



Eliane Monsores Miguel

**Determinação de quercetina, kanamicina e
piraclostrobina usando métodos
fotoluminescentes e polímeros de impressão
molecular.**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação
em Química da PUC-Rio.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio
Co-orientador: Prof. Pércio Augusto Mardini Farias

Rio de Janeiro
Agosto de 2012



Eliane Monsores Miguel

**Determinação de quercetina, kanamicina e
piraclostrobina usando métodos
fotoluminescentes e polímeros de impressão
molecular.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador
Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Pércio Augusto Mardini Farias

Co-orientador
Departamento de Química – PUC-Rio

Profª. Andréa Fernandes Arruda

Instituto de Química – UFG

Profª. Andrea Rosane da Silva

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Wagner Felipe Pacheco

Instituto de Química - UFF



Eliane Monsores Miguel

**Determinação de quercetina, kanamicina e
piraclostrobina usando métodos
fotoluminescentes e polímeros de impressão
molecular.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profa. Roberta Lourenço Ziolli

Departamento de Química – UNIRIO

Profa. Adriana Gioda

Departamento de Química - PUC-Rio

Profa. Fatima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico -PUC-Rio

Rio de Janeiro, 31 de Agosto de 2012

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Eliane Monsores Miguel

Graduou-se em Química licenciatura plena pela Universidade Severino Sombra (USS) em 1998. Trabalhou no Senai exercendo a função de técnica nos laboratórios de alimentos e bebidas durante 4 anos. Possui Mestrado em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (2008).

Ficha catalográfica

Miguel, Eliane Monsores

Determinação de quercetina, kanamicina e piraclostrobina usando métodos fotoluminescentes e polímeros de impressão molecular / Eliane Monsores Miguel; orientadores: Ricardo Queiroz Aucélio, Pércio Augusto Mardini Farias. – 2012.

193 f. ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2012.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Polímero de impressão molecular. 3. Quercetina. 4. Kanamicina. 5. Piraclostrobina. 6. Pré-concentração. I. Aucélio, Ricardo Queiroz. II. Farias, Pércio Augusto Mardini. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD:540

Dedicado a Anselmo Bezerra (em memória)

A química da amizade

Nossa amizade é como a ligação covalente, sempre compartilhando alegrias, tristezas... Nunca surgirá um radical, porque essa ligação jamais se quebrará!

Sei que em alguns momentos será necessário, ver, analisar algo errado e balancear a equação, buscando o equilíbrio químico entre a gente.

O meu coração para você, sempre será uma cadeia aberta onde você sempre terá o livre arbítrio de fazer e decidir o que quiseres, sem sufoco, cobranças (cadeia fechada).

Em determinadas situações haverá vários intrusos que vão querer decompor a nossa amizade... como por exemplo, a distólise: ocorre a decomposição devido a distância. A pirólise quando a decomposição ocorre devido o amigo pirar de tanta saudade... mas como a ligação que existe entre nós é de alma, ponte de hidrogênio, é muito difícil ser quebrada!

Não é uma interação fraquinha como a de Vander Walls. Que a nossa amizade nunca evapore, mas que sempre estejamos bem unidos, no estado sólido! Como na reação de síntese ou adição... pois existe a união de duas pessoas que reagem e formam um único produto: A AMIZADE!

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

Aos professores Ricardo Aucélio, Pércio Farias e Andrea Silva pela orientação, e confiança nesses anos.

À equipe e amigos do LEEA, Ana Paula Lamounier, Priscila Maia, Cabrini Ferraz, Alessandra Licursi, Juliana Carvalho, Monica Vianna, Sarzamin Khan, Paulo Santos, Sônia Gomes, Leila Fialho, Adriana Doyle, Catarina Amorim, Rafael Dornellas, Junior, Anastácia Silva, Ana Catalina, Vanessa Franco, Juliano Lima, Carolina Andrade, Gabriel Varela, Lygia Caramenz, Alex Lima, Ana Isa Perez, que deixaram meus dias mais alegres.

