt & Peter, 2004; Santos *et al.*, 2010) Essa estrutura esférica também chama a atenção dos pesquisadores pois outras substâncias menores podem penetrar nela e, isso acontecendo, o composto pode servir de veículo transportador para diversas finalidades (Amador, 2006). Em ambientes com altas energias, as moléculas se excitam e colidem permitindo abrir uma brecha na nuvem de elétrons livres do composto, possibilitando que outro composto entre na cavidade de sua estrutura. Uma vez dentro da molécula, esse composto precisa uma forte energia para romper a resistência eletrônica e

poder sair. É possível que uma vez dentro da molécula de C_{60} nenhum composto consiga mais sair. Sabe-se que isso ocorre facilmente com metais, pois há uma forte afinidade destes com o C_{60} . Quando ocorre esse encapsulamento do metal pelo composto, há formação de sais chamados de *bucketos* com ótimas características de condutividade (Amador, 2006).

A disposição eletrônica do C_{60} faz com que ele tenha uma eletroafinidade muito alta (Xie *et al.*, 1992; Guldi & Prato, 2000), que se dá devido ao caráter aromático atribuído ao composto. Isso acontece pois o carbono tem quatro elétrons na camada de valência, totalizando 240 elétrons, sendo que 180 formam ligações entre os átomos de carbono e os 60 elétrons restantes ficam deslocalizados no sistema molecular do C_{60} (Sayes *et al.*, 2004). Duas propriedades estruturais do C_{60} merecem uma melhor atenção. A primeira é que todos os 12 pentágonos são isolados pelos hexágonos. Isso mostra que o composto obedece à regra dos pentágonos isolados (*Isolated Pentagon Rule* - IPR). Em outras palavras, os pentágonos não se ligam entre si, garantindo à estrutura certa estabilidade química. A segunda propriedade é que as ligações entre os átomos de carbono apresentam dois comprimentos diferentes. As ligações (C_6-C_6) entre dois hexágonos (duplas ligações) são menores que as ligações (C_6-C_5) entre um hexágono e um pentágono. Isso mostra uma menor energia, favorecendo nesse ponto uma maior capacidade reativa (Hirsch, 1994).

A fotoreatividade é outro ponto de interesse pelos cientistas na molécula de C_{60} . Quando exposto a luz UV, o composto excita-se formando um estado triplete ($^*C_{60}$) com uma meia vida de alguns segundos, podendo transferir sua energia extra para outras moléculas. Quando transferido para uma molécula de O_2 , por exemplo, gera as chamadas Espécies Ativas de Oxigênio (EAO), que são extremamente tóxicas para os tecidos vivos (Arbogast *et al.*, 1991; Bosi *et al.*, 2003; Sayes *et al.*, 2004). Ainda nesse estado alterado de energia, o composto forma um sistema de membrana aberta muito suscetível a reações com outros compostos de carbono, podendo formar compostos não voláteis e insolúveis como produto dessa reação (Chibante *et al.*, 1993). Em muitos casos a estrutura do C_{60} pode acelerar a separação de cargas por fotoindução e retardar a recombinação destas cargas no escuro (Imahori & Sakata, 1997; Pedroso, 2007). Como consequência pode ser gerado estados de transição onde ocorre a separação das cargas com uma meia vida longa, possibilitando assim seu uso em processos de conversão de energia.

A característica que chama mais a atenção dos pesquisadores é a hidrofobicidade do C_{60} . Devido à estrutura, composição química e caráter apolar da molécula, o C_{60} apresenta baixíssima solubilidade em água, aproximadamente $1,3 \times 10^{-13} \mu\text{g L}^{-1}$ a 25°C (Heymann, 1996) e uma alta afinidade lipofílica. A lipofilicidade do composto é facilmente explicada, pois os lipídios são biomoléculas orgânicas formadas principalmente por carbonos, e isso já seria o suficiente para responder pela fácil interação entre C_{60} e lipídios. A hidrofobicidade do composto se explica com a sua repulsão pela água devido às diferenças químicas. Mas o que ocorre realmente é uma reação formando uma nova ligação por transferência de elétrons do sistema π do C_{60} , com um par de elétrons do oxigênio da molécula de água, criando uma espécie de “membrana hidratada”. Sucessivas reações entre um par de elétrons do oxigênio de cada molécula de água e o sistema π de cada átomo de carbono do C_{60} vão ocorrendo, formando agregados em forma de colóides, chamados de $n\text{-}C_{60}$ (Andrievsky *et al.*, 1995; Andrievsky *et al.*, 1999). Um número de 20 a 24 moléculas de água podem hidrolisar uma molécula de C_{60} . A magnitude dessa reação poderá depender de outros fatores como pH, constituintes iônicos e a presença de outros compostos capazes de partilhar elétrons ou oxidar o C_{60} (Brant *et al.*, 2005).

3.2 Relevância ambiental e toxicológica

O mercado de bens de consumo é incrementado, a cada dia mais, por produtos com a participação do C_{60} . Esse crescente consumo tem preocupado alguns cientistas, visto que ainda é desconhecida a maneira como este composto se comporta no ambiente. O que se pode dizer é que suas características físico-químicas levam a pensar em riscos ambientais. Com a maior utilização do C_{60} na indústria e sua aplicação em larga escala é previsível que ele passe a ser um contaminante freqüentemente liberado direta ou indiretamente para o ambiente (Fortner *et al.*, 2005). O sistema aquático seria o provável destino final do C_{60} , uma vez que recebe aportes de diferentes fontes como águas residuárias, drenagens superficiais, etc. Independentemente da sua utilização inicial (forma natural a granel, dissolvido em solventes orgânicos, etc.), devido à prolongada mistura que ocorre naturalmente durante o transporte pelo sistema, é provável que o C_{60} acabe formando agregados ($n\text{-}C_{60}$) (Chen & Elimelech, 2006). E, tendo esse composto um alto K_{ow} (6,67), sua preferência pelo particionamento em

sedimentos é esperada, assim como seu potencial de bioconcentração em organismos (Jafvert & Kulkarni, 2008).

Existe a preocupação de que, uma vez no ambiente, os agregados *n*-C₆₀ sejam disponibilizados e, conseqüentemente, assimilados pelos organismos acarretando efeitos deletérios. Há evidências de que o C₆₀ pode ser o causador de estresse oxidativo nos organismos. Sua toxicidade está relacionada com sua lipofilicidade, pois essa afinidade do composto mesmo na forma de colóides pode ter como caminho preferencial o cérebro (Oberdorster *et al.*, 2006). Trabalhos como o de Sayes *et al.* (2005) indicam claramente que a citotoxicidade do C₆₀ se dá por peroxidação lipídica em nível celular. Em estudos relativos à exposição do C₆₀ foi verificado seu potencial tóxico, sendo constatadas alterações nos parâmetros reprodutivos do crustáceo *Daphnia magna* e também nos níveis do antioxidante glutathione (GSH) em brânquias de peixes, indicando sua capacidade de gerar estresse oxidativo (Oberdorster *et al.*, 2006). A exposição de peixes por 48 horas em uma suspensão aquosa com concentração de 0,5 mg L⁻¹ de C₆₀ mostrou a inibição do metabolismo de ácidos graxos, aumentando o dano por estresse oxidativo (Oberdorster, 2004; Oberdorster *et al.*, 2006). Também há pesquisas relacionando a capacidade fotoreativa do C₆₀ às conseqüências toxicológicas causadas nos organismos vivos. Em experimentos com culturas de tecidos humanos e colóides *n*-C₆₀ foi encontrado uma toxicidade relativamente alta. Os cientistas acreditaram que o dano oxidativo produzido nas membranas celulares ocorreu a partir de radicais superóxidos produzidos por esses colóides (Oberdorster *et al.*, 2006).

3.3 C₆₀ em matriz aquosa

Para a maioria dos autores solubilizar o C₆₀ sem a utilização de solventes orgânicos é uma tarefa difícil, levando em conta a baixa solubilidade do composto em água [1,3 x 10⁻¹³ µg L⁻¹ (Heymann, 1996)]. Por isso, muitas das metodologias científicas que se tem conhecimento apresentavam solventes orgânicos no preparo da suspensão. Como por exemplo, o uso de tetrahidrofurano (THF) na solubilização do composto (Deguchi *et al.*, 2001; Fortner *et al.*, 2005), tolueno e ultra-som (Andrievsky *et al.*, 1995) e polivinilpirrolidona (PVP) em presença de clorofórmio e tolueno (Yamakoshi *et al.*, 1994). Já para preparar o C₆₀ em água pura, não são encontradas tantas metodologias científicas disponíveis. O método mais utilizado consiste na solubilização do C₆₀ em água ultra pura sob agitação constante durante dois

meses (Oberdorster *et al.*, 2006) e também há a metodologia onde o C₆₀ foi solubilizado igualmente em água ultra pura, sob agitação constante por 2 a 4 semanas a uma temperatura de 40 °C (Lyon *et al.*, 2006).

Para determinar a concentração da suspensão aquosa de *n*-C₆₀ é necessário primeiro extrair o analito da matriz. A literatura nos mostra dois tipos de metodologias utilizadas, a extração líquido-líquido (ELL) (Deguchi *et al.*, 2001; Fortner *et al.*, 2005; Lyon *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2006; Bouchard & Ma, 2008) e a extração em fase sólida (EFS) (Bouchard & Ma, 2008; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010), as quais foram testadas nesse trabalho e comparadas com uma terceira técnica de extração, a microextração dispersiva líquido-líquido (MEDLL), a qual é inédita para aplicação neste analito. Portanto, ainda não existe metodologia validada utilizando MEDLL.

3.3.1 Extração líquido-líquido

Extração líquido-líquido (ELL), ou “*Liquid-liquid extraction*” (LLE) como é conhecida em inglês, é uma técnica considerada clássica na preparação de amostras. Tem sido muito utilizada em diversas análises devido sua simplicidade e sua versatilidade no uso de solventes. Essa metodologia consiste na migração do soluto entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) e a sua eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, pois como já diz o nome, é o solvente que vai extrair o soluto da solução. Sendo assim, o soluto tem que ser totalmente solúvel no solvente e não pode haver miscibilidade entre as fases, porque se houver fica difícil de extrair o soluto, podendo assim mascarar os resultados (Queiroz *et al.*, 2001).

Apesar da técnica de ELL ainda ser muito utilizada, apresenta algumas limitações quando comparadas com outras técnicas mais atuais, como envolver a manipulação do analito várias vezes, ou seja, são necessárias no mínimo duas ou mais extrações para uma boa recuperação do analito. Isso corresponde a um consumo de solvente maior e um tempo de análise maior também. Outro fator limitante da técnica é que a ELL não permite automatização. As amostras são extraídas uma por vez, dificultando o trabalho principalmente para um grande número de amostras (Lanças, 2004).

Na literatura, o método de ELL é o mais citado para a extração do *n*-C₆₀ de suspensões aquosas. Xia *et al.* (2006) extraiu 2 mL de amostra com 4,5 mL de tolueno e depois separou as fases por centrifugação. O extrato foi evaporado sob fluxo de N₂ até a secura e após ressuspensão em 200 µL de

tolueno e sonificado por 5 min para posterior análise por CLAE/UV-Vis. O autor relata a dificuldade da extração de partículas $n\text{-C}_{60}$ da fase aquosa, salienta ainda a importância de desestabilizar as partículas na fase aquosa com um potente oxidante como o perclorato de magnésio $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ com concentração superior a 10 mmol L^{-1} e um eletrólito como o cloreto de potássio (KCl) para ajudar na extração do solvente. Deguchi *et al.* (2001) procedeu a extração de 1 mL de dispersão aquosa de $n\text{-C}_{60}$ com 2 mL de tolueno e 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) 2 %. A mistura foi sonificada por vários minutos e mantida no escuro para a separação das fases. Fortner *et al.* (2005) misturou 1 volume de suspensão aquosa de $n\text{-C}_{60}$ a 2/5 volumes de $\text{Mg}(\text{Cl}_4\text{O})_2$ a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e extraiu com 1 volume de tolueno. Depois de levado ao freezer para a separação das fases, o extrato foi coletado e analisado por CLAE UV-Vis. Lyon *et al.* (2006) extraiu 2mL da suspensão de $n\text{-C}_{60}$ com 2 mL de tolueno e 1mL de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ a uma concentração de 100 mmol L^{-1} . Bouchard & Ma (2008) adicionou $100 \mu\text{L}$ de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mol L^{-1} e 1 mL de tolueno a 1 mL de suspensão de $n\text{-C}_{60}$. Após agitação da mistura e descanso para a separação das fases, foi retirada uma alíquota. Este procedimento foi repetido por 3 vezes e analisado por CLAE/UV-Vis. Oberdorster *et al.* (2006) misturou 2 volumes do oxidante $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 1 volume de amostra, agitou vigorosamente e adicionou 1 volume de tolueno. A mistura foi centrifugada para separar as fases e o extrato coletado e analisado por CLAE UV-Vis.

3.3.2 Extração em fase sólida

A extração de fase sólida (EFS), também conhecida pela nomenclatura em inglês de “*Solid Phase Extraction*” (SPE), é uma técnica de extração que consiste na passagem da amostra (analito) por um sólido adsorvente (fase sólida ou sorvente) que se encontra imobilizado num cartucho, sendo capaz de reter (sorver) o analito de interesse. Os princípios de extração da EFS e ELL são semelhantes, ambos envolvem a partição do analito de interesse entre duas fases imiscíveis. Após a etapa inicial de sorção, o analito é extraído (eluído) por um solvente orgânico que possua maior afinidade pelo analito do que a fase sólida. Os mecanismos de retenção e eluição dos analitos da fase sólida ocorrem através das forças intermoleculares que interagem entre o analito e a superfície da fase sólida (Faria, 2004).

A escolha do sorvente na EFS depende da natureza química da matriz e dos analitos de interesse, da concentração e massa molecular dos

analitos, da presença de interferentes e impurezas (Lanças, 2004). Ainda, segundo este autor, os analitos são divididos em solúveis em solventes orgânicos e solúveis em água, e a partir dessa divisão, de acordo com as características químicas de cada um, é escolhida uma fase sólida de adsorção. As mais comuns utilizadas são a “fase normal” (NP – *normal phase*), onde a fase sólida é normalmente mais polar que o solvente; e a “fase reversa” (RP – *reversed phase*), onde o solvente é mais polar que a fase sólida. A escolha do tipo de cartucho a ser empregado na extração considera o volume e a massa da fase estacionária e depende de vários fatores, entre os quais o volume da amostra a ser extraída, a massa do composto de interesse presente na amostra, os interferentes (grau de contaminação) e a complexidade da matriz (Lanças, 2004). A seleção do solvente de eluição é outro critério que requer atenção e sua escolha é determinada pela polaridade relativa do solvente em relação à fase sólida escolhida e o analito de interesse (Lanças, 2004).

O procedimento da EFS ocorre em várias etapas, primeiro com a ativação e condicionamento do sorvente, seguindo pela percolação da amostra, depois lavagem do cartucho para eliminação de interferentes e, por último, a eluição do analito. A ativação e condicionamento do sorvente são necessários, pois é através da ativação da fase sólida com um solvente orgânico miscível em água que aumenta a superfície disponível dessa fase para a interação com o analito. Posteriormente, condiciona-se o sorvente com água para deslocar o solvente e ocupar o espaço entre as moléculas orgânicas da fase sólida solvatada, evitando assim a formação de canais preferenciais (Queiroz *et al.*, 2001; Lanças, 2004). Se não fizer a ativação do sorvente, também ocorre a formação de caminhos preferenciais, pois as moléculas orgânicas não se acomodam e a água acaba passando por sítios mais hidrofílicos. Como consequência não ocorre a retenção do analito pelo sorvente por não haver um contato efetivo entre as fases (Pedroso, 2007).

Na literatura são encontrados poucos procedimentos de extração de *n*-C₆₀ por EFS. São eles:

- o cartucho de EFS foi condicionado com 3 mL de metanol e depois 3 mL de água duplamente deionizada, sendo adicionado 3 mL de Mg(ClO₄)₂ 1 mol L⁻¹ a 30 mL de suspensão *n*-C₆₀ e passado pelo cartucho a uma vazão de 10 mL min⁻¹. Após, o cartucho foi lavado com 2 mL de água duplamente deionizada e 1 mL de metanol, sendo eluído com 2 mL de tolueno para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (Bouchard & Ma, 2008);

- o cartucho foi condicionado com 5 mL de tolueno, 5 mL de acetonitrila e 5 mL de água ultra pura, sendo que 1 L de amostra aquosa de *n*-C₆₀ foi percolada pelo cartucho a um fluxo de 10 mL min⁻¹. Posteriormente, o cartucho foi lavado com 5 mL de água ultra pura e colocado para secar por uma hora sob fluxo de nitrogênio, sendo eluído com 15 mL de tolueno e pré-concentrado a 1 mL sob fluxo suave de nitrogênio para posterior análise (Chen *et al.*, 2008);

- o cartucho de EFS foi condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de água ultra pura, sendo passado 1L de suspensão aquosa de *n*-C₆₀ a um fluxo de 6 mL min⁻¹, depois rinsado com 10 mL de água ultra pura e 10 mL de metanol. O analito foi eluído com 10 mL de tolueno, sendo pré-concentrado a 0,5 mL sob fluxo de nitrogênio, avolumado a 1 mL com tolueno e filtrado com membrana de 0,45 µm para posterior análise (Wang *et al.*, 2010).