Aos professores do Departamento de Química da PUC-Rio, que contribuíram com seus ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Química da PUC-Rio, Jorge, Charles, Carlão, Henrique, Anselmo (em memória), Marlene, Carlos e Fátima, pela ajuda durante todo esse tempo.

Aos professores participantes da comissão examinadora.

Aos amigos Alessandra Licursi, Cabrini Ferraz, Monica Vianna, Sarzamin Khan, que muito contribuíram para que eu pudesse concluir esse trabalho.

A Mayra Gonzalez Hurtado do Laboratório de misturas poliméricas e compósitos condutores do Instituto de macromoléculas – IMA/RJ pelas análises de microscopia de varredura eletrônica (MEV).

A Luciana Dornelas e ao técnico Jorge, pelas análises de Infravermelho.

Aos amigos Sílvio Teixeira e Dário Manoel, que tornaram minha estadia na cidade mais agradável, me recebendo de braços abertos.

Aos meus amigos Grazielle Souza, Marisa Silva, Pablo Lozano, Marcelo Fernandes, Rachel Silva, Camila Silva (em memória), Fabricio Souza, Vera Nicolau, Márcio Avila, que, mesmo longe, sempre me apoiaram.

À minha família, Maria Luiza (mãe), Luiz (padastro), Antonio (pai) e Alessandra (irmã), por todo o apoio que sempre me deram.

Ao Caetano da Conceição pela compreensão, amor e ajuda durante esses anos.

Ao CNPq pela bolsa cedida.

Resumo

Miguel, Eliane Monsores; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Determinação de quercetina, kanamicina e piraclostrobina usando métodos fotoluminescentes e polímeros de impressão molecular.** Rio de Janeiro, 2012. 193p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Neste trabalho, polímeros de impressão molecular (MIP) foram desenvolvidos para aplicação em procedimentos de extração em fase sólida (SPE) visando separar e concentrar quercetina (flavonóide), piraclostrobina (pesticida) e kanamicina (antibiótico) em amostras contendo substâncias interferentes na determinação dos analitos-alvo. A seletividade em relação aos analitos de interesse foi conseguida pela interação específica dessas espécies químicas com os sítios de reconhecimento dos polímeros. A produção desses MIPs foi baseada na polimerização em “bulk” e, de modo a se comprovar a efetividade dos mesmos, o desempenho destes foram comparados com polímeros não-impressos (NIP) correspondentes, que foram produzidos sem o uso da molécula-molde. Os procedimentos para síntese são simples e o material produzido é quimicamente resistente nas condições de uso. A caracterização do material produzido foi feita por meio de microscopia de varredura eletrônica (MEV) e espectrometria de absorção na região do infravermelho (IV). O MIP preparado com quercetina foi empregado na extração seletiva deste flavonóide em amostras de urina e de suplemento alimentar e permitiu a obtenção de limite de detecção de $4,58 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ usando espectrofotometria de absorção no UV-vis com recuperações superiores a 90% e separação efetiva de outros flavonóides como a flavona e naringenina. O MIP preparado com piraclostrobina foi usado na análise de amostra de água de rio e urina e permitiu o alcance de limite de detecção de $4,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, usando detecção por espectrofluorimetria, e recuperações maiores que 90% na presença de outros pesticidas da classe das estrobilurinas. Para o MIP preparado com kanamicina, o limite de detecção alcançado usando detecção com sonda de nanopartículas fluorescentes foi 9 ng mL^{-1} ($1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) com aplicação na análise de urina e vacina contra febre amarela com recuperações maiores a 90%.

Palavras-chave

Polímero de impressão molecular; quercetina; kanamicina; piraclostrobina pré-concentração.