3.3.3 Microextração dispersiva líquido-líquido

Microextração Dispersiva Líquido-Líquido (MEDLL), ou em inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction* (DLLME), tem como princípio básico a dispersão de um solvente extrator (imiscível em água) com um solvente dispersor (miscível tanto em água quanto no solvente extrator) dentro da matriz aquosa, proporcionando um alto grau de contato entre o analito de interesse e o solvente de extração (Birjandi *et al.*, 2008). A metodologia ou técnica de MEDLL consiste na injeção, por seringa, de uma mistura do solvente extrator e do solvente dispersor em uma amostra aquosa no qual se deseja extrair o analito de interesse (Liang *et al.*, 2008). Quando essa mistura é adicionada de forma rápida à amostra, certa turbidez aparece devido a formação de micro gotículas do solvente extrator dispersas na matriz aquosa (García-Lopes *et al.*, 2007). Essas gotículas dispersas são o ponto chave no processo de extração, pois é através da grande área interfacial formada devido à dispersão, que a transferência de massa entre as fases (aquosa com o analito de interesse e o solvente extrator) é facilitada, fazendo com que o estado de equilíbrio seja alcançado rapidamente (Pena-Pereira *et al.*, 2009). Após a extração, o procedimento de separação é feito por centrifugação para posterior determinação da fase sedimentada, no fundo do frasco, podendo ser por métodos espectrométricos ou cromatográficos (Rezaee *et al.*, 2006). Segundo Birjandi *et al.* (2008) essa técnica oferece inúmeras vantagens sobre os métodos de extração convencionais, analisando sob ponto de vista ambiental e econômico, como uma operação mais rápida e de

fácil manipulação e também dispensa o uso de grandes quantidades de solventes. Pode-se dizer que a utilização de poucos microlitros do solvente extrator é suficiente, cerca de 1 - 3 % do volume total da mistura de extração (García-Lopes *et al.*, 2007). Essa técnica foi desenvolvida para a extração de compostos orgânicos de matrizes aquosas (Daneshfar *et al.*, 2009), mas também é bem comum utilizá-la para determinar contaminantes orgânicos em nível de traço e íons metálicos em amostras ambientais (Liang *et al.*, 2008). Na literatura consultada, até agora, não foi localizado nenhum procedimento de extração do n -C₆₀ de matriz aquosa por MEDLL.

3.4 Análise cromatográfica do C₆₀

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária (Fase Estacionária - FE), enquanto a outra se move através dela (Fase Móvel - FM). Durante a passagem da FM sobre a FE, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela FE, o que resulta em migrações diferentes desses componentes. Entre os vários tipos de cromatografia encontra-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou em inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), chamada assim devido sua característica mais importante, que é a elevada eficiência atingida na separação (Collins *et al.*, 2007).

Para garantir a eficiência da análise cromatográfica, alguns pontos devem ser levados em consideração, como por exemplo, a escolha da coluna e do solvente. Em relação à coluna observa-se o material de recheio (FE), sua escolha depende das características físico-químicas do analito de interesse. Na cromatografia líquida, a dimensão das partículas da FE (variam entre 1,5 – 10 µm) e o comprimento da coluna (varia entre 3 – 30 cm) também são importantes fatores a serem observados, pois interferem diretamente na eficiência da coluna (Lanças, 2009). Em relação ao solvente empregado na FM, devem-se observar três critérios para sua seleção: suas características físico-químicas, sua força cromatográfica e sua seletividade. Dentre as características físico-químicas da FM deve compreender um alto grau de pureza, dissolução da amostra sem decompor seus componentes e não ser miscível na fase estacionária. A força cromatográfica da FM é determinada pela polaridade do solvente, ou seja, o tipo

de interação (ligação química) dos componentes da amostra com o solvente. E, por fim, a seletividade está relacionada à solubilidade dos componentes da amostra em solventes com polaridades semelhantes. A escolha da FM adequada é uma tarefa difícil, porém imprescindível para um bom resultado (Collins *et al.*, 2007).

A escolha do detector, que é a ferramenta que vai dar a resposta da análise, é outro fator importante. Algumas das características desejadas ao escolher um detector são: sensibilidade, seletividade, linearidade e estabilidade (Cass. & Degani, 2001). Várias configurações cromatográficas são empregadas na análise de C_{60} por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando o detector UV-Vis. As principais condições descritas na literatura são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições cromatográficas para análise do C_{60} por CLAE/ UV-Vis encontrados na literatura

| Trabalho | Coluna | | | FM | | | λ (nm) |
|--|-----------------------------|-----------------|---------------------|--------------------------|------------|----------------------------------|-------------------|
| | tipo | tamanho (mm) | partícula | solvente | composição | vazão (mL min ⁻¹) | |
| Bouchard & Ma, (2008) | Cosmosil PYE | 150 x 4,6 | NI | tolueno/ acetonitrila | 80:20 | 1,3 | 333 |
| Deguchi <i>et al.</i> (2001) | TKS – GEL ODS 125T | NI | NI | <i>n</i> -hexano | NI | NI | 350 |
| Deye <i>et al.</i> (2008) | YMC ODS-A | 150 x 6 | 5 μ m, 125 Å | hexano/ isopropanol | 60:40 | 1,52 | NI |
| Fortner <i>et al.</i> (Fortner <i>et al.</i> , 2005) | Cosmosil PYE | 250 x 4,6 | NI | tolueno | NI | 1,0 | 336 |
| Xia <i>et al.</i> (2006) | Delta Pack C18 | 150 x 3,9 | 5 μ m, 300 Å | tolueno/ acetonitrila | 60:40 | NI | 333 |

FM: Fase móvel; NI: Não Informado

3.5 Validação do método

Para que um método analítico seja utilizado em uma pesquisa científica, é necessário que primeiramente passe por um processo chamado de validação. Validar uma metodologia nada mais é que assegurar que as informações geradas sobre uma amostra, mediante o emprego de um método, atendam todos os requisitos específicos, regulamentados por um órgão

competente, garantindo a idoneidade e veracidade dessas informações. Um processo de validação bem desenvolvido e documentado oferece aos órgãos competentes a clara evidência que o método é confiável, exeqüível, exato e preciso, confirmando assim que seu emprego é adequado para o uso que se propõe (Ribani *et al.*, 2004).

Órgãos como a ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), ICH (*International Conference on Harmonization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e ISO (*International Standard Organization*) exigem o processo de validação de métodos para garantir a qualidade dos resultados (Ribani *et al.*, 2004).

4. METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Para o desenvolvimento desse trabalho foi utilizado: - fulereno C₆₀ com 99 % de pureza, adquirido da SES Research (www.sesres.com; Houston/TX); - acetonitrila e tolueno, ambos padrão CLAE (JT Baker[®]); ; - cloreto de sódio (JT Baker[®]); - água Milli-Q (obtida em sistema de purificação de água marca Millipore[®]); - cartucho para EFS C18 500 mg, 6 mL, AccuBond^{II} (51 µm, 60 A^o) (Agilent Technologies).

4.2 Limpeza Vidraria

Os cuidados com a limpeza do material garantem a ausência de interferentes que possam prejudicar as análises. O processo de limpeza pode ser feito através de lavagem e rinsagem com solventes ou de calcinação. Toda a vidraria e objetos utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho foram lavados com uma solução de detergente aniônico alcalino Detertec[®] (5%, v/v) (Vetec), sendo imersos nesta solução por 12 a 24 h. Depois de enxaguados abundantemente em água corrente, foram então imersos em solução de ácido nítrico (5%, v/v) por 12 a 24 h, sendo posteriormente lavados em água corrente, e secos em estufa com circulação forçada de ar (35 °C). Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a vidraria foi rinsada uma vez com acetona P.A., seguido de duas rinsadas com *n*-hexano. Após secagem por evaporação do solvente sob

temperatura ambiente, a vidraria foi acondicionada em papel alumínio previamente calcinado para posterior utilização.

4.3 Descarte Resíduos

Está sendo desenvolvido por essa Universidade um programa de tratamento de resíduos, ao qual consiste em uma unidade de tratamento e disposição final dos resíduos químicos gerados. Enquanto esse projeto encontra-se em fase de implantação, os resíduos gerados nesse estudo foram coletados e separados em frascos, rotulados e armazenados em local apropriado.

4.4 Suspensões aquosas de *n*-C₆₀

As suspensões aquosas foram preparadas pesando 100 mg de C₆₀ e adicionando a 1 L de água ultra pura, sendo mantidas sob agitação constante e exposição à luz artificial por um tempo de até dois meses (Figura 2) (Oberdorster *et al.*, 2006). Os erlenmeyers onde estavam as suspensões durante o preparo foram vedados com parafilm (Pechinery Plastic Packaging) e papel alumínio para evitar a evaporação da água. Foram preparadas 6 suspensões, sendo 3 com aquecimento (50 °C) e as restantes deixadas à temperatura ambiente (\approx 20 °C) (Tabela 3). A cada 15 dias foram coletados aproximadamente 150 mL de cada suspensão, homogeneizadas e analisadas. Cada alíquota foi filtrada em membrana filtrante de nylon com malha de 0,45 μ m, (Figura 3) (Deguchi *et al.*, 2001) e estocada em vidro âmbar a temperatura ambiente até a análise.



Figura 2: Preparo das suspensões de $n\text{-C}_{60}$ com aquecimento (50°C) e sem aquecimento ($\approx 20^{\circ}\text{C}$)

(fotos da esquerda e direita, respectivamente)

Tabela 3 – Amostras das suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$ com (CA) e sem aquecimento (SA):

| Sem Aquecimento | | | Com Aquecimento | | |
|------------------|----------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------|
| <i>Suspensão</i> | <i>Identificação</i> | <i>Amostras</i> | <i>Suspensão</i> | <i>Identificação</i> | <i>Amostras</i> |
| 1 | | SA15d_1 | 1 | | CA15d_1 |
| 2 | SA_15d | SA15d_2 | 2 | CA_15d | CA15d_2 |
| 3 | | SA15d_3 | 3 | | CA15d_3 |
| 1 | | SA30d_1 | 1 | | CA30d_1 |
| 2 | SA_30d | SA30d_2 | 2 | CA_30d | CA30d_2 |
| 3 | | SA30d_3 | 3 | | CA30d_3 |
| 1 | | SA45d_1 | 1 | | CA45d_1 |
| 2 | SA_45d | SA45d_2 | 2 | CA_45d | CA45d_2 |
| 3 | | SA45d_3 | 3 | | CA45d_3 |
| 1 | | SA60d_1 | 1 | | CA60d_1 |
| 2 | SA_60d | SA60d_2 | 2 | CA_60d | CA60d_2 |
| 3 | | SA60d_3 | 3 | | CA60d_3 |

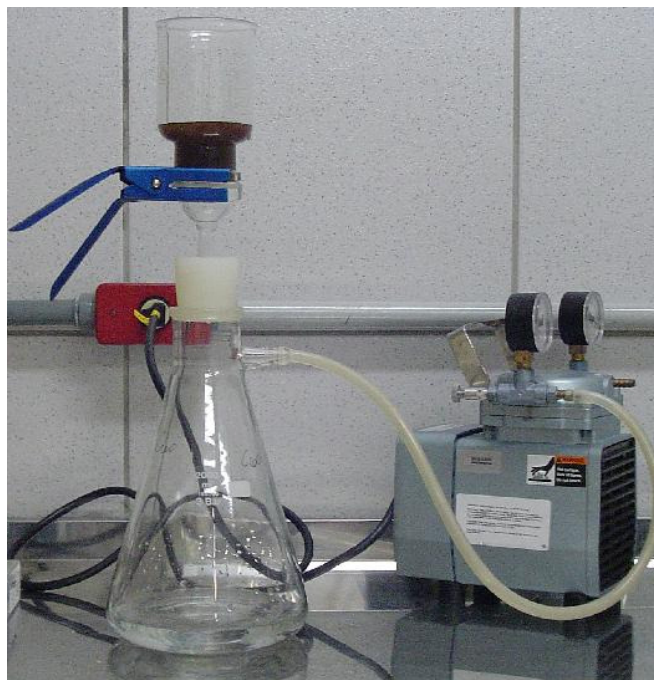


Figura 3: Sistema utilizado na filtração das suspensões de $n\text{-C}_{60}$

4.5 Soluções de trabalho

Os ensaios de validação da metodologia foram realizados com água ultra pura, obtida em sistema Milli-Q[®] a uma resistividade de $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Para isso, a água foi fortificada em diferentes níveis com uma solução analítica destinada para os ensaios de recuperação.

A *solução analítica para a fortificação* em água nos ensaios de recuperação foi preparada pesando uma massa de 0,5 mg de C_{60} e solubilizando-a em 2 mL de tolueno. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, que foi avolumado com acetonitrila padrão CLAE para obter uma concentração nominal de 5000 ng mL^{-1} de C_{60} . Dessa solução foram preparadas diluições em acetonitrila nas concentrações de 150, 300 e 1500 ng mL^{-1} . Somente após a confirmação da sua concentração por CLAE/UV-Vis, as soluções foram aplicadas nos ensaios de recuperação.

A *solução padrão estoque* foi preparada contendo 50000 ng mL^{-1} de C_{60} dissolvido em tolueno padrão CLAE, armazenada em vidro envolto com papel alumínio e estocada no escuro. A *solução padrão estoque* teve a sua concentração ajustada em razão da evaporação do solvente através do controle de pesagem antes e depois de cada utilização. A partir dessa solução foram preparadas diluições nas concentrações de 10000 e 25000 ng mL^{-1} para o

preparo da curva analítica nos pontos 150; 300; 500; 750; 1000; 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000 e 4500 ng L⁻¹ em tolueno.

4.6 Teste e otimização das metodologias de extração

4.6.1 Método ELL

O procedimento de extração líquido-líquido foi testado com base na metodologia descrita em Chen *et al.* (2008), onde 50 mL de amostra fortificadas a 5 ng mL⁻¹ com a solução analítica foram misturados em um funil de extração com 10 gramas de NaCl e 10 mL de tolueno, agitados manualmente por 5 minutos e coletado o extrato. Esse procedimento repetiu-se por mais duas vezes com 5 mL de tolueno cada. Após, as frações coletadas foram evaporadas a 100 µL sob fluxo suave de nitrogênio (N₂) e analisadas por CLAE/UV-Vis. Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3) e os resultados foram expressos em percentual de recuperação (% recuperação) (Equação 1) e desvio padrão relativo (RSD %) (Equação 2).

$$\% \int \text{Recuperação} = \frac{\bar{C}_{\text{experimento}}}{C_{\text{teórico}}} \cdot 100$$

Equação 1: Cálculo do % de recuperação
(Lanças, 2009)

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{X_{\text{média}}} \cdot 100$$

Equação 2: Cálculo do desvio padrão relativo
(Ribani *et al.*, 2004)

4.6.2 Método EFS

O procedimento de extração em fase sólida também foi otimizado com base na metodologia descrita em Chen *et al.* (2008), onde 50 mL de amostra foram fortificadas a 5 ng mL⁻¹ com a solução analítica. Este volume foi passado através do cartucho de extração do sistema de EFS por gravidade (Figura 4). Os cartuchos de 6 mL contendo 500 mg do adsorvente C18 (sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano) foram previamente ativados e condicionados com 5 mL de tolueno, 5 mL de acetonitrila e 5 mL de água ultra pura. Após o procedimento, os cartuchos foram secos por 1 hora sob

fluxo suave de nitrogênio. O analito foi eluído com 15 mL de tolueno padrão CLAE e evaporado sob fluxo suave de nitrogênio até o volume final de 100 μL (Figura 5). O extrato pré-concentrado foi analisado por CLAE/UV-Vis. Esse método de extração foi testado com a adição de NaCl 20 % sob o volume da amostra, semelhante ao método ELL, e sem a adição do sal. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em % recuperação (Equação 1) e RSD % (Equação 2).