Abstract

Miguel, Eliane Monsore; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor). **Determination of quercetin, kanamycin and pyraclostrobin using methods photoluminescent and molecularly imprinted polymers.** Rio de Janeiro, 2012. 193p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

In this work, molecularly imprinted polymers (MIPs) have been developed for application procedures for solid phase extraction (SPE) in order to separate and concentrate quercetin (flavonoid), pyraclostrobin (pesticide) and kanamycin (antibiotic) in samples containing interfering substances in the determination of target analytes. The selectivity in respect of analytes has been achieved by specific binding of these chemical species with the recognition sites of the polymers. The production of MIP polymerization was based on "bulk" and in order to prove the effectiveness thereof, the performance of these polymers were compared with non-printed (NIP) thereof, that were produced without the use of template molecule. The procedures for synthesis are simple and relatively low cost and is chemically resistant material produced under the conditions of use. The characterization of the material produced was done by scanning electron microscopy (MEV), absorption spectroscopy in the infrared region and CHN elemental analysis. The MIP prepared with quercetin was used for the selective extraction of flavonoids in urine samples and dietary supplement and allowed to obtain a detection limit of $4,58 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ using absorption spectrophotometry in the UV-vis with recoveries exceeding 90% and effective separation of other flavonoids such as naringenin and flavone. The MIP prepared with pyraclostrobin was used to analyze samples of urine and river water and allowed to reach the detection limit of $4,6 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, detection using spectrofluorimetry and recoveries greater than 90% in presence of other pesticides from the class of strobilurins. For the MIP prepared with kanamycin, the detection limit using detection with fluorescent nanoparticles probe was 9 ng mL^{-1} ($1,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) application to the analysis of urine and yellow fever vaccine with recoveries greater than 90%.

Keywords

Molecularly imprinted polymers; quercetin; kanamycin; pyraclostrobin; pre-concentration.

Sumário

1	Introdução	26
1.1.	Polímeros de impressão molecular	26
1.2.	Preparo dos MIP	28
1.2.1.	Estratégia geral	28
1.2.2.	Escolha da molécula molde e do monômero funcional	29
1.2.3.	Escolha do solvente	33
1.2.4.	Agente de ligação cruzada e Iniciador radicalar	33
1.2.5.	Polimerização	35
1.3.	Estado da arte: uso dos MIP em separações analíticas	39
1.3.1.	Cromatografia líquida	39
1.3.2.	Eletrocromatografia capilar (CEC)	41
1.3.3.	Extração em fase sólida (SPE)	42
1.4.	Substâncias- alvo do trabalho	44
1.4.1.	Quercetina (QUE)	44
1.4.1.1.	Separação e determinação de Quercetina	46
1.4.1.2.	Trabalhos relacionados com MIP-Quercetina	47
1.4.1.3.	Albumina sérica bovina (BSA)	50
1.4.1.3.1.	Mecanismo de supressão de fluorescência	52
1.4.2.	Kanamicina	53
1.4.2.1.	Métodos para determinação de Kanamicina	55
1.4.2.2.	Febre amarela: doença e vacina	55
1.4.2.3.	Sonda fluorescente Quantum Dots (QDs)	57
1.4.2.4.	Trabalhos descrevendo determinação de kanamicina	58
1.4.3.	Piraclostrobina	60
1.4.3.1.	Métodos analíticos para determinação de piraclostrobina	64
1.5.	Objetivos	66
1.5.1.	Objetivo geral	66
1.5.2.	Objetivos específicos	66
2	Materiais, reagentes, instrumentação e métodos.	68
2.1.	Materiais e reagentes	68
2.1.1.	Coleta, armazenamento e tratamento das amostras de água de rio,	