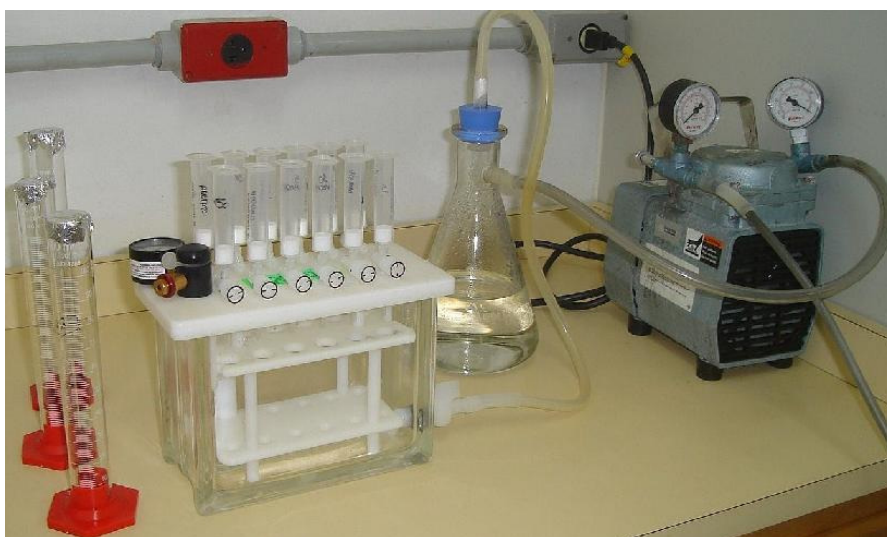


Figura 4: Sistema de extração de fase sólida (EFS)

4.6.3 Método MEDLL

O procedimento de microextração dispersiva líquido-líquido foi realizado da seguinte forma: a mistura de solventes extrator-dispersor foi adicionada com auxílio de uma seringa em 5 mL de amostra (água fortificada com a solução analítica a 5 ng mL^{-1}). Após, foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm e, em seguida, foi coletada a fase sedimentada, que foi evaporada até a secura sob fluxo suave de nitrogênio, sendo ressuspenso em 100 μL de tolueno para posterior análise por CLAE/UV-Vis.

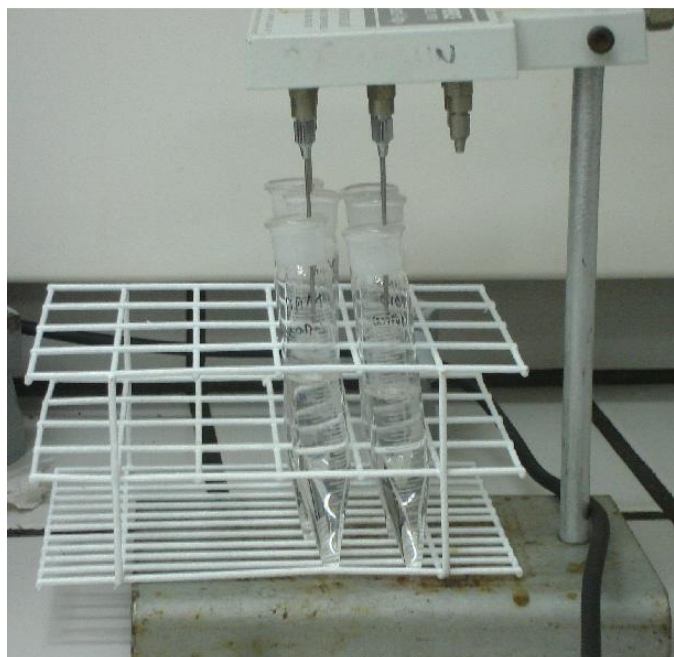


Figura 5: Concentração dos extratos utilizando o fluxo de nitrogênio

4.6.3.1 Escolha do solvente extrator

Para realizar os testes do solvente extrator que melhor se aplicaria à técnica de MEDLL para as suspensões de n -C₆₀ foram selecionados os solventes tetracloroetileno (C₂Cl₄), 1,2-diclorobenzeno (C₆H₄Cl₂) e tetracloreto de carbono (CCl₄), pois estes apresentavam densidade maior que a da água e também devido o analito apresentar solubilidade nestes solventes. As densidades e solubilidade dos solventes em água e a solubilidade do C₆₀ nos solventes estão descritas na Tabela 4. Para a escolha do solvente extrator foram utilizados um volume de 100 μ L para cada solvente e 1500 μ L de acetonitrila (ACN) para 5 mL de amostra fortificada a 5 ng mL⁻¹.

Tabela 4 – Densidade e solubilidade dos solventes em água e solubilidade do C₆₀ nos solventes

| Solvente | Densidade (g mL ⁻¹) | Solubilidade (em água g L ⁻¹) | Solubilidade do C ₆₀ (nos solventes g mL ⁻¹) |
|---|---------------------------------|---|---|
| C ₂ Cl ₄ | 1,62 ¹ | 0,17 ¹ | 1,20 ² |
| C ₆ H ₄ Cl ₂ | 1,31 ¹ | 0,15 ¹ | 0,03 ² |
| CCl ₄ | 1,59 ¹ | 0,80 ¹ | 0,32 ² |

¹ Caldas *et al* (2010); ² Ruoff *et al* (1993)

4.6.3.2 Escolha do solvente dispersor

Acetona, ACN e metanol foram escolhidos para os testes de escolha do solvente dispersor devido à solubilidade em água e miscibilidade com o solvente extrator. O volume utilizado dos dispersores foi de 1500 µL de cada solvente para 100 µL do extrator.

4.6.3.3 Escolha do volume do solvente extrator

A escolha do melhor volume para a extração se deu fixando o volume do dispersor em 1500 µL e variando o volume do extrator em 20 µL no intervalo de (60 a 150 µL).

4.6.3.4 Escolha do volume do solvente dispersor

A escolha do melhor volume do solvente dispersor se deu variando o volume do dispersor em 0,5 mL no intervalo de (0,5 a 3,5 mL).

4.6.3.5 Avaliação da adição de NaCl e Mg(ClO₄)₂ na amostra

Alguns autores revelam a importância da adição de um eletrólito para facilitar a extração do *n*-C₆₀ da matriz aquosa devido a forte estabilidade dos agregados ocasionada por sua carga negativa. Na literatura encontra-se o uso do Mg(ClO₄)₂ (Fortner *et al.*, 2005; Lyon *et al.*, 2006; Oberdorster *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2006; Bouchard & Ma, 2008) e do NaCl (Deguchi *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Com o objetivo de avaliar qual eletrólito responde com melhor eficiência de extração, foi testado a adição de NaCl (0,5 e 1%) sob o volume de amostra e 50 e 100 µL de Mg(ClO₄)₂ 1 mol L⁻¹.

4.7 Otimização do sistema cromatográfico

Para garantir um bom procedimento de validação de um método analítico é necessário antes assegurar que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados precisos e exatos (Paschoal *et al.*, 2008). Para isso, é possível usar como ferramentas para avaliar a conformidade do sistema alguns parâmetros cromatográficos como, por exemplo: número de pratos teóricos (N), fator de retenção (*k*), resolução (*Rs*), fator de assimetria (*As*). Nesse trabalho o parâmetro avaliado foi o fator de retenção.

O fator de retenção é determinado pela razão dos tempos que as moléculas permanecem na FE (*t_R*) e na FM (*t_M*) (Equação 3) (Paschoal *et al.*,

2008). Normalmente k é o primeiro parâmetro cromatográfico a ser ajustado. Seu valor não deve ser muito pequeno, pois isso significa que a FM é muito forte e o soluto tem pouca interação com a FE, mas também o valor de k não pode ser muito grande por causar alargamento das bandas, podendo significar uma FM muito fraca e/ou um soluto com muita afinidade com a FE (Cass. & Degani, 2001).

$$k = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t'_M}$$

Equação 3: Cálculo do fator de retenção (k)
(Paschoal *et al.*, 2008)

4.8 Sistema cromatográfico para o C₆₀

A cromatografia líquida de alta eficiência foi selecionada para esse trabalho com base nas características do composto e na literatura. Para compor o sistema cromatográfico foi definido o detector UV-Vis, uma coluna cromatográfica de fase reversa e os solventes para a composição da fase móvel (FM) foram tolueno e acetonitrila (Deguchi *et al.*, 2001; Fortner *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2006; Bouchard & Ma, 2008; Deye *et al.*, 2008). Porém, a fim de determinar a configuração mais adequada, foram testadas diferentes vazões e diferentes misturas entre os solventes da FM (Tabela 5), e a melhor condição foi escolhida com base no tempo de retenção (t_R) e no fator de retenção (k).

Tabela 5 - Parâmetros de otimização da composição e vazão da FM

| Amostra | Tolueno (mL) | Acetonitrila (mL) | Vazão (mL min ⁻¹) |
|---------|--------------|-------------------|-------------------------------|
| 1 | 60 | 40 | 0,8 |
| 2 | 60 | 40 | 1,0 |
| 3 | 60 | 40 | 1,2 |
| 4 | 70 | 30 | 0,8 |
| 5 | 70 | 30 | 1,0 |
| 6 | 70 | 30 | 1,2 |

Para a escolha do comprimento de onda de máxima absorvância, foi injetada uma solução analítica de C₆₀ a 2500 ng mL⁻¹ em um equipamento CLAE/DAD marca Waters, equipado com bomba quaternária modelo 600, detector por arranjo de diodos 2996, sistema de aquisição de dados software Empower PDA e alça de injeção de 20 µL. O monitoramento do comprimento de

onda de máxima absorvância ocorreu na faixa entre 200 a 400 nm. Foi utilizado como fase estacionária (FE) uma coluna C18 Phenomenex® de 150 mm de comprimento (4,6 mm d.i.) e partículas de 5 µm. Para as análises foi utilizado um sistema cromatográfico composto por bomba binária Perkin Elmer Series 200 LC, injetor automático Perkin Elmer Series 225, alça de injeção de 20 µL, detector UV-Vis e sistema de aquisição de dados e integrador TotalChrom Workstation 6.3.

4.9 Validação dos métodos

Otimizados os métodos de extração das suspensões de *n*-C₆₀, partiu-se então para a validação da metodologia de determinações cromatográficas. As figuras de mérito avaliadas nesse trabalho foram: curva analítica e linearidade, LD e LQ (do instrumento e do método), precisão (intermediária e repetitividade) e exatidão (expresso em percentual (%) de recuperação).

4.9.1 Curva analítica e linearidade

É a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo delimitada em uma determinada faixa de aplicação, ou seja, entre o valor superior e inferior do analito a ser determinado e atendendo os requisitos de precisão e exatidão (Swartz & Krull, 1998). A linearidade é expressa por uma equação de reta denominada curva analítica e pode ser medida matematicamente através da regressão linear (Custódio et al., 1997). A variável dependente (y) é a resposta cromatográfica (área ou altura do pico), enquanto a variável independente (x) expressa a concentração. Também pode ser estimado o coeficiente de correlação “r” que avalia a relação entre o sinal e a concentração da substância de interesse. Quanto mais próximo de 1 for o “r”, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2004). Os valores considerados aceitáveis para o coeficiente de correlação são $r \geq 0,98$ (ANVISA, 2003) e acima de 0,90 (INMETRO, 2003).

As curvas analíticas foram construídas a partir da *solução padrão estoque* de 50000 ng mL⁻¹ (descrito no item 4.5), nos níveis de 150; 300; 500; 750; 1000; 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000 e 4500 ng L⁻¹, injetados em triplicata. A linearidade do método foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear “r”.

4.9.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito na amostra, diferente de zero, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas (ANVISA, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Paschoal *et al.*, 2008). O LD pode ser calculado de três maneiras:

Método visual – utiliza adição de concentração conhecida da substância de interesse na matriz, de tal modo que possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível.

Método sinal-ruído – é feita uma comparação entre os sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse e um branco. Assim é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância poderá ser facilmente detectada. A estimativa do LD poderá ser com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, (ANVISA, 2003), e calculado conforme a Equação 4, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do “y”, de no mínimo 3 curvas de calibração, e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Equação 4: Cálculo do Limite de Detecção
(ANVISA, 2003)

Parâmetros da curva analítica – o LD pode ser expresso através da relação do coeficiente linear e angular da equação de regressão multiplicado por 3,3. O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida utilizando um determinado procedimento experimental (ANVISA, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Paschoal *et al.*, 2008). O LQ também pode ser estimado na relação de 10 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003), ou também calculado pela Equação 5, onde DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, de no mínimo 3 curvas de calibração, e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Equação 5: Cálculo do Limite de Quantificação
(ANVISA, 2003)

O LD e LQ (do equipamento) foram calculados de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente. O desvio padrão do intercepto com o eixo do “y” (DPA) e a média do coeficiente de inclinação angular (\overline{IC}) foram calculados pelo software Microsoft Excel[®] na função estatística, para posteriormente serem aplicados nas equações.

O LD_M e LQ_M (do método) foram calculados da mesma forma, porém levando em consideração o fator de concentração de cada método.

4.9.3 Precisão

Corresponde ao grau de concordância dos resultados realizados em testes independentes, de uma mesma amostra, obtidas sob condições estabelecidas. É expressa pela estimativa do desvio padrão (s) (Equação 6), ou pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (Equação 2) (Thompson *et al.*, 2002). Na Equação 6, “ $X_{média}$ ” representa a média aritmética do número de medições; “ X_i ” é o valor individual de uma medição e “ n ” é o número de medições.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{média})^2}{n - 1}}$$

Equação 6: Cálculo do desvio padrão
(Ribani *et al.*, 2004)

Segundo Ribani *et al.* (2004), precisão é considerada em três diferentes níveis:

Repetitividade – representa a concordância entre os resultados de sucessivas medições, de uma mesma amostra em diferentes preparações, utilizando o mesmo método sobre as mesmas condições (analista, instrumento, local) em um curto espaço de tempo. A repetitividade deve proceder sobre nove determinações, cobrindo o limite especificado do procedimento (três níveis com três repetições cada).

Precisão Intermediária – expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias de análise, equipamentos, analistas, dentre outros.

Reprodutibilidade – corresponde aos resultados dos estudos realizados através da colaboração entre laboratórios, ou seja, uma mesma

amostra exposta a condições diferentes, como: local, analista, equipamentos, etc.

Para a precisão, dependendo da complexidade da amostra, em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos valores de RSD de até 20 %. Métodos que quantificam compostos em macro quantidades, o RSD deve ficar entre 1 e 2 % (Ribani *et al.*, 2004).

O estudo da precisão foi realizado, tanto para o equipamento quanto para o método, com base na repetitividade e na precisão intermediária. Foram aplicados três níveis de concentração (150; 300 e 1500 ng mL⁻¹) injetados em triplicata (n = 3) para cada concentração. Para a precisão intermediária foram injetados em dias alternados e diferente analista. Os testes de precisão para o método foram realizados juntamente com os ensaios de recuperação. Os resultados foram expressos em desvio padrão relativo, (% RSD_r) para repetitividade e (% RSD_{pi}) para a precisão intermediária, calculados através da Equação 2.

4.9.4 Exatidão

É a proximidade entre os resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (Thompson *et al.*, 2002). Podem ser obtidos através de material de referência certificado (CRM), por comparação de métodos ou ensaios de recuperação. Neste último, os resultados são expressos em percentual de recuperação (Equação 1), onde $\bar{C}_{\text{experimento}}$ é a concentração obtida e $C_{\text{teórico}}$ é a concentração fortificada, e determinados utilizando três níveis de concentração diferentes, contemplando a faixa linear da curva analítica. O resultado obtido não deve exceder em 15 % (ANVISA, 2003).

Os testes de recuperação foram realizados com 3 níveis diferentes da *solução analítica para a fortificação*, preparadas para os ensaios de recuperação (descrita no item 4.5), adicionadas nas amostras em branco (item 4.5) no início do procedimento. Alíquotas de água ultra pura foram fortificadas à 150; 300 e 1500 ng mL⁻¹ independentemente e submetidas aos procedimentos de extração (ELL, EFS e MEDLL) otimizados e analisadas posteriormente por CLAE/UV-Vis, em triplicata. Os resultados foram expressos em percentual de recuperação, calculados de acordo com a Equação 1.

4.10 Análise das suspensões de $n\text{-C}_{60}$

Uma vez validados e otimizados os métodos de extração, com base em amostra de água ultra pura fortificadas com a solução analítica *para fortificação* contendo C_{60} , e o método cromatográfico, as suspensões de C_{60} foram então quantificadas. As suspensões preparadas com aquecimento (CA) e sem aquecimento (SA) e coletas a cada 15 dias (conforme descrito na Tabela 3) foram processadas por EFS, ELL e por MEDLL, para o comparativo das técnicas.

4.11 Caracterização das suspensões de $n\text{-C}_{60}$

A caracterização física das suspensões de $n\text{-C}_{60}$ foi realizada no laboratório Nano do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foi utilizado um microscópio de Força Atômica do tipo Varredura por Sonda (MVS), modelo MultiMode Nanoscope IV - Veeco Instruments (Santa Barbara, CA) (Figura 6).