urina, vacina e suplemento alimentar	69
2.2. Instrumentação	69
2.2.1. Cromatógrafo líquido de alta eficiência	69
2.2.2. Espectrometria de luminescência	70
2.2.3. Espectrofotômetro de absorção	70
2.2.4. Espectrômetro de infravermelho	70
2.2.5. Microscopia de varredura eletrônica (MEV)	71
2.2.6. Equipamentos auxiliares	71
2.3. Métodos	72
2.3.1. Preparo de soluções	72
2.3.1.1. Soluções padrão de Quercetina, kanamicina, piraclostrobina e amostras.	72
2.3.2. Síntese dos MIP	74
2.3.2.1. MIP-Quercetina	74
2.3.2.2. MIP-Kanamicina	76
2.3.2.3. MIP-Piraclostrobina	78
2.3.3. Remoção dos resíduos de ácido acético dos polímeros	80
2.3.4. Síntese do CdTe-TGA QDs	80
2.3.5. Avaliação dos polímeros	81
2.3.5.1. MIP-Quercetina	81
2.3.5.1.1. Acondicionamento das colunas MIP e NIP	81
2.3.5.1.2. Procedimentos e determinações espectrofotométricas, espectrofluorimétricas e cromatográficas	82
2.3.5.1.2.1. Otimização das condições de medição: planejamento experimental	83
2.3.5.2. MIP-Kanamicina	86
2.3.5.2.1. Acondicionamento da coluna MIP e NIP	87
2.3.5.2.2. Procedimentos e determinações luminescentes	87
2.3.5.3. MIP-Piraclostrobina	88
2.3.5.3.1. Acondicionamento da coluna MIP e NIP	88
2.3.5.3.2. Procedimentos, determinações luminescentes em espectrofluorímetro e determinações em HPLC	88
2.4. Validação de método analítico	90
2.4.1. Seletividade	91
2.4.2. Linearidade	91
2.4.3. Faixa de trabalho e faixa linear	92
2.4.4. Limite de detecção	93

2.4.5. Limite de quantificação	94
2.4.6. Tendência/recuperação	94
2.4.7. Precisão	95
2.4.7.1. Repetitividade	95
2.4.8. Comparação da precisão entre métodos	96
 3 Resultados e discussão	 97
3.1. Síntese dos polímeros impressos molecularmente	97
3.2. Dessorção e limpeza das matrizes poliméricas	100
3.2.1. MIP-Quercetina	103
3.2.2. Caracterização do MIP-Quercetina	103
3.2.3. Otimização do método de extração de QUE	106
3.2.3.1. Escolha do solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos	106
3.2.4. Estudo quimiométrico para otimização das medições de quercetina em presença de BSA	107
3.2.4.1. Aplicação da otimização com restrição	114
3.2.5. Medições e aplicação do método	115
3.2.5.1. Medições de BSA em presença de QUE (BSA-QUE)	115
3.2.5.2. Avaliação de desempenho e seletividade do MIP-QUE	117
3.2.5.3. Aplicação do MIP-QUE como SPE em amostras de suplemento alimentar e urina	122
3.2.6. Parâmetros da validação do método analítico	126
3.2.6.1. Linearidade da resposta analítica	126
3.2.6.2. Limite de detecção e de quantificação	131
3.2.6.3. Precisão	132
3.2.6.4. Comparação da precisão entre métodos	132
3.3. MIP-Kanamicina	133
3.3.1. Caracterização do MIP-KANA	133
3.3.1.1. Caracterização do CdTe-TGA QDs	135
3.3.1.2. Otimização do CdTe-TGA QDs para melhor condição de medição	136
3.3.1.2.1. Efeito do pH	136
3.3.1.2.2. Estabilidade da nanopartícula	137
3.3.1.2.3. Estudo da variação de QDs em presença de KANA	138
3.3.1.2.4. Estudo dos interferentes	139
3.3.2. Solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos	140
3.3.3. Avaliação de desempenho e seletividade do MIP-KANA	141
3.3.4. Aplicação do MIP-KANA como SPE em amostras de vacina e urina	144

3.3.5. Parâmetros da validação do método analítico	147
3.3.5.1. Linearidade da resposta analítica	147
3.3.5.2. Limite de detecção e quantificação	150
3.3.5.3. Precisão	151
3.4. MIP-Piraclostrobina	151
3.4.1. Caracterização do MIP-PIRA	151
3.4.2. Efeito da proporção do solvente no sinal fluorescente da piraclostrobina	153
3.4.3. Otimização do método de extração de PIRA	155
3.4.3.1. Escolha do solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos	155
3.4.4. Medição e aplicação do método em amostras de água de rio e urina humana	156
3.4.4.1. Avaliação de desempenho e avaliação do MIP-PIRA	157
3.4.5. Aplicação do MIP-PIRA como SPE em amostras de urina e água de rio fortificadas com PIRA.	163
3.4.6. Parâmetros da validação dos métodos analíticos	167
3.4.6.1. Linearidade da resposta analítica	167
3.4.6.2. Limite de detecção e de quantificação	173
3.4.6.3. Precisão	173
3.4.6.4. Comparação da precisão entre métodos	173
4 Conclusões	175
5 Referências bibliográficas	177

Lista de figuras

Figura 1 - Representação esquemática do processo de formação do MIP (adaptado de Tarley <i>et al.</i> , 2005).	29
Figura 2 - Estrutura molecular dos reagentes de ligação cruzada empregados na síntese do MIP: (a) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), (b) N' N'-metileno-bis-acrilamina, (c) N',O-bisacrilóila-L-fenilalaninol, (d) N'N'-fenilendiacrilamida e (e) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM).	34
Figura 3 - Estruturas moleculares dos iniciadores radiculares empregados na síntese do MIP. (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bisdimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzila; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).	35
Figura 4 - Representação do procedimento de preparo do MIP empregando o método de polimerização em "bulk" (extraído de Tarley <i>et al.</i> , 2005).	36
Figura 5 – Estrutura da Quercetina	46
Figura 6 – Estrutura da Flavona e Naringerina.	46
Figura 7 - Estrutura de kanamicinas (kanamicina A: R1=NH ₂ , R2=OH, R3=NH ₂ ; kanamicin B: R1=NH ₂ , R2=NH ₂ , R3=NH ₂ ; kanamicina C: R1=OH, R2=NH ₂ , R3=NH ₂ ; kanamicina D: R1=NH ₂ , R2=OH, R3=OH).	54
Figura 8 - Estruturas química da eritromicina (a), da sacarose (b), glutamato de sódio (c) e sorbitol (d).	57
Figura 9- Estrutura dos pesticidas: (a) picoxistrobina, (b) dimoxistrobina, (c) fluoxastrobina, (d) azoxistrobina, (e) piraclostrobina, (f) trifloxistrobina e (g) kresoximmetil.	62

Figura 10 – Síntese do MIP-QUE (matriz acrílica)	75
Figura 11 – Síntese do MIP-KANA (matriz sol-gel).	77
Figura 12 – Síntese do MIP-PIRA (matriz acrílica)	79
Figura 13 – Simulação das cavidades do MIP-QUE	98
Figura 14 – Simulação das cavidades do MIP-PIRA	98
Figura 15 – Simulação das cavidades do MIP-KANA	100
Figura 16 - Espectros de absorção após limpeza do MIP-QUE(a) solução de QUE $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (b) ultima fração recolhida de MeOH passados pelo polímero.	101
Figura 17 - Espectros de absorção (a) solução de PIRA $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (b) ultima fração da limpeza do MIP-PIRA.	102
Figura 18 - Espectros de fluorescência da limpeza do MIP – KANA (a) referente as primeiras frações recolhidas e (b) para as frações finais até obtenção do sinal do controle da sonda fluorescente CdTe-TGA QDs (intensidade aproximada de 300 u.a.).	102
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura do MIP-QUE (a) com aumento de 500 vezes, e (b) com aumento de 5.000 vezes.	103
Figura 20 - Espectros de absorção no infravermelho da molécula de QUE (a) e do MIP-QUE (b) após remoção do analito.	105
Figura 21 – Recuperação de MIP-QUE obtida após extração com diferentes solventes.	106
Figura 22 - Recuperação de NIP obtida após extração com diferentes solventes.	107
Figura 23 - Gráfico de Pareto indicando a influência significativa dos 2 fatores estudados (pH e força iônica do tampão) para a BSA.	108
Figura 24 - Representação gráfica do modelo de regressão (gráfico de superfície de resposta) gerado a partir do desenho experimental testado para a BSA. Ponto de máximo 481,74 u.a.	111
Figura 25 - Gráfico de Pareto indicando a influência significativa dos 2 fatores estudados (pH e força iônica do tampão) para BSA x QUE.	112
Figura 26 - Representação gráfica do modelo de regressão (gráfico de superfície de resposta) gerado a partir do desenho experimental testado para BSA x QUE. Ponto de mínimo:	