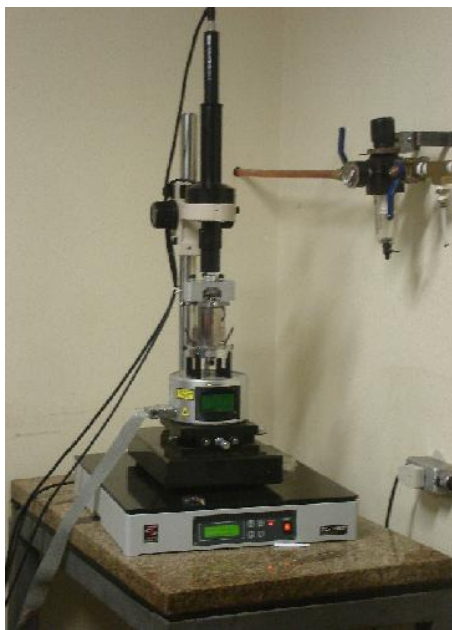


Figura 6: Microscópio de Força Atômica

O microscópio é composto basicamente por uma sonda que se move linearmente escaneando a superfície de interesse nas direções planas x , y e z . Essa sonda é acoplada a uma ponteira (*cantilever*) que está fixa a um suporte. Entre a sonda e a superfície da amostra existem interações, e a força resultante destas interações faz com que o *cantilever* (de 100 a 200 μm de comprimento) se aproxime ou se afaste gerando deflexões.

Na parte superior ao suporte, que prende a sonda, existe uma superfície espelhada que reflete a luz de um feixe de laser, que em seguida passa através de uma lente e incide sobre um fotodetector, cujo sinal de saída é recolhida por um amplificador diferencial, medindo as variações de posição e da intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*. Assim, os movimentos nanométricos podem ser detectados, gerando sinais elétricos que são armazenadas e processados por um computador e convertidos em imagem topográficas tridimensionais da superfície do material em resolução atômica.

As suspensões caracterizadas no microscópio de Força Atômica foram as alíquotas de 60 dias sem aquecimento (SA_60d) e 60 dias com aquecimento alíquota (CA_60d). Uma gota de cada suspensão foi pingada na superfície de análise (mica) e evaporada até a *secura* em uma chapa com aquecimento. Depois essa superfície com a amostra devidamente isenta de água foi acoplada no microscópio para proceder a análise.

4.12 Análise estatística

A diferença das médias dos resultados referentes ao efeito da temperatura em relação à concentração da suspensão de $n\text{-C}_{60}$ e à eficiência dos métodos de extração (ELL, EFS e MEDLL) foi avaliada através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por um teste *a posteriori* Mann-Whitney. Para todos os testes adotou-se um nível de significância de 0,05 (95% de confiança). Os resultados estão expressos em média e intervalo de confiança (95 %) (Zar J.H., 1984).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização das metodologias de extração

5.1.1 Método ELL

Os resultados de recuperação e desvio padrão relativo dos testes para o método ELL com amostras de água ultra pura fortificadas na concentração de 5 ng mL^{-1} estão apresentados na Tabela 6. As recuperações dos testes ficaram entre 70,90 a 89,13 % e 0,07 a 1,69 para % RSD ($n = 3$), demonstrando assim estarem dentro dos limites recomendados de 70 a 120 %

(Ribani *et al.*, 2004), podendo desta forma o método ser reproduzidos com confiabilidade.

Tabela 6 – Resultados obtidos para o teste do método ELL

| Método ELL (n=3) | % Recuperação | % RSD |
|-----------------------------|----------------------|--------------|
| Amostra 1 | 73,68 | 0,07 |
| Amostra 2 | 70,90 | 1,69 |
| Amostra 3 | 89,13 | 0,71 |

5.1.2 Método EFS

Os resultados de recuperação e desvio padrão relativo dos testes de otimização do método para EFS com amostras de água ultra pura fortificadas na concentração de 5 ng mL⁻¹ com e sem adição de NaCl estão apresentados na Tabela 7. As recuperações utilizando 20% de NaCl ficaram entre 96,33 e 100,70 % e o RSD % entre 0,74 e 2,06, enquanto que sem NaCl as recuperações ficaram entre 72,04 e 88,24 % e o RSD % entre 0,67 e 1,64. Os valores de recuperação obtidos com a adição de NaCl se apresentaram melhores e com uma boa margem de diferença em relação àqueles que não receberam o sal, indicando uma melhor eficiência da técnica EFS em conjunto com a adição do NaCl.

Tabela 7 - Resultados obtidos para a otimização do método EFS

| Método EFS (n=3) | % Recuperação c/ 20 % NaCl | % RSD c/ 20 % NaCl | % Recuperação s/ NaCl | % RSD s/ NaCl |
|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Amostra 1 | 96,33 | 0,74 | 88,24 | 1,13 |
| Amostra 2 | 100,70 | 0,66 | 72,04 | 1,64 |
| Amostra 3 | 100,23 | 2,06 | 82,04 | 0,67 |

Uma justificativa para a maior eficiência quando da adição de NaCl é que as cargas negativas das suspensões de *n*-C₆₀ são as responsáveis pela estabilidade que a molécula apresenta (Fortner *et al.*, 2005). A repulsão entre as cargas acaba dificultando o particionamento do analito em solventes orgânicos como o tolueno, reduzindo assim a eficiência da extração observada nas suspensões de *n*-C₆₀ (Bouchard & Ma, 2008; Chen *et al.*, 2008; Hyung & Kim, 2009; Wang *et al.*, 2010). A adição do NaCl causa a desestabilização do

agregado que ocorre a partir da alteração da força iônica do meio. O eletrólito diminui a atmosfera iônica entre as partículas de $n\text{-C}_{60}$ permitindo assim que elas se aproximem antes que a repulsão eletrostática se torne significativa (Harris, 2001), facilitando a ação do solvente.

5.1.3 Método MEDLL

5.1.3.1 Escolha do solvente extrator

Os resultados dos testes com os solventes C_2Cl_4 , $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ e CCl_4 a partir de uma amostra fortificada a 5 ng mL^{-1} estão expressos em % de recuperação e desvio padrão relativo (%RSD) (Figura 7). O solvente extrator que apresentou maior eficiência foi o C_2Cl_4 (69,19%). Esse resultado pode ser atribuído à maior solubilidade do C_{60} nesse solvente ($0,17 \text{ g L}^{-1}$) e também à sua densidade ($1,62 \text{ g mL}^{-1}$) que é relativamente maior que os outros 2 solventes testados. Com base nessas informações o solvente tetracloroetileno (C_2Cl_4) foi escolhido como solvente extrator.

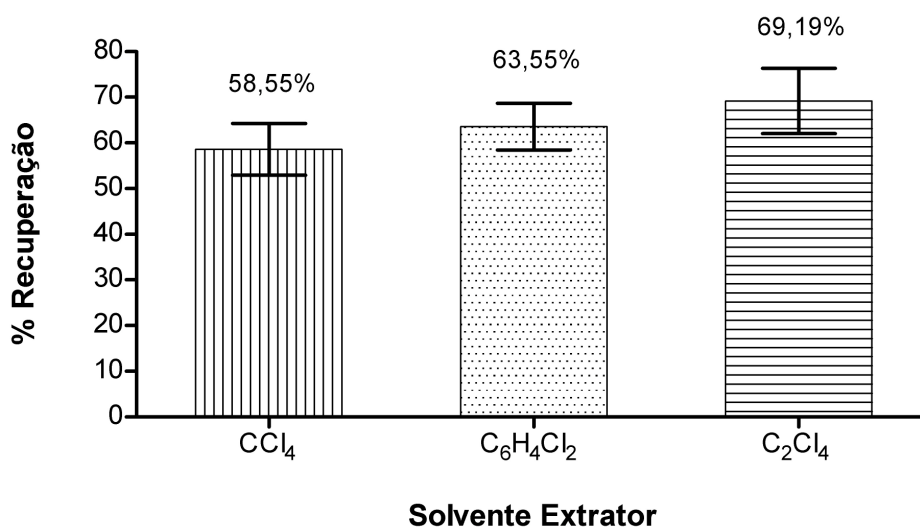


Figura 7: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes solventes extratores para MEDLL nas suspensões de $n\text{-C}_{60}$ ($n=3$)

5.1.3.2 Escolha do solvente dispersor

Os solventes acetonitrila, metanol e acetona foram testados como solvente dispersor. A ACN foi o que apresentou o melhor resultado (69,19%), sendo selecionado como solvente dispersor para o método. Os resultados estão expressos em % de recuperação e desvio padrão relativo (RSD%) (Figura 8).

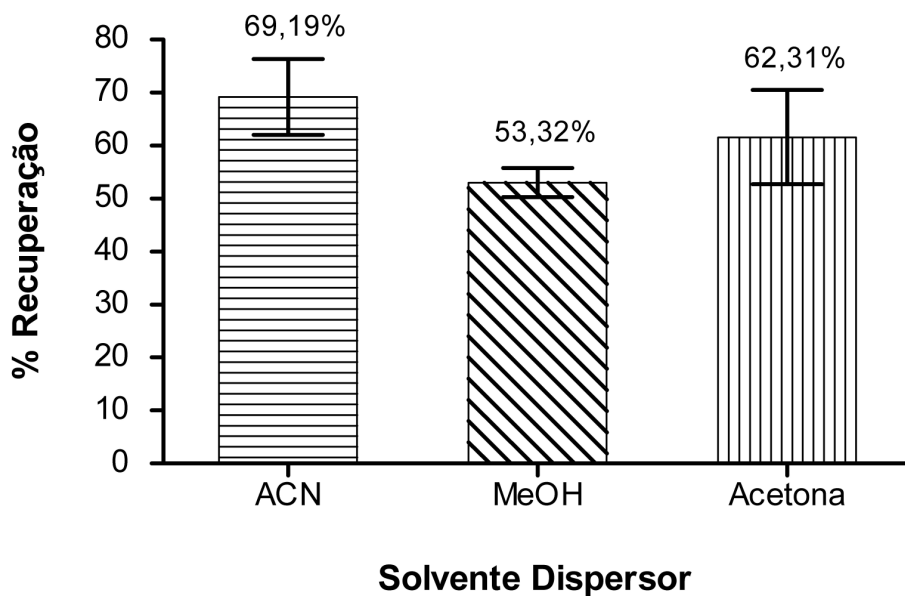


Figura 8: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes solventes dispersores para MEDLL nas suspensões de n -C₆₀ (n=3)

5.1.3.3 Escolha do volume do solvente extrator

Para o teste do volume de solvente extrator foi fixado um volume de 1500 μ L de acetonitrila (solvente dispersor) e aplicado diferentes volumes de (C₂Cl₄), variando entre 60 e 150 μ L (Figura 9). O volume que apresentou o melhor % de recuperação (55,58%) foi o de 100 μ L.

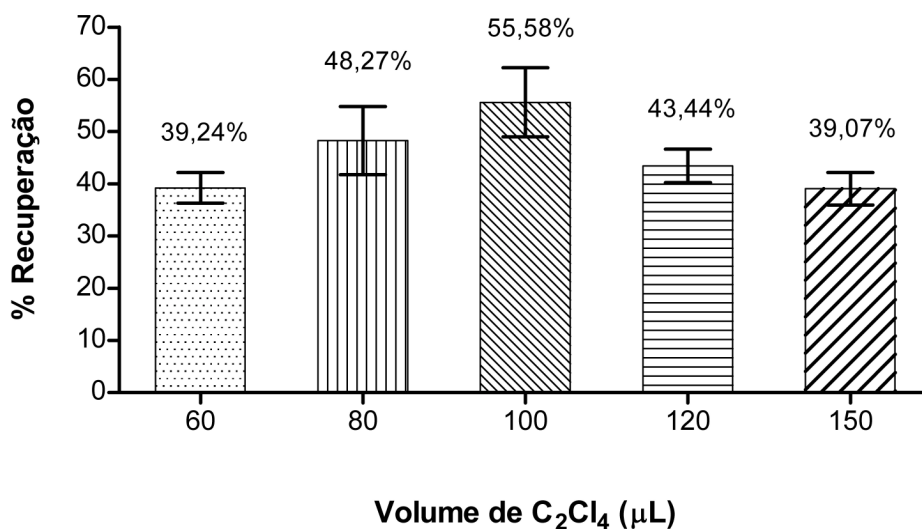


Figura 9: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes volumes do solvente extrator para MEDLL nas suspensões de n -C₆₀ (n=3)

5.1.3.4 Escolha do volume do solvente dispersor

Para o teste do volume de solvente dispersor foi fixado um volume de 100 μL de C_2Cl_4 e aplicado diferentes volumes de acetonitrila em um intervalo de 500 a 3500 μL (Figura 10). Os resultados estão expressos em % de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %). Os volumes de 2000 e 2500 μL apresentaram valores semelhantes de recuperação, sendo escolhido o menor volume (2000 μL) para aplicação no método pela menor geração de resíduo e de economia de solvente.

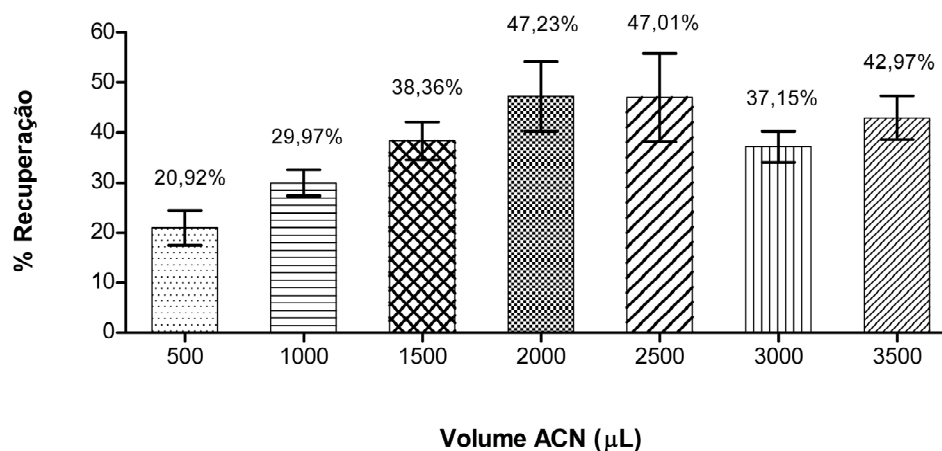


Figura 10: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes volumes do solvente dispersor para MEDLL nas suspensões de $n\text{-C}_{60}$ ($n=3$)

5.1.3.5 Avaliação da adição de NaCl e $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ na amostra

Foi avaliado a eficiência da extração com a adição dos eletrólitos NaCl e $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ e sem a adição de nenhum modificador. Os resultados estão expressos em % de recuperação e desvio padrão relativo (RSD %) (Figura 11).

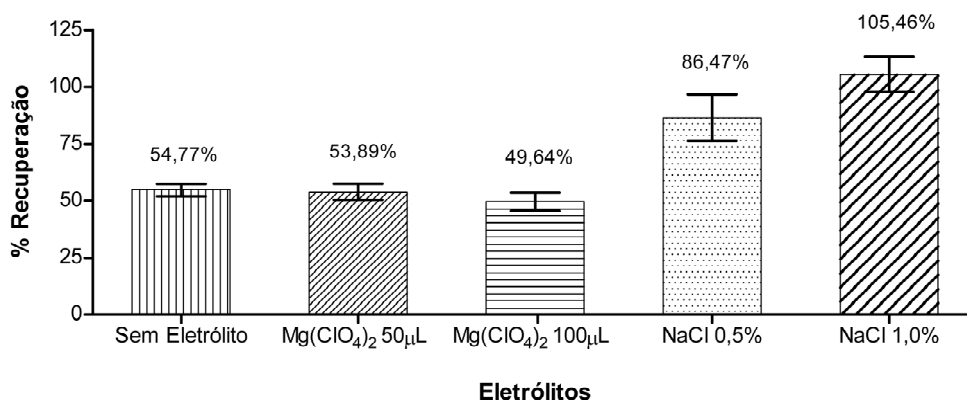


Figura 11: Percentual de recuperação (média \pm desvio padrão) utilizando diferentes modificadores (NaCl e Mg(ClO₄)₂) na extração das suspensões de *n*-C₆₀. Mg(ClO₄)₂ - 1 mol L⁻¹; NaCl: percentual de sal sob o volume de amostra (5mL) (n=3)

O experimento com 1% NaCl foi o que apresentou melhor recuperação (Figura 11). Essa constatação é consistente com o trabalho de Bouchard & Ma (2008), onde os autores descreveram que a eficiência da extração do C₆₀ em presença de NaCl foi maior quando comparada com o a adição de Mg(ClO₄)₂. A alteração da força iônica do meio ocasionado pela adição de NaCl foi mais eficaz, provocando uma maior redução de carga na partícula. A partição do analito para o solvente é mais facilitada, quando comparado aos efeitos oxidativos ocasionados pelo Mg(ClO₄)₂, ao qual depende do nível de oxidação dos compostos para realizar o mesmo desempenho.

5.2 Otimização do sistema cromatográfico

O espectro de varredura entre 200 e 400 nm obtido para uma *solução padrão* de C₆₀ a 2500 ng mL⁻¹ é apresentado na Figura 12. A maior absorvância para o C₆₀ foi obtida no comprimento de onda de 332,7 nm, sendo esse o escolhido para a quantificação do fulereno.