95,58 u.a.	113
Figura 27 – Gráfico de desejabilidade	114
Figura 28 - Espectros da curva BSA com adição crescente de QUE (a) ensaio do controle, (b) $2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (g) $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (h) $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (i) $2,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (j) $3,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (k) $3,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (l) $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.	116
Figura 29 - Espectros de fluorescência de FLA, NAR e QUE na concentração de $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ em presença de BSA.	117
Figura 30 - Percentagem de recuperação com volumes crescentes de solução $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de QUE adicionados aos cartuchos MIP.	118
Figura 31 - Eluição do MIP-QUE para QUE e interferentes (FLA e NAR).	119
Figura 32 - Eluição do NIP para QUE e interferentes (FLA e NAR).	119
Figura 33 – Testes de recuperação de QUE nos cartuchos MIP e NIP após eluição de sete frações (cada cartucho), com medições na sonda fluorescente BSA.	120
Figura 34 - Cromatograma (a) NAR, QUE e FLA eluídos do cartucho MIP após adição de 2,0 mL de ACN, (b) QUE passada pelo MIP e eluída com 7,0 mL de ACN e (c) mistura dos padrões dos flavonoides $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ NAR $t_R=16,1 \text{ min.}$, QUE $t_R= 19,6 \text{ min.}$ e FLA $t_R=26,2 \text{ min.}$	121
Figura 35 - Eluição de ácido ascórbico nos cartuchos MIP e NIP.	122
Figura 36 - (a) cromatograma da mistura de QUE e ácido ascórbico ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), (b) cromatograma do suplemento alimentar sem passar pelo MIP ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), (c) cromatograma das primeiras frações (2,0 mL) recolhidas da eluição no MIP-QUE e (d) cromatograma da sétima fração eluída no MIP-QUE.	123
Figura 37 - Cromatogramas: (a) amostra sem tratamento (b) fração da urina após eluição no MIP (livre de interferente na região da QUE) e (c) fração da urina fortificada com QUE após eluição com 4,0 mL de MeOH.	124
Figura 38 - Espectros de fluorescência da sonda de BSA: (a) com urina sem tratamento, (b) com urina após passar 5,0 mL de	

água, (c) após passar mais 5,0 mL de água e (d) recuperação de QUE na amostra de urina fortificada	125
Figura 39 - Curva analítica obtida por espectrofotometria de absorção, para determinação de QUE.	127
Figura 40 - Curva analítica obtida por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD) para determinação de QUE	127
Figura 41 - Curva analítica obtida por espectrofluorimetria para determinação de QUE.	128
Figura 42 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a quercetina na determinação por espectrofotometria de absorção.	130
Figura 43 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a quercetina na determinação por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).	130
Figura 44 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a QUExBSA na determinação por espectrofluorimetria.	131
Figura 45 - Micrografias eletrônicas de varredura do MIP-kanamicina na matriz sol-gel (a) com aumento de 500 vezes e (b) com aumento de 5.000 vezes.	133
Figura 46 - Espectros de infravermelho da kanamicina (a) e MIP-kanamicina (b).	134
Figura 47 - (a) Espectro de absorção de CdTe-TGA QDs alíquota de 25,0 µL avolumada com água para balão volumétrico de 5,0 mL e (b) espectro de fluorescência de CdTe-TGA QDs.	136
Figura 48 – (a) intensidade do sinal fluorescente do CdTe-TGA QDs em função do pH na faixa de 6 a 10, (b) intensidade do sinal fluorescente do CdTe-TGA QDs em presença de KANA em função do pH na faixa de 6 a 10.	137
Figura 49 - Estabilidade do CdTe-TGA QDs em função do tempo (min.).	138
Figura 50 - Variação do sinal fluorescente (ΔF) em função de alíquotas de QDs na presença de KANA ($3,0 \times 10^{-10}$ mol).	139
Figura 51 - Eluição de KANA com água ultrapurificada nos cartuchos MIP e NIP.	141
Figura 52 - Seletividade do MIP-KANA e NIP para a KANA.	142
Figura 53 - Eluição de gelatina no MIP-KANA e no NIP.	142
Figura 54 – Percentagens de recuperações (solução contendo KANA e	