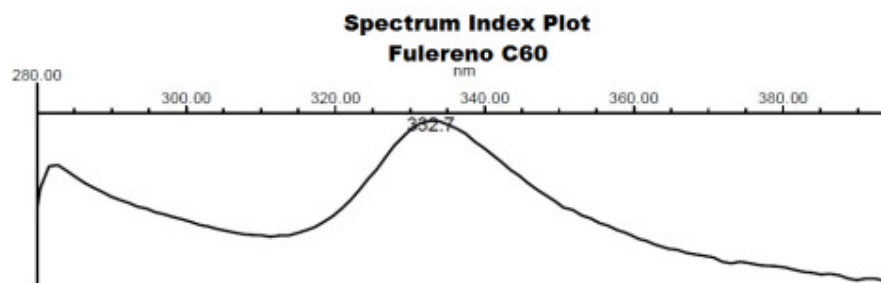


Figura 12: Espectro da varredura da solução analítica de 2500 ng mL^{-1} de C_{60} obtido por CLAE/DAD

Os resultados obtidos para os testes de escolha da composição e vazão da FM estão descritos na Tabela 8. As condições de operação da FM no sistema cromatográfico foram escolhidas de acordo com o valor do parâmetro fator de retenção. Os testes foram realizados com uma *solução padrão* na concentração de 2500 ng mL^{-1} de C_{60} .

Tabela 8 - Condições testadas para definir a composição e vazão da FM

| Prop. Solvente Tolueno/ACN (%v/v) | Tempo Corrida (min) | Vazão (mL min^{-1}) | T_M (min) | T_R (min) | Fator de Retenção (k) |
|---|---------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|
| 60/40 | 15 | 0,8 | 2,30 | 6,50 | 1,82 |
| 60/40 | 10 | 1,0 | 2,17 | 5,60 | 1,58 |
| 60/40 | 6 | 1,2 | 1,94 | 4,60 | 1,37 |
| 70/30 | 15 | 0,8 | 1,98 | 5,25 | 1,65 |
| 70/30 | 10 | 1,0 | 1,87 | 4,10 | 1,19 |
| 70/30 | 6 | 1,2 | 1,58 | 3,07 | 0,94 |

Os valores de t_R nos experimentos para averiguar a melhor condição da FM no sistema cromatográfico para análise do C_{60} foram muito próximos e, por conseqüência, os valores de k também (Tabela 8). A melhor condição determinada foi a de 60% tolueno / 40% acetonitrila (v/v) e uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Essa condição foi a que apresentou o melhor fator de retenção ($k = 1,82$), indicando assim uma boa interação entre o analito a FM e a FE. Desta forma, as melhores condições de trabalho foram incorporadas a metodologia analítica, sendo que as condições cromatográficas utilizadas para análise dos extratos das suspensões de $n\text{-C}_{60}$ estão especificadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas para análise das suspensões de *n*-C₆₀

| Parâmetros | Condições |
|-------------------------------|--|
| Coluna | C18 Phenomenex® (150x 4,6 mm d.i.) partículas 5µm |
| Fase Móvel | Tolueno/Acetonitrila 60/40 (% v/v) |
| Vazão (mL min ⁻¹) | 0,8 |
| Volume de Amostra (µL) | 20 |
| Comprimento de Onda (nm) | 332,7 |

5.3 Validação dos métodos

5.3.1 Curva analítica e linearidade

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração, ou então calculada por regressão linear. O coeficiente de correlação linear é freqüentemente usado para indicar a linearidade (INMETRO, 2011), e o valor mínimo aceitável é $r \geq 0,98$ (ANVISA, 2003). Nesse trabalho, a linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear, a partir das 3 curvas construídas, onde foram obtidos valores acima de 0,99, indicando a homogeneidade dos pontos e comprovando assim a linearidade do método (Tabela 10). Entretanto, mesmo com comprovação da linearidade observou-se através da variação entre os coeficientes angulares das equações das retas que a resposta do aparelho no terceiro dia variou em relação ao 1º e 2º dia de análise. Isso pode ter sido ocasionado devido à variação na concentração dos padrões pela evaporação do solvente, pois os mesmos são injetados automaticamente e ficam no carrossel de amostragem até o momento da injeção. Sendo assim, um ponto médio da curva analítica sempre é injetado entre um conjunto de 10 amostras. Caso haja variação maior do que 5 % da concentração real do padrão analítico quantificado, uma nova curva analítica é preparada e analisada nas mesmas condições de análise as quais as amostras são submetidas.

Tabela 10 – Curvas analíticas obtidas na faixa linear de trabalho de 150 a 4500 ng mL⁻¹

| Equação da reta | r | Observações |
|-----------------------|--------|-------------|
| $y = 17688x + 780,63$ | 0,9966 | 1º dia |
| $y = 14987x - 980,11$ | 0,9989 | 2º dia |
| $y = 12924x + 519,51$ | 0,9995 | 3º dia |

5.3.2 LD e LQ

Os LD e o LQ (do instrumento) foram calculados a partir da equação das 3 curvas de calibração (Tabela 10), (Equação 4), (Equação 5). Já para a determinação dos LD_M e LQ_M (do método) foram calculados da mesma forma, porém levando em consideração o fator de pré-concentração (FC) dos métodos otimizados, que foram de 500 vezes para a ELL e EFS e 50 vezes para a MEDLL (Tabela 11). Tanto os LD e o LQ (do instrumento) quanto os LD_M e LQ_M (do método) foram confirmados analiticamente.

Tabela 11 – LD e LQ (instrumento) e LD_M e LQ_M (método) (ng mL⁻¹) calculado com base em 3 curvas de calibração

| Equação da reta | DPa ¹ | \overline{IC} ² | Instrumento (ng mL ⁻¹) | Métodos (ng mL ⁻¹) | | |
|-----------------------|------------------|------------------------------|---------------------------------------|---|---|--|
| y= 17688x + 780,60 | | | | ELL ³ | EFS ³ | MEDLL ⁴ |
| y= 14987x - 980,11 | 230,9864 | 15199,67 | LD = 40 LQ = 150 | LD _M = 0,08 LQ _M = 0,3 | LD _M = 0,08 LQ _M = 0,3 | LD _M = 0,8 LQ _M = 3,0 |
| y= 12924x + 519,51 | | | | | | |

¹ Desvio padrão do intercepto com o eixo dos "y"; ² Inclinação da curva de calibração

³ Levando em consideração um fator de concentração de 500 vezes; ⁴ Levando em consideração um FC de 50 vezes

Os resultados de LD (40 ng mL⁻¹) e LQ (150 ng mL⁻¹), e LD_M (EFS e ELL: 0,08 ng mL⁻¹; MEDLL: 0,8 ng mL⁻¹) e LQ_M (EFS e ELL: 0,3 ng mL⁻¹; MEDLL: 3 ng mL⁻¹) considerando o fator de concentração (FC) dos métodos (ELL e EFS de 500 vezes; e MEDLL de 50 vezes) obtidos nesse estudo comprovam a sensibilidade e aplicabilidade do método, tendo se mostrado mais sensíveis que outros resultados apresentados na literatura (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação de alguns resultados encontrados na literatura para a quantificação de $n\text{-C}_{60}$ em matriz aquosa

| Método Extração | Instrumento/ Detector | Faixa de trabalho (ng mL ⁻¹) | % Rec. | LD (ng mL ⁻¹) | Matriz | Preparo $n\text{-C}_{60}$ com solvente | Tempo agitação | Referencias |
|-----------------|-----------------------|--|---------------|---------------------------|------------------------------|--|----------------|-------------------------------|
| ELL | CLAE UV/Vis | NI* | 94 a 100 | 0,34 | Água ultra pura | sim | NI* | Xia <i>et al.</i> (2006) |
| ELL | CL/EM | 0,5 a 1,5 | 93 ± 7 | 0,40 | Água doce | NI* | NI* | Isaacson <i>et al.</i> (2007) |
| ELL | CLAE/ DAD | NI* | 84 ± 11,5 | 0,86 | Águas superf. e subterrâneas | não | 13 dias | Bouchard & Ma (2008) |
| ELL | CL/EM | 1600 a 16000 | 39 ± 2 | 2,8 | Água ultra pura | sim | NI* | Chen <i>et al.</i> (2008) |
| ELL | CLAE UV/Vis | 20 a 60 | 89 a 99 ± 2 | 3,0-4,0 | Água ultra pura | sim | NI* | Wang <i>et al.</i> (2010) |
| ELL | CLAE UV/Vis | 150 a 4500 | 72,3 a 85,6 | 0,08 | Água ultra pura | não | 15-60 dias | Este estudo |
| EFS | CLAE/ DAD | NI* | 95 | 0,75 | Água ultra pura | não | 13 dias | Bouchard & Ma (2008) |
| EFS | CL/EM | 0,5 a 5 | 39 ± 2,9 | 0,30 | Água ultra pura | sim | NI* | Chen <i>et al.</i> (2008) |
| EFS | CLAE UV/Vis | 150 a 4500 | 86,10 a 115,5 | 0,08 | Água ultra pura | não | 15-60 dias | Presente estudo |

* NI: Não Indicado, CL: Cromatografia Líquida, EM: Espectrofotometria de massa

5.3.3 Precisão

Os resultados dos ensaios de precisão (intermediária - % RSD_{pi} e repetitividade - % RSD_r) estão apresentados na Tabela 13. Os ensaios de precisão do instrumento apresentaram valores de repetitividade (% RSD_r) variando entre 0,69 e 3,29% e de precisão intermediária (% RSD_{pi}) entre 0,57 e 3,55%.

Tabela 13 – Resultados dos ensaios de precisão (média \pm desvio padrão) obtidos para o instrumento e os distintos métodos (n = 3)

| Concentração (ng mL ⁻¹) | Instrumento | | ELL | | EFS | | MEDLL | |
|--|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | (% RSD_r) | (% RSD_{pi}) | (% RSD_r) | (% RSD_{pi}) | (% RSD_r) | (% RSD_{pi}) | (% RSD_r) | (% RSD_{pi}) |
| 150 | 3,29 \pm | 0,57 \pm | 3,59 \pm | 4,03 \pm | 1,50 \pm | 0,46 \pm | 2,10 \pm | 1,65 \pm |
| | 1,44 | 1,40 | 1,41 | 1,41 | 1,41 | 1,40 | 1,42 | 1,42 |
| 300 | 0,69 \pm | 3,55 \pm | 6,45 \pm | 0,76 \pm | 0,98 \pm | 1,64 \pm | 2,05 \pm | 1,88 \pm |
| | 1,36 | 1,38 | 1,35 | 1,31 | 1,35 | 1,32 | 1,32 | 1,35 |
| 3000 | 0,93 \pm | 1,30 \pm | 1,10 \pm | 0,90 \pm | 2,73 \pm | 1,25 \pm | 1,28 \pm | 0,20 \pm |
| | 0,10 | 0,32 | 0,29 | 0,06 | 0,13 | 0,14 | 0,80 | 0,86 |

Considerando a precisão dos métodos, para a ELL os valores de % RSD_r ficaram entre 1,10 \pm 0,29 a 6,45 \pm 1,35% e entre 0,76 \pm 1,31 e 4,03 \pm 1,41% para a % RSD_{pi} . Para a EFS, os valores ficaram entre 0,98 \pm 1,35 a 2,73 \pm 0,13% para a % RSD_r e 0,46 \pm 1,40 a 1,64 \pm 1,32% para a % RSD_{pi} . Na MEDLL, os resultados ficaram entre 1,28 \pm 0,80 a 2,10 \pm 1,42% para a RSD_r e 0,20 \pm 0,86 a 1,88 \pm 1,35% para a RSD_{pi} . Os três métodos de extração (ELL, EFS e MEDLL) apresentaram resultados semelhantes para a precisão (tanto repetitividade como intermediária). Na ELL, entretanto, há dificuldades operacionais na coleta do extrato e a possibilidade de retenção de partículas do extrato nas paredes do funil de separação, pois o extrator (tolueno) ao entrar em contato com a matriz (água) forma uma camada gordurosa nas paredes do funil, propiciando a perda de uma pequena parte do extrato. Apesar disso, os resultados obtidos para a ELL estão dentro dos limites aceitáveis, conforme literatura que recomenda um valor de $RSD \leq 20\%$ quando se trabalha em nível de traço ou com amostras complexas (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; Ribani *et al.*, 2004), como o caso das suspensões de fulereno, onde o comportamento varia de acordo com o tamanho dos agregados.

5.3.4 Exatidão

Os testes para a exatidão foram expressos em % de recuperação e desvio padrão e estão apresentados na Tabela 14. Os resultados obtidos estão dentro da faixa aceitável que é de 70 a 120 % (INMETRO, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Lanças, 2009), indicando que os métodos são confiáveis.

Tabela 14 – Dados dos ensaios de exatidão (média \pm desvio padrão) obtidos para os distintos métodos (n=3)

| Concentração (ng mL ⁻¹) | Métodos | | |
|--|------------------|------------------|-------------------|
| | <i>ELL</i> | <i>EFS</i> | <i>MEDLL</i> |
| 150 | 72,3 \pm 11,03 | 115,5 \pm 7,08 | 106,93 \pm 5,12 |
| 300 | 85,6 \pm 18,13 | 106,7 \pm 4,23 | 111,44 \pm 8,91 |
| 3000 | 76,6 \pm 10,13 | 86,1 \pm 6,16 | 87,88 \pm 4,41 |

5.4 Caracterização físicas das suspensões de *n*-C₆₀

As imagens da caracterização física, por microscopia atômica tipo varredura por sonda (MVS), das suspensões de *n*-C₆₀ preparadas sem aquecimento (SA_60d) e com aquecimento (CA_60d) após 60 dias de agitação são apresentadas nas Figura 13 e Figura 14, respectivamente. As dimensões físicas das partículas de *n*-C₆₀ nas soluções analisadas mostraram que a suspensão sem aquecimento (SA_60d) formou agregados maiores, com tamanhos entre 17,1 e 76,7 nm (média de $\sim 46,9 \pm 29,8$ nm). Já para a suspensão com aquecimento (CA_60d), o tamanho dos agregados ficou entre 3,9 e 31,3 nm (média de $\sim 17,6 \pm 13,7$ nm). Essa diferença se explica, pois a aplicação da temperatura permitiu uma maior desordem dos íons presentes na suspensão, alterando a força atrativa entre as moléculas de C₆₀ e as moléculas de água. Ao modificar o equilíbrio das forças de interação entre o C₆₀ na suspensão aquosa as moléculas modificam seu modo de aglomerar, formando agregados de formas e tamanhos diferentes, sendo que essas alterações são ocasionadas por variáveis como natureza do solvente e temperatura (Nakanishi *et al.*, 2005). O tamanho dos agregados formados nas suspensões aquosas de *n*-C₆₀ são também influenciados por fatores como a concentração inicial do composto na suspensão, o volume de água e a velocidade e o tempo de agitação da suspensão (Duncan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008).

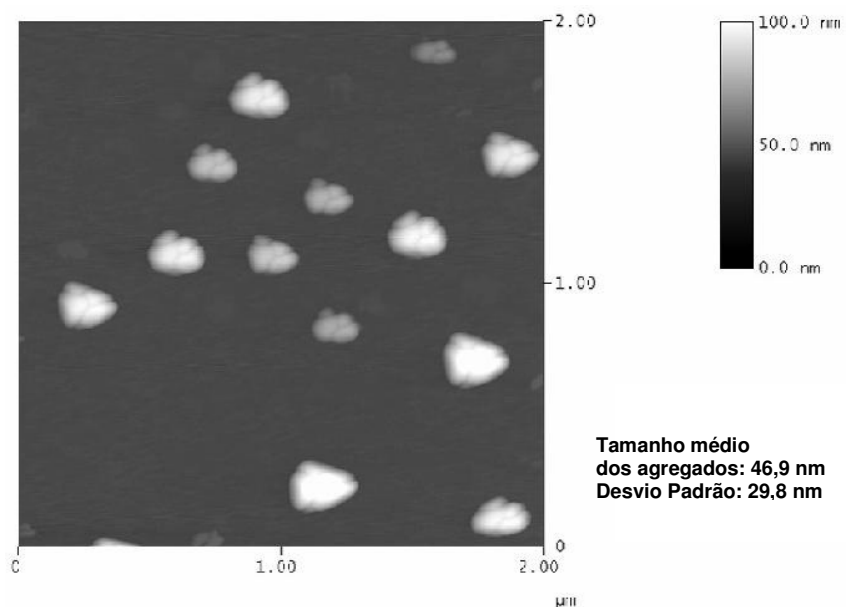


Figura 13: Imagem da caracterização por microscopia atômica tipo varredura por sonda da suspensão de $n\text{-C}_{60}$ preparadas sem aquecimento por 60 dias de agitação (SA_60d)

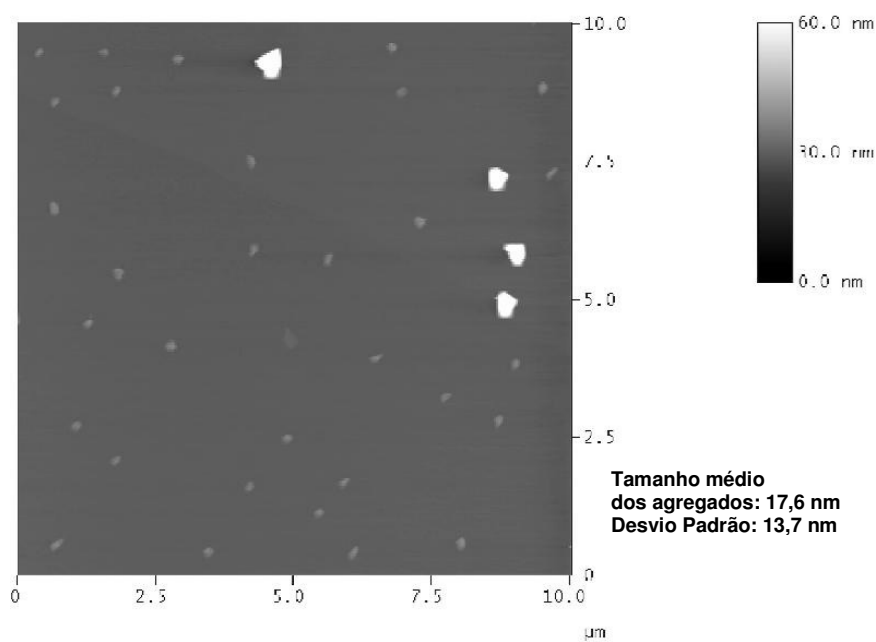


Figura 14: Imagem da caracterização por microscopia atômica tipo varredura por sonda da suspensão de $n\text{-C}_{60}$ preparadas com aquecimento por 60 dias de agitação CA_60d

Segundo a literatura, diferentes tempos são utilizados no preparo das suspensões aquosas (2 semanas a vários meses), bem como o tamanho dos agregados de C_{60} variam em razão de diferentes fatores de preparo (ex.: temperatura, agitação, massa de C_{60} , etc.) (Fortner *et al.*, 2005) (Bouchard & Ma,

2008). Em uma suspensão de $n\text{-C}_{60}$ sem aquecimento com agitação por duas semanas, Dhawan *et al* (2006) encontraram agregados com tamanho médio de 178 nm; Kim *et al* (2010) encontraram agregados com tamanho médio de 370,4 nm em suspensões de $n\text{-C}_{60}$ sem aquecimento com 4 semanas de agitação; Oberdorster *et al* (2006), com uma suspensão de $n\text{-C}_{60}$ preparada com 2 meses de agitação sem aquecimento, obteve agregados entre 10 e 200 nm; Zhu *et al* (2008) obtiveram agregados com tamanho entre 65 e 517 nm em suspensões preparadas com aquecimento (40 °C) e agitadas pelo período de 2 a 4 semanas; e, Lyon *et al* (2006) obtiveram agregados com tamanho entre 30 a 100 nm com uma suspensão preparada a 40 °C e agitação de 2 a 4 semanas. Porém, nenhum dos autores fez a comparação do tamanho dos agregados em relação à temperatura com base em suspensões produzidas nas mesmas condições (de quantidade de massa de C_{60} adicionada à suspensão, volume de água e velocidade de agitação), como foram as apresentadas nesse estudo.

O tamanho dos agregados de $n\text{-C}_{60}$ é um fator determinante em relação ao seu comportamento, visto que pode desempenhar um papel importante sobre a toxicidade. Devido à possibilidade de partição desses agregados em membranas celulares e seu transporte através do corpo humano/animal estar relacionado com o seu tamanho (Chen *et al.*, 2008). Lyon *et al* (2008) ressalta que o C_{60} tem forte atividade antibacteriana e que a intensidade dessa atividade está relacionada com o tamanho do agregado de modo inversamente proporcional, ou seja, agregados de menor tamanho apresentam um nível maior de atividade antibacteriana.

5.5 Análise das suspensões de $n\text{-C}_{60}$

Os métodos otimizados foram aplicados na análise das suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$ descritas anteriormente na Tabela 3. Os resultados na íntegra estão apresentados no Anexo 1 para o método ELL e no Anexo 2 para o método EFS. Entretanto, não foi possível concluir as análises por MEDLL, pois embora o método tenha respondido com níveis satisfatórios quando avaliado perante as figuras de mérito para as amostras fortificadas, se comportou de forma diferente quando avaliado frente às amostras das suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$. Basicamente a relação sinal/ruído foi muito baixa, sendo impossível detectar a presença do composto. O cromatograma referente a essa análise pode ser observado no Anexo 3. Porém, como foi comprovada a presença de C_{60} nas suspensões pelas outras duas técnicas (EFS e ELL) (Anexo 4), presume-se que

seria indispensável fazer uma curva de trabalho, uma vez que a MEDLL é uma técnica de equilíbrio. Os pontos determinados em uma curva de trabalho seriam fortificados na matriz e passariam por todo o processo de extração. Somente então, com esses resultados, seria possível avaliar a técnica MEDLL para o composto C₆₀.

5.5.1 Efeito do tempo, temperatura e método analítico

A média das concentrações das suspensões preparadas por diferentes tempos de agitação, com aquecimento (CA) e extraídas por EFS foi 1,15 ng mL⁻¹ (após 15 dias de agitação), 1,18 ng mL⁻¹ (30 dias), 1,25 ng mL⁻¹ (45 dias) e 1,00 ng mL⁻¹ (60 dias) (Figura 15). A análise estatística indicou que não houve diferença significativa nas concentrações médias das suspensões preparadas com aquecimento (CA) e extraídas por EFS após 15 dias em relação aos demais tempos de agitação (30,45 e 60 dias). Entretanto, foi observada diferença nos tempos de 30 e 45 dias em relação aos 60 dias (Tabela 15).

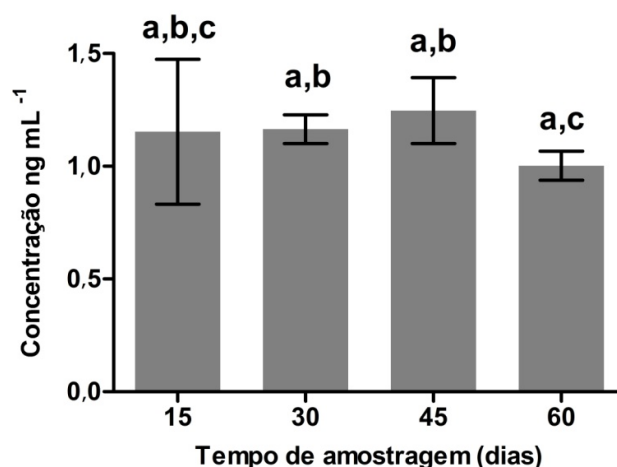


Figura 15: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C₆₀ nas suspensões preparadas com aquecimento (CA) e extraídas por EFS (n=3).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 15 – Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de $n\text{-C}_{60}$ preparadas com aquecimento (CA) em relação ao tempo de preparo e aos métodos de extração EFS e ELL

| Tempo | EFS | | | ELL | | |
|---------|--------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|
| | 30 dias | 45 dias | 60 dias | 30 dias | 45 dias | 60 dias |
| 15 dias | = p (0,2581) | = p (0,9647) | = p (0,2581) | 15 dias = p (0,0927) | ≠ p (0,0004) | = p (1,0000) |
| 30 dias | | = p (0,2161) | ≠ p (0,0031) | 30 dias | ≠ p (0,0004) | = p (0,2505) |
| 45 dias | | | ≠ p (0,0378) | 45 dias | | ≠ p (0,0243) |

Na suspensão preparada com aquecimento (CA) e extraída por ELL, a média das concentrações das alíquotas coletadas após 15 dias de agitação foi de $0,74 \text{ ng mL}^{-1}$, após 30 dias de $0,81 \text{ ng mL}^{-1}$, após 45 dias de $0,41 \text{ ng mL}^{-1}$ e após 60 dias de $0,70 \text{ ng mL}^{-1}$ (Figura 16). A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa das concentrações médias das suspensões com aquecimento por ELL após 15 dias de agitação quando comparadas aos tempos de 30 e 60 dias (Tabela 15). Entretanto, foi observada uma redução significativa da média na alíquota coletada após 45 dias. Neste caso, acredita-se que houve um problema amostral referente a essa alíquota, ocasionando assim uma interferência no resultado final das análises.

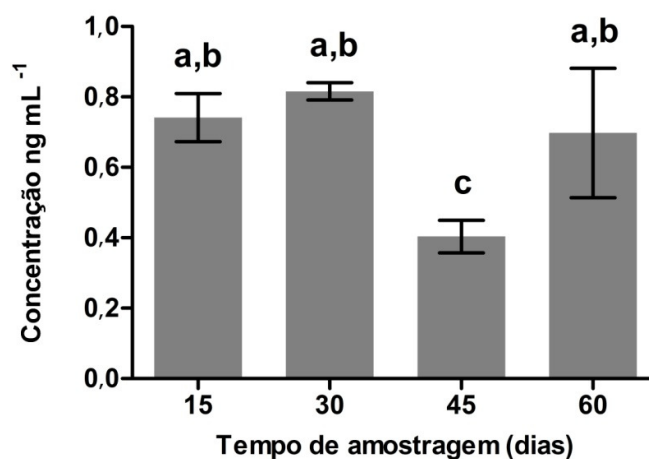


Figura 16: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de $n\text{-C}_{60}$ nas suspensões preparadas com aquecimento (CA) e extraídas por ELL ($n=3$).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A média das concentrações das suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e extraídas por EFS foi de 1,46 ng mL⁻¹ após 15 dias de agitação, de 1,54 ng mL⁻¹ após 30 dias, de 1,59 ng mL⁻¹ após 45 dias e de 1,63 ng mL⁻¹ após 60 dias (Figura 17). A análise estatística das médias das concentrações das suspensões indicou diferença significativa somente no tempo de 15 dias em relação aos demais tempos (30, 45 e 60 dias) (Tabela 16).

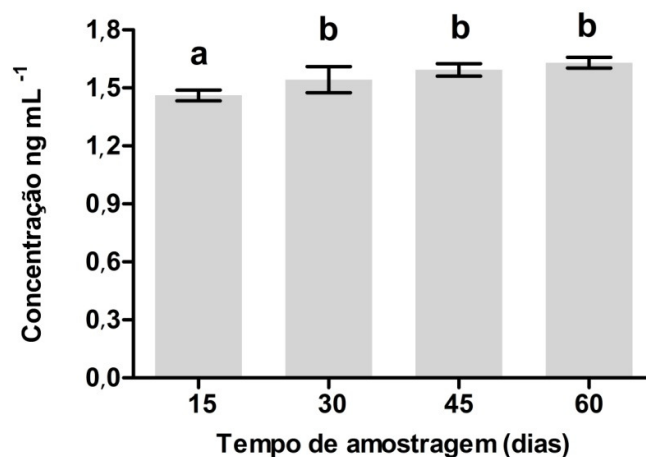


Figura 17: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de *n*-C₆₀ nas suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e extraídas por EFS (n=3).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 16 - Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de *n*-C₆₀ preparadas sem aquecimento (SA) em relação ao tempo de preparo e aos métodos de extração EFS e ELL

| Tempo | EFS | | | ELL | | |
|---------|----------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------|----------------------|
| | 30 dias | 45 dias | 60 dias | 30 dias | 45 dias | 60 dias |
| 15 dias | $\neq p$ (0,0416) | $\neq p$ ($<0,0001$) | $\neq p$ ($<0,0001$) | 15 dias $= p$ (0,5922) | $= p$ (0,7675) | $= p$ (0,3884) |
| 30 dias | | $= p$ (0,2157) | $= p$ (0,0512) | 30 dias | $= p$ (0,0756) | $\neq p$ (0,0004) |
| 45 dias | | | $= p$ (0,0921) | 45 dias | | $\neq p$ (0,0212) |

A concentração média das alíquotas das suspensões de *n*-C₆₀ preparada sem aquecimento (SA) e extraída por ELL foi de 0,38 ng mL⁻¹ após 15 dias de agitação, de 0,32 ng mL⁻¹ após 30 dias, de 0,37 ng mL⁻¹ após 45 dias e de 0,43 ng mL⁻¹ após 60 dias (Figura 18). A análise estatística das médias das

concentrações das suspensões no tempo de 15 dias não apresentou nenhuma diferença significativa em relação aos demais tempos (30,45 e 60 dias), sendo constatada diferença significativa somente no tempo de 30 e 45 dias em relação aos 60 dias (Tabela 16).

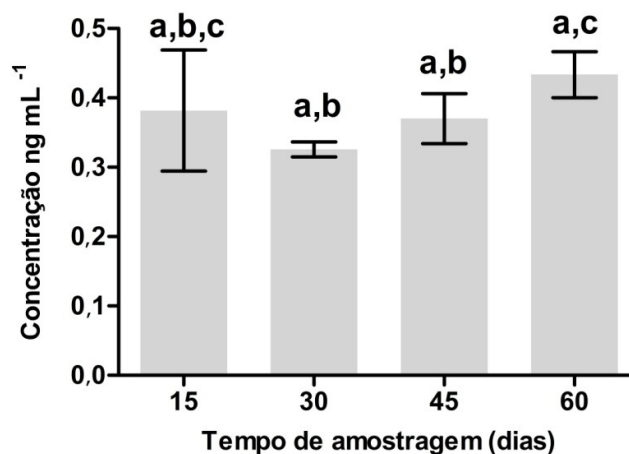


Figura 18: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C₆₀ nas suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e extraídas por ELL (n=3).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em relação à concentração das suspensões preparadas em função da temperatura (Tabela 17) observou-se diferença significativa entre todas as concentrações médias das alíquotas sem (SA) e com (CA) aquecimento coletadas aos 15, 30, 45 e 60 dias e extraídas por EFS (Figura 19). As concentrações das suspensões sem aquecimento foi significativamente maior que as suspensões preparadas com aquecimento para a EFS. Nas suspensões analisadas por ELL também houve diferença significativa quando submetidas à análise estatística das concentrações médias das alíquotas coletadas aos 15, 30 e 60 dias (Figura 20), porém neste caso as concentrações das suspensões preparadas SA foram menores do que as com aquecimento (CA). Isso pode ser justificado em razão da suspensão preparada com aquecimento (CA) formar agregados de menor tamanho e o seu particionamento entre a fase aquosa e orgânica pode ter sido favorecido, aumentando assim a eficiência de extração pela técnica de ELL em relação às suspensões preparadas sem aquecimento (SA), que formam agregados maiores.

Tabela 17 - Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de $n\text{-C}_{60}$ preparadas por diferentes tempos e analisadas por EFS e ELL em relação à temperatura (sem (SA) e com (CA) aquecimento)

| SA x CA | EFS | ELL |
|---------|--------------------|-------------------|
| | 15 dias | $\neq p (0,0431)$ |
| 30 dias | $\neq p (0,0004)$ | $\neq p (0,0004)$ |
| 45 dias | $\neq p (<0,0001)$ | $= p (0,1702)$ |
| 60 dias | $\neq p (0,0004)$ | $\neq p (0,0431)$ |

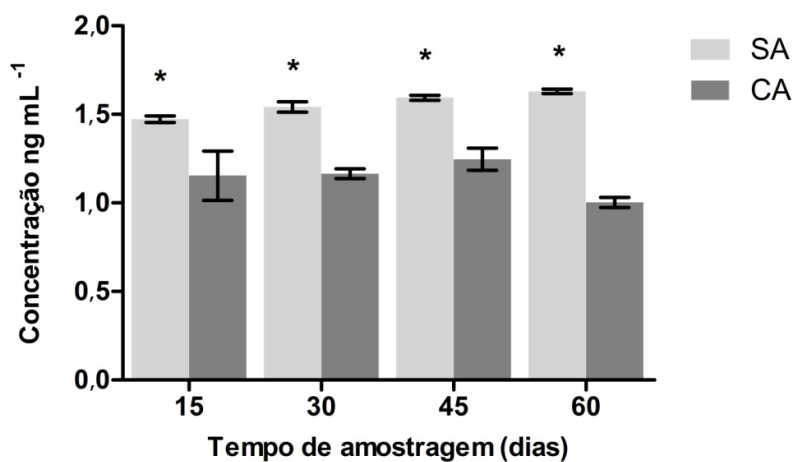


Figura 19: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de $n\text{-C}_{60}$ nas suspensões preparadas sem (SA) e com aquecimento (CA) e analisadas por EFS ($n=3$).

A presença do asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da suspensão SA em relação a CA na mesma escala temporal.

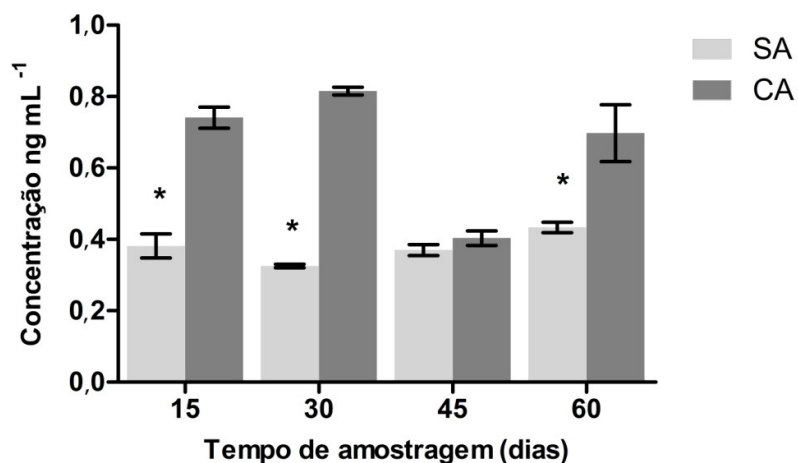


Figura 20: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de $n\text{-C}_{60}$ nas suspensões preparadas sem (SA) e com aquecimento (CA) e analisadas por ELL ($n=3$).