gelatina) obtidas com os cartuchos MIP para KANA e gelatina após percolação de 6,0 mL de água ultrapurificada.	143
Figura 55 - Percentagens de recuperações obtidas com os cartuchos de NIP para KANA e gelatina por espectrofluorimetria após percolação de 6,0 mL de água.	144
Figura 56 - Espectros: (a) Amostra de 50,0 µL de vacina sem tratamento, (b) controle referente ao sinal fluorescente da sonda (CdTe-TGA QDs), (c) fração 6 da amostra de 50,0 µL de vacina após eluição no MIP (livre de gelatina).	145
Figura 57- Espectros: (a) Amostra de 50 µL urina sem tratamento (b) controle referente ao sinal fluorescente da sonda (CdTe-TGA QDs), e (c) fração 6 da amostra de urina fortificada com 50 µL de KANA (166,7 ng mL ⁻¹) após eluição no MIP (livre de interferentes).	146
Figura 58 - Curva analítica obtida com concentrações crescentes do padrão de KANA de 19,3 a 1370,3 ng mL ⁻¹) obtida por espectrofluorimetria.	148
Figura 59 - Espectros de fluorescência da curva analítica CdTe-TGA QDs na presença de alíquotas crescentes de KANA (nas concentrações de 19,3 a 1370,3 ng mL ⁻¹ linhas <i>b-m</i>), linha <i>a</i> representa o controle.	148
Figura 60 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a KANA.	150
Figura 61 - Micrografias eletrônicas de varredura do MIP-PIRA (a) com aumento de 500 vezes e (b) com aumento de 5.000 vezes.	151
Figura 62 - Espectros de infravermelho para PIRA (a) e MIP-PIRA (b).	153
Figura 63 - Espectros de excitação e emissão de PIRA na concentração de 6,0 x 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , (metanol/H ₂ O 20:80 %v/v).	154
Figura 64 - Solvente de eluição para o MIP-PIRA.	156
Figura 65 - Eluição de PIRA no NIP com diferentes solventes.	156
Figura 66 - Seletividade do MIP-PIRA para os analitos piraclostrobina e azoxistrobina.	158
Figura 67 - Eluição de PIRA e AZO no NIP.	158
Figura 68 - Percentagens de recuperações obtidas com os cartuchos MIP e NIP para PIRA (a) e AZO (b) usando cromatografia líquida com detecção por fluorimetria após percolação de 9	

mL de DCM.	159
Figura 69 - Percentagens de recuperações obtidas com os cartuchos de MIP e NIP para os sete pesticidas usando HPLC com detecção-DAD após percolação de 9,0 mL de DCM: a) PIRA b) AZO c) DIMO d) PICO e) FLU f) TRI g) KRESO.	160
Figura 70 - Cromatogramas dos pesticidas (a) com detecção por fluorimetria (1) AZO e (2) PIRA e (b) com detecção DAD (1) AZO; (2) FLU; (3) DIMO; (4) KRESO; (5) PICO, (6) PIRA e (7) TRI.	161
Figura 71 - Cromatogramas dos padrões de pesticidas (a) com detecção por arranjo de diodos (1) AZO; (2) FLU; (3) DIMO; (4) KRESO; (5) PICO, (6) PIRA e (7) TRI, (b) AZO (1) e (6) PIRA após eluição com 2,0 mL de DCM, (c) PIRA após a eluição da nona fração.	162
Figura 72 - Cromatograma das frações 1 e 2 (a) contendo os seguintes pesticidas: a) AZO; b) FLU; c) DIMO; d) KRESO; e) PICO; f) PIRA e g) TRI e (b) PIRA recuperada na fração 9.	163
Figura 73 - Cromatogramas: (a) Amostra sem tratamento (b) fração da urina após eluição no MIP (livre de interferente na região da PIRA) e (c) fração da urina fortificada com PIRA na concentração de $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ após eluição com 9,0 mL de DCM.	164
Figura 74 - Espectros: (a) Amostra sem tratamento (b) fração da urina após eluição no MIP e (c) fração da urina fortificada com PIRA recuperada na concentração de $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ após eluição com 9 mL de DCM.	165
Figura 75 - Cromatogramas: (a) água de rio sem tratamento (antes de passar pelo cartucho), (b) água de rio após eluição no cartucho MIP e (c) Recuperação de PIRA na amostra de água de rio, após eluição com 9,0 mL de DCM.	166
Figura 76 - Espectros de fluorimetria: (a) água de rio sem tratamento (antes de passar pelo cartucho), e (b) Recuperação de PIRA na amostra de água de rio, após eluição com 9,0 mL de DCM.	166
Figura 77 - Curva analítica do padrão de PIRA (mol L^{-1}) obtida por espectrofluorimetria.	168
Figura 78 - Curva analítica de PIRA (mol L^{-1}) obtida por HPLC com	