O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da suspensão SA em relação a CA na mesma escala temporal.

Ao comparar a eficiência dos métodos de extração por ELL e EFS para ambos os tratamentos, sem aquecimento (Figura 21) e com aquecimento (Figura 22), observa-se que todas as concentrações médias obtidas (nos tempos de 15, 30, 45 e 60 dias) nas análises por EFS foram significativamente maiores do que as obtidas utilizando a ELL (Tabela 18). Foi observado que a temperatura interferiu na formação e conseqüente tamanho dos agregados de $n\text{-C}_{60}$. A EFS foi considerada a técnica mais eficiente para a determinação da concentração das suspensões de $n\text{-C}_{60}$, independente do tratamento aplicado (com ou sem temperatura). Estes resultados encontrados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, que apontam a EFS como uma técnica mais eficiente para a análise de C_{60} (Bouchard & Ma, 2008; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Além de uma maior eficiência, a EFS apresentou também um melhor desempenho em relação ao desenvolvimento do processo, pois a possibilidade de processar várias amostras ao mesmo tempo foi relevante no desenvolvimento desse trabalho. Entretanto, cabe ressaltar que apesar da EFS ter sido considerada a melhor das técnicas testadas para a extração do C_{60} em matriz aquosa e sendo essa uma técnica bastante precisa, não é possível garantir que os valores obtidos sejam exatos, pois é fato que nenhuma das demais técnicas testadas confirmou as concentrações medidas por EFS.

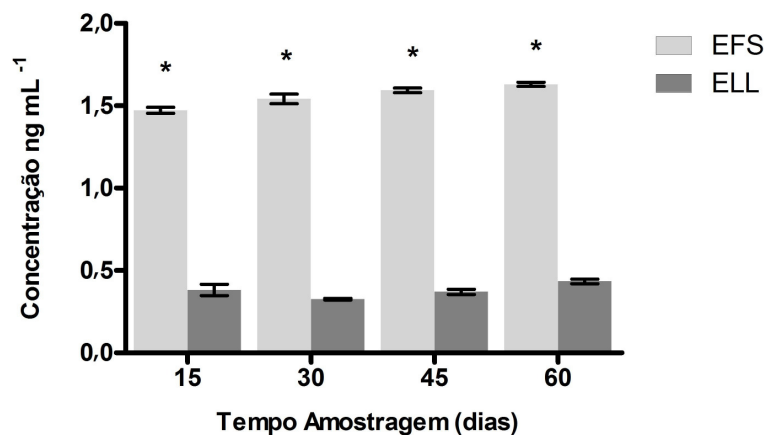


Figura 21: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C₆₀ nas suspensões preparadas sem aquecimento (SA) e analisadas por ELL e EFS (n=3).

O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação às técnicas na mesma escala temporal.

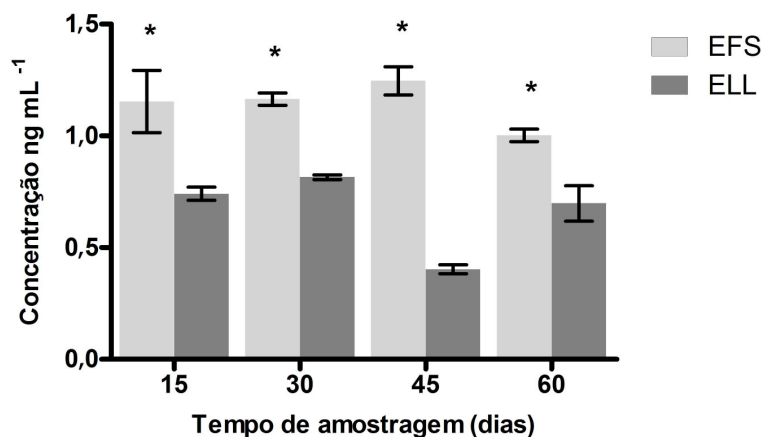


Figura 22: Média (\pm intervalo de confiança 95%) das concentrações de n-C₆₀ nas suspensões preparadas com aquecimento (CA) e analisadas por ELL e EFS (n=3).

O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação às técnicas na mesma escala temporal.

Tabela 18 - Análise estatística referente aos dados analíticos das suspensões de n-C₆₀ preparadas por diferentes tempos e temperatura em relação aos métodos de extração

| EFS x ELL | SA | CA |
|-----------|--------------------|-------------------|
| 15 dias | $\neq p (0,0004)$ | $\neq p (0,0419)$ |
| 30 dias | $\neq p (0,0004)$ | $\neq p (0,0004)$ |
| 45 dias | $\neq p (<0,0001)$ | $\neq p (0,0004)$ |
| 60 dias | $\neq p (0,0004)$ | $\neq p (0,0036)$ |

5.6 Integração dos parâmetros avaliados

É interessante a diferença de comportamento das suspensões de $n\text{-C}_{60}$ em relação às análises feitas para a validação dos métodos. Apesar das soluções de C_{60} se comportarem de forma linear no solvente, apresentando pouca variabilidade entre as réplicas, o mesmo não é observado para as suspensões preparadas em meio aquoso. Neste caso, as diferenças das concentrações entre as réplicas, tanto para as suspensões de $n\text{-C}_{60}$ com aquecimento quanto para as sem aquecimento, acarretou em um intervalo de confiança entre as médias muito amplo. Essa alta variabilidade dos resultados pode ser explicada pela baixa solubilidade do C_{60} em água, pois em contato com água o composto tende a formar agregados, constituindo uma suspensão, na qual as moléculas do C_{60} não estão totalmente dissolvidas no meio, e sim em pequenas partículas ($n\text{-C}_{60}$). No momento em que foram coletadas as alíquotas, por mais homogêneas que estivessem às partículas na suspensão, a distribuição dos agregados não é totalmente uniforme (Junior & Varanda, 1999). Essa informação foi confirmada por Bouchard & Ma (2008), que observaram que a massa de fulereno presente no agregado de $n\text{-C}_{60}$ varia muito e depende do seu tamanho. Consequentemente, seu tamanho e forma de agregação dependem do modo de preparo da suspensão, como por exemplo, a taxa de adição de água na suspensão define diretamente o tamanho do agregado formado (Fortner *et al.*, 2005). Outro fator que contribui para essa diferença é que a concentração de agregados em relação à molécula de C_{60} em suspensão é baixa, indicando que pouco fulereno é incorporado aos agregados (Hyung & Kim, 2009). Portanto, a variação do tamanho dos agregados, a diferença de massa presente em cada um e a não homogeneidade das partículas na suspensão podem justificar essa variação observada nos resultados obtidos.

A variável temperatura aplicada no preparo das suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$ mostrou ser um parâmetro importante a ser considerado. A aplicação de uma temperatura mais elevada no preparo das suspensões aquosas é relevante no processo de agregação das partículas de $n\text{-C}_{60}$, reduzindo significativamente o tamanho dos agregados. Da mesma forma, uma temperatura mais elevada no preparo das suspensões aquosas também ocasionou uma diminuição na concentração final medida nestas suspensões, seja por uma real diminuição na solubilidade do C_{60} , seja pela influência do tamanho das partículas. Isso foi confirmado pela técnica de extração de fase sólida (EFS), a qual foi considerada a melhor dentre as técnicas de extração testadas. Fortner *et al* (2005) e Bouchard &

Ma (2008) já haviam relatado que variáveis como temperatura e velocidade de agitação podem ocasionar diferenças na formação dos agregados de $n\text{-C}_{60}$. Lyon *et al* (2006) também afirmam que suspensões preparadas considerando diferentes variáveis (solvente, temperatura e agitação) podem ocasionar discrepância na determinação da concentração. Apesar disso, estes resultados não podem ser considerados conclusivos, pois não está claro que os estudos foram realizados sob as mesmas condições experimentais. Portanto, o fato do presente estudo haver sido realizado sob as mesmas condições de preparação de suspensões, processamento das amostras e métodos analíticos confirma que a temperatura exerce influência no tamanho dos agregados e na concentração de $n\text{-C}_{60}$ das suspensões aquosas analisadas.

6. CONCLUSÕES

1. A extração de fase sólida (EFS) foi a técnica de extração e pré-concentração que apresentou a melhor eficiência dentre os métodos testados para a análise das suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$;
2. Apesar de terem apresentado valores aceitáveis para as figuras de mérito avaliadas com soluções padrão de C_{60} em solvente, os métodos de extração e pré-concentração por ELL e MEDLL não responderam de forma satisfatória quando aplicadas às suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$;
3. A temperatura aplicada na preparação das suspensões aquosas se mostrou relevante no processo de agregação das partículas de $n\text{-C}_{60}$, reduzindo significativamente o tamanho dos agregados, o que pode modificar o seu comportamento e comprometer os resultados de estudos toxicológicos e ambientais;
4. A aplicação de uma temperatura mais elevada no preparo das suspensões aquosas também ocasionou uma diminuição na concentração final medida nestas suspensões, seja por uma real diminuição na solubilidade do C_{60} , ou pela influência do tamanho das partículas nas técnicas empregadas na sua análise;
5. Como o tempo não influenciou significativamente na concentração final recomenda-se que as suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$ sejam preparadas sem aquecimento por um período de agitação entre 30 e 45 dias.

7. RECOMENDAÇÕES FUTURAS

1. Complementar os estudos de validação do método MEDLL através da avaliação das respostas analíticas do C_{60} em curvas de trabalho preparadas na matriz aquosa;
2. Avaliar as características físicas (dimensões) e a estabilidade (potencial zeta) dos agregados formados, a fim de confirmar se a redução do tempo de preparo de 60 para 30-45 dias realmente não influencia nas características das suspensões aquosas de $n\text{-C}_{60}$;
3. Avaliar a influência do efeito matriz nas análises de diferentes matrizes ambientais (sedimento e biota);
4. Comprovar se a redução do tamanho dos agregados formados durante o preparo das suspensões aquosas com aquecimento influencia na toxicidade do C_{60} ;

5. Otimizar e validar um método para a análise de fulereno C₆₀ em matriz biológica, visando confirmar os níveis deste composto nos tecidos de organismos expostos durante estudos ecotoxicológicos.

REFERÊNCIAS

- Amador, C.H.S. (2006). Sistemas de fullereno C60 dopados com átomos covalentes e metais de transição: Uma investigação computacional. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas,
- Andrievsky, G.V., Klochkov, V.K., Karyakina, E.L., and Hedlov-Petrosyan, N.O. Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C60 by electron microscopy. **Chemical Physics Letters** 300, 392-396.1999
- Andrievsky, G.V., Kosevich, M.V., Vovk, O.M., Shelkovsky, V.S., and Vashchenko, L.A. Are Fullerenes Soluble in Water? **The Electrochemical Society** 1591-1602.1995
- ANVISA. Resolução nº 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 de Junho de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.pho?id=15132&word>>. Acesso em 08/01/2009.2003
- Arbogast, J.W., Darmanyan, A.P., Foote, C.S., Rubin, Y., Diederich, F.N., Alvarez, M.M., Anz, S.J., and Whetten, R.L. Photophysical Properties of C60. **Journal of Physical Chemistry** 95, 11-12.1991
- Baena, J.R., Gallego, M., and Valcarcel, M. Fullerenes in the analytical sciences. **Trac-Trends in Analytical Chemistry** 21, 187-198.2002
- Birjandi, A.P., Bidari, A., Rezaei, F., Hosseini, M.R.M., and Assadi, Y. Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A** 1193, 19-25.2008
- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., Balzarini, J., and Prato, M. Synthesis and anti-HIV properties of new water-soluble bis-functionalized[60]fullerene derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 13, 4437-4440.2003
- Bouchard, D. and Ma, X. Extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of C60, C70, and [6,6]-phenyl C61-butyric acid methyl ester in synthetic and natural waters. **Journal of Chromatography A** 1203, 153-159.2008
- Brant, J., Lecoanet, H., and Wiesner, M.R. Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. **Journal of Nanoparticle Research** 7, 545-553.2005
- Caldas, S.S., Costa, F.P., and Primel, E.G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta** 665, 55-62.2010
- Cass. and Degani. Desenvolvimentos de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos/SP. 77 p.2001
- Chen, K.L. and Elimelech, M. Aggregation and deposition kinetics of fullerene (C-60) nanoparticles. **Langmuir** 22, 10994-11001.2006
- Chen, Z., Westerhoff, P., and Herckes, P. Quantification of C-60 fullerene concentrations in water. **Environmental Toxicology and Chemistry** 27, 1852-1859.2008
- Chibante, L.P.F., Thess, A., Alford, J.M., Diener, M.D., and Smalley, R.E. Solar Generation of the Fullerenes. **Journal of Physical Chemistry** 97, 8696-8700.1993
- Collins, C.H., Braga, G., and Bonato P.S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas/SP. 453 p.2007

- Colvin, V.L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. **Nature Biotechnology** 21, 1166-1170.2003
- Custódio, R., de Andrade, J.C., and Augusto, F. O Ajuste de Funções Matemáticas a Dados Experimentais. **Química Nova** 20, 219-225.1997
- Daneshfar, A., Khezeli, T., and Lotfi, H.J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B** 877, 456-460.2009
- Deguchi, S., Alargova, R.G., and Tsujii, K. Stable dispersions of fullerenes, C-60 and C-70, in water. Preparation and characterization. **Langmuir** 17, 6013-6017.2001
- Deye, J.R., Shiveley, A.N., Oehrle, S.A., and Walters, K.A. Separation of substituted fullerenes using non-aqueous reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1181, 159-161.2008
- Duncan, L.K., Jinschek, J.R., and Vikesland, P.J. C-60 colloid formation in aqueous systems: Effects of preparation method on size, structure, and surface, charge. **Environmental Science & Technology** 42, 173-178.2008
- Faria, L.J.S. (2004). Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia. Unicamp - Campinas/SP, 79 p.
- Filho, A.G.S. and Fagan, S.B. Funcionalização de Nanotubos de Carbono. **Química Nova** 30, 1695-1703.2007
- Fortner, J.D., Lyon, D.Y., Sayes, C.M., Boyd, A.M., Falkner, J.C., Hotze, E.M., Alemany, L.B., Tao, Y.J., Guo, W., Ausman, K.D., Colvin, V.L., and Hughes, J.B. C-60 in water: Nanocrystal formation and microbial response. **Environmental Science & Technology** 39, 4307-4316.2005
- García-Lopes, M., Rodríguez, I., and Cela, R. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. **Journal of Chromatography A** 1166, 9-15.2007
- Guldi, D.M. and Prato, M. Excited-state properties of C-60 fullerene derivatives. **Accounts of Chemical Research** 33, 695-703.2000
- Harris, D.C. Análise Gravimétrica por Combustão. In: LTC (eds.), Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro-RJ. pp. 667-676.2001
- Hasselov, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., and Tiede, K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. **Ecotoxicology** 17, 344-361.2008
- Heymann, D. Solubility of fullerenes C-60 and C-70 in seven normal alcohols and their deduced solubility in water. **Fullerene Science and Technology** 4, 509-515.1996
- Hirsch, A. Chemistry of Fullerenes. **Chemie in Unserer Zeit** 28, 79-87.1994
- Hyung, H. and Kim, J.H. Dispersion of C-60 in natural water and removal by conventional drinking water treatment processes. **Water Research** 43, 2463-2470.2009
- Imahori, H. and Sakata, Y. Donor-linked fullerenes: Photoinduced electron transfer and its potential application. **Advanced Materials** 9, 537-&.1997
- INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ - CGCRE-008**: Orientações Sobre Validação dos Métodos de Ensaio Químicos. **Brasília, 35p.2003**

- INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ - CGCRE-008**: Orientações Sobre Validação dos Métodos de Ensaios Químicos. **Brasília, 20p.2011**
- Isaacson, C.W., Usenko, C.Y., Tanguay, R.L., and Field, J.A. Quantification of Fullerenes by LC/ESI-MS and Its Application to in Vivo Toxicity Assays. **Analytical Chemistry** 79, 9091-9097.2007
- Jafvert, C.T. and Kulkarni, P.P. Buckminsterfullerene's (C-60) octanol-water partition coefficient (K_{ow}) and aqueous solubility. **Environmental Science & Technology** 42, 5945-5950.2008
- Junior, M.J. and Varanda, L.C. O mundo dos coloides. **Química Nova** 9, 9-13.1999
- Kim, K.T., Jang, M.H., Kim, J.Y., and Kim, S.D. Effect of preparation methods on toxicity of fullerene water suspensions to Japanese medaka embryos. **Science of The Total Environment** 408, 5606-5612.2010
- Kroto, H.W., Heater, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., and Smalley, R.E. C60: Buckminsterfullerene. **Nature** 318, 162-163.1985
- Lanças, F.M. Extração em Fase Sólida (SPE). São Carlos-SP. 96 p.2004
- Lanças, F.M. Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE. Campinas-SP. 382 p.2009
- Liang, P., Xu, J., and Li, Q. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. **Analytica Chimica Acta** 609, 53-58.2008
- Lyon, D.Y., Adams, L.K., Falkner, J.C., and Alvarez, P.J.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size. **Environmental Science & Technology** 40, 4360-4366.2006
- Moore, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International** 32, 967-976.2006
- Murthy, C.N., Patel, R.R., Murali, R., and Rakshit, A.K. [60]Fullerene in Water: Microemulsion and Nanophase Formation. **Journal of Chemical and Engineering Data** 55, 4479-4484.2010
- Nakanishi, T., Schmitt, W., Michinobu, T., Kurth, D.G., and Ariga, K. Hierarchical supramolecular fullerene architectures with controlled dimensionality. **Chemical Communications** 5982-5984.2005
- Oberdorster, E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C-60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. **Environmental Health Perspectives** 112, 1058-1062.2004
- Oberdorster, E., Zhu, S.Q., Blickley, T.M., Clellan-Green, P., and Haasch, M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C-60) on aquatic organisms. **Carbon** 44, 1112-1120.2006
- Owen, R. and Depledge, M. Nanotechnology and the environment: Risks and rewards. **Marine Pollution Bulletin** 50, 609-612.2005
- Paschoal, J.A.R., Rath, S., Airoldi, F.P.S., and Reyes, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova** 31, 1190-1198.2008
- Paschoalino, M.P., Marcone, G.P.S., and Jardim, W.F. Os Nanomateriais e a Quetão Ambiental. **Química Nova** 33, 421-430.2010

- Pedroso, R.C.R. (2007). Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS.105p.,
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., and Bendicho, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy** 64, 1-15.2009
- Queiroz, s.C.N., Collins, C.H., and Jardim, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou oncentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova** 24, 68-76.2001
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F., and Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A** 1116, 1-9.2006
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., and Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova** 27, 771-780.2004
- Rocha-Filho, R.C. Os fulerenos e sua espantosa geometria molecular. **Química Nova na Escola** 4, 7-11.1996
- Ruoff, R.S., Tse, D.S., Malhotra, R., and Lorents, D.C. Solubility of C-60 in A Variety of Solvents. **Journal of Physical Chemistry** 97, 3379-3383.1993
- Santos, L.J., Rocha, G.P., Alves, R.B., and Freitas, R.P. Fulereo [C60]: Química e Aplicações. **Química Nova** 33, 680-693.2010
- Sayes, C.M., Fortner, J.D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A.M., Ausman, K.D., Tao, Y.J., Sitharaman, B., Wilson, L.J., Hughes, J.B., West, J.L., and Colvin, V.L. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. **Nano Letters** 4, 1881-1887.2004
- Sayes, C.M., Gobin, A.M., Ausman, K.D., Mendez, J., West, J.L., and Colvin, V.L. Nano-C-60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. **Biomaterials** 26, 7587-7595.2005
- Souza, J.J. (2006). Nano osciladores formados por fulerenos e nanotubos: Uma investigação teórica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Física.Universidade Federal da Bahia. Salvador/BA.131p.,
- Swartz, M.E. and Krull, I. Guidelines available for development, validation of analytical methods - Response. **Lc Gc-Magazine of Separation Science** 16, 90.1998
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., and Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry** 74, 835-855.2002
- Valcarcel, M., Simonet, B.M., and Cardenas, S. Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 391, 1881-1887.2008
- Vollhardt and Peter. Benzeno e Aromaticidade: Substituição Eletrofílica em Aromáticos. In: Bookman (eds.), Química Orgânica Estrutura e Função. Porto Alegre/RS. pp. 547-583.2004
- Wang, C., Shang, C., and Westerhoff, P. Quantification of fullerene aggregate nC(60) in wastewater by high-performance liquid chromatography with UV-vis spectroscopic and mass spectrometric detection. **Chemosphere** 80, 334-339.2010
- Xia, X.R., Monteiro-Riviere, N.A., and Riviere, J.E. Trace analysis of fullerenes in biological samples by simplified liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1129, 216-222.2006

- Xie, B., Xu, Z.H., Guo, W.H., and Li, Q.L. Impact of natural organic matter on the physicochemical properties of aqueous C-60 nanoparticles. **Environmental Science & Technology** 42, 2853-2859.2008
- Xie, Q.S., Perezcordero, E., and Echegoyen, L. Electrochemical Detection of C-60(6-) and C-70(6-) - Enhanced Stability of Fullerides in Solution. **Journal of the American Chemical Society** 114, 3978-3980.1992
- Yamakoshi, Y.N., Yagami, T., Fukuhara, K., Sueyoshi, S., and Miyata, N. Solubilization of Fullerenes Into Water with Polyvinylpyrrolidone Applicable to Biological Tests. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications** 517-518.1994
- Zar J.H. Biostatistical Analysis. New Jersey. 718 p.1984
- Zhu, X.S., Zhu, L., Lang, Y.P., and Chen, Y.S. Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. **Environmental Toxicology and Chemistry** 27, 1979-1985.2008

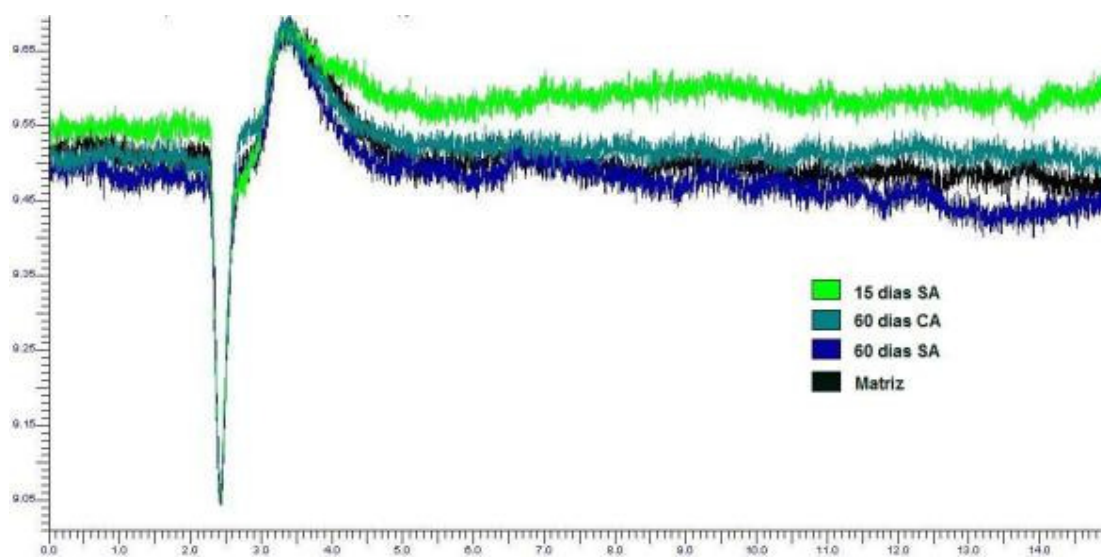
ANEXOS

Anexo 1 - Concentrações (ng mL⁻¹) das suspensões de C₆₀ determinadas por ELL

| | Réplica 1 | | | Réplica 2 | | | Réplica 3 | | | | |
|--------------|----------------------------|----------|------|----------------------------|----------|------|----------------------------|--------------|------|------|------|
| | [] ng mL ⁻¹ | [] méd. | DP | [] ng mL ⁻¹ | [] méd. | DP | [] ng mL ⁻¹ | [] méd. | DP | | |
| SA_ELL15d_1A | 0,26 | | | SA_ELL15d_2A | 0,46 | | SA_ELL15d_3A | - | - | | |
| SA_ELL15d_1B | 0,32 | 0,28 | 0,03 | SA_ELL15d_2B | 0,44 | 0,46 | 0,02 | SA_ELL15d_3B | - | - | - |
| SA_ELL15d_1C | 0,27 | | | SA_ELL15d_2C | 0,47 | | | SA_ELL15d_3C | - | - | |
| SA_ELL30d_1A | 0,33 | | | SA_ELL30d_2A | 0,31 | | | SA_ELL30d_3A | 0,32 | | |
| SA_ELL30d_1B | 0,31 | 0,33 | 0,01 | SA_ELL30d_2B | 0,33 | 0,31 | 0,01 | SA_ELL30d_3B | 0,33 | 0,33 | 0,02 |
| SA_ELL30d_1C | 0,34 | | | SA_ELL30d_2C | 0,31 | | | SA_ELL30d_3C | 0,35 | | |
| SA_ELL45d_1A | 0,32 | | | SA_ELL45d_2A | 0,40 | | | SA_ELL45d_3A | 0,43 | | |
| SA_ELL45d_1B | 0,30 | 0,31 | 0,01 | SA_ELL45d_2B | 0,38 | 0,38 | 0,02 | SA_ELL45d_3B | 0,39 | 0,41 | 0,02 |
| SA_ELL45d_1C | 0,32 | | | SA_ELL45d_2C | 0,37 | | | SA_ELL45d_3C | 0,42 | | |
| SA_ELL60d_1A | 0,50 | | | SA_ELL60d_2A | 0,45 | | | SA_ELL60d_3A | 0,37 | | |
| SA_ELL60d_1B | 0,41 | 0,45 | 0,05 | SA_ELL60d_2B | 0,42 | 0,45 | 0,03 | SA_ELL60d_3B | 0,39 | 0,39 | 0,03 |
| SA_ELL60d_1C | 0,45 | | | SA_ELL60d_2C | 0,49 | | | SA_ELL60d_3C | 0,42 | | |
| CA_ELL15d_1A | 0,78 | | | CA_ELL15d_2A | 0,69 | | | CA_ELL15d_3A | 0,84 | | |
| CA_ELL15d_1B | 0,75 | 0,79 | 0,05 | CA_ELL15d_2B | 0,63 | 0,64 | 0,04 | CA_ELL15d_3B | 0,83 | 0,79 | 0,0 |
| CA_ELL15d_1C | 0,84 | | | CA_ELL15d_2C | 0,61 | | | CA_ELL15d_3C | 0,70 | | |
| CA_ELL30d_1A | 0,82 | | | CA_ELL30d_2A | 0,80 | | | CA_ELL30d_3A | 0,85 | | |
| CA_ELL30d_1B | 0,84 | 0,81 | 0,04 | CA_ELL30d_2B | 0,77 | 0,81 | 0,05 | CA_ELL30d_3B | 0,81 | 0,82 | 0,02 |
| CA_ELL30d_1C | 0,77 | | | CA_ELL30d_2C | 0,86 | | | CA_ELL30d_3C | 0,82 | | |
| CA_ELL45d_1A | 0,43 | | | CA_ELL45d_2A | 0,31 | | | CA_ELL45d_3A | 0,45 | | |
| CA_ELL45d_1B | 0,46 | 0,46 | 0,02 | CA_ELL45d_2B | 0,35 | 0,33 | 0,02 | CA_ELL45d_3B | 0,42 | 0,43 | 0,03 |
| CA_ELL45d_1C | 0,48 | | | CA_ELL45d_2C | 0,33 | | | CA_ELL45d_3C | 0,40 | | |
| CA_ELL60d_1A | 0,88 | | | CA_ELL60d_2A | 0,41 | | | CA_ELL60d_3A | 0,75 | | |
| CA_ELL60d_1B | 0,96 | 0,94 | 0,06 | CA_ELL60d_2B | 0,37 | 0,40 | 0,03 | CA_ELL60d_3B | 0,75 | 0,75 | 0,00 |
| CA_ELL60d_1C | 0,99 | | | CA_ELL60d_2C | 0,43 | | | CA_ELL60d_3C | 0,74 | | |

Anexo 2 - Concentrações (ng mL⁻¹) das suspensões de C₆₀ determinadas por EFS

| | Réplica 1 | | | Réplica 2 | | | Réplica 3 | | | | |
|--------------|----------------------------|----------|------|----------------------------|----------|------|----------------------------|--------------|------|------|------|
| | [] ng mL ⁻¹ | [] méd. | DP | [] ng mL ⁻¹ | [] méd. | DP | [] ng mL ⁻¹ | [] méd. | DP | | |
| SA_EFS15d_1A | 1,45 | | | SA_EFS15d_2A | 1,46 | | SA_EFS15d_3A | 1,51 | | | |
| SA_EFS15d_1B | 1,50 | 1,46 | 0,08 | SA_EFS15d_2B | 1,41 | 1,43 | 0,04 | SA_EFS15d_3B | 1,48 | 1,49 | 0,02 |
| SA_EFS15d_1C | 1,42 | | | SA_EFS15d_2C | 1,43 | | | SA_EFS15d_3C | 1,49 | | |
| SA_EFS30d_1A | 1,54 | | | SA_EFS30d_2A | 1,46 | | | SA_EFS30d_3A | 1,64 | | |
| SA_EFS30d_1B | 1,49 | 1,51 | 0,03 | SA_EFS30d_2B | 1,49 | 1,46 | 0,03 | SA_EFS30d_3B | 1,67 | 1,65 | 0,01 |
| SA_EFS30d_1C | 1,50 | | | SA_EFS30d_2C | 1,44 | | | SA_EFS30d_3C | 1,65 | | |
| SA_EFS45d_1A | 1,57 | | | SA_EFS45d_2A | 1,58 | | | SA_EFS45d_3A | 1,61 | | |
| SA_EFS45d_1B | 1,52 | 1,53 | 0,02 | SA_EFS45d_2B | 1,62 | 1,60 | 0,03 | SA_EFS45d_3B | 1,64 | 1,63 | 0,03 |
| SA_EFS45d_1C | 1,55 | | | SA_EFS45d_2C | 1,60 | | | SA_EFS45d_3C | 1,65 | | |
| SA_EFS60d_1A | 1,61 | | | SA_EFS60d_2A | 1,68 | | | SA_EFS60d_3A | 1,59 | | |
| SA_EFS60d_1B | 1,58 | 1,60 | 0,04 | SA_EFS60d_2B | 1,65 | 1,67 | 0,05 | SA_EFS60d_3B | 1,64 | 1,63 | 0,03 |
| SA_EFS60d_1C | 1,60 | | | SA_EFS60d_2C | 1,67 | | | SA_EFS60d_3C | 1,65 | | |
| CA_EFS15d_1A | 3,04 | | | CA_EFS15d_2A | 0,69 | | | CA_EFS15d_3A | 2,37 | | |
| CA_EFS15d_1B | 3,27 | 3,19 | 0,13 | CA_EFS15d_2B | 0,59 | 0,61 | 0,07 | CA_EFS15d_3B | 2,38 | 2,40 | 0,07 |
| CA_EFS15d_1C | 3,26 | | | CA_EFS15d_2C | 0,56 | | | CA_EFS15d_3C | 2,44 | | |
| CA_EFS30d_1A | 1,12 | | | CA_EFS30d_2A | 1,22 | | | CA_EFS30d_3A | 1,08 | | |
| CA_EFS30d_1B | 1,23 | 1,20 | 0,06 | CA_EFS30d_2B | 1,19 | 1,25 | 0,07 | CA_EFS30d_3B | 1,17 | 1,08 | 0,09 |
| CA_EFS30d_1C | 1,24 | | | CA_EFS30d_2C | 1,23 | | | CA_EFS30d_3C | 1,00 | | |
| CA_EFS45d_1A | 1,37 | | | CA_EFS45d_2A | 1,31 | | | CA_EFS45d_3A | 1,04 | | |
| CA_EFS45d_1B | 1,45 | 1,36 | 0,10 | CA_EFS45d_2B | 1,42 | 1,38 | 0,06 | CA_EFS45d_3B | 0,99 | 1,01 | 0,03 |
| CA_EFS45d_1C | 1,25 | | | CA_EFS45d_2C | 1,40 | | | CA_EFS45d_3C | 0,99 | | |
| CA_EFS60d_1A | 1,04 | | | CA_EFS60d_2A | 1,01 | | | CA_EFS60d_3A | 0,92 | | |
| CA_EFS60d_1B | 1,06 | 1,06 | 0,01 | CA_EFS60d_2B | 1,06 | 1,05 | 0,04 | CA_EFS60d_3B | 0,84 | 0,90 | 0,05 |
| CA_EFS60d_1C | 1,07 | | | CA_EFS60d_2C | 1,08 | | | CA_EFS60d_3C | 0,94 | | |

Anexo 3 - Cromatograma da suspensão de C₆₀ extraída por MEDLL e analisada por CLAE/UV-Vis

Anexo 4 - Cromatograma comparativo dos métodos de extração EFS e ELL das suspensões de C_{60} com branco e matriz analisados por CLAE/UV-Vis