detecção por fluorimetria.	168
Figura 79 - Curva analítica do padrão de PIRA (mol L^{-1}) obtida por HPLC com detecção de absorção (DAD).	169
Figura 80 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a PIRA na determinação por espectrofluorimetria.	171
Figura 81 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a PIRA na determinação por HPLC com detecção por fluorimetria.	172
Figura 82 – Gráfico de resíduos da curva analítica para a PIRA na determinação por HPLC com detecção por absorção (DAD)	172

Lista de tabelas

Tabela 1 - Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP (Tarley, <i>et al.</i> , 2005)	32
Tabela 2 - Uso agrícola da piraclostrobina em diversas culturas (Resolução RE nº 227 de 20/01/11 (DOU de 21/01/11).	63
Tabela 3 - Composição da vacina contra febre amarela para dose de 0,5 mL.	73
Tabela 4 - Matriz elaborada para o planejamento dos experimentos.	85
Tabela 5 - Parâmetros de validação indicados nos documentos da ANVISA (Resolução RE nº 899, de 29/05/2003) e do INMETRO (DOQ-CGCRE-008, de 07/2011) e realizados neste trabalho	91
Tabela 6 - Tabela ANOVA do modelo de regressão para a BSA	110
Tabela 7 - Tabela ANOVA do modelo de regressão para BSA x QUE.	113
Tabela 8 - Condições experimentais escolhidas para a determinação de Quercetina.	115
Tabela 9 - Percentuais de recuperação obtidos em amostras de suplemento e urina enriquecida.	125
Tabela 10 - Parâmetros da curva analítica por espectrofotometria de absorção.	128
Tabela 11 - Parâmetros das curvas analíticas por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).	128
Tabela 12 - Parâmetros das curvas analíticas de complexação QUE-BSA por espectrofluorimetria.	128
Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas dos padrões de interferentes obtidos por Espectrofotometria de absorção e por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).	129
Tabela 14 - LOD e LOQ para a determinação da quercetina por espectrofotômetro, HPLC-DAD e sonda fluorescente BSA.	131

Tabela 15 - Resultados encontrados entre os métodos espectrofotômetro, HPLC-DAD e fluorimétrico (sonda BSA).	132
Tabela 16 - Efeito de substâncias presentes na vacina contra febre amarela na intensidade do sinal fluorescente da sonda do CdTe-TGA QDs.	140
Tabela 17 - Valores de recuperação de KANA na vacina e urina usando MIP.	146
Tabela 18 - Parâmetros das curvas analítica de padrão de KANA obtidas por espectrofluorimetria.	149
Tabela 19 - Parâmetros da curva analítica do padrão da gelatina obtidas por espectrofluorimetria.	149
Tabela 20 - LOD e LOQ para a determinação da KANA por espectrofluorimetria.	150
Tabela 21 - Valores de recuperação de PIRA em amostras de água do rio e urina.	167
Tabela 22 - Parâmetros das curvas analíticas de padrão de PIRA obtidas por espectrofluorimetria.	169
Tabela 23 - Parâmetros das curvas analíticas de padrão de PIRA obtidas por HPLC com detecção fluorimétrica.	169
Tabela 24 - Parâmetros das curvas analíticas de padrão de PIRA obtidas por HPLC com detecção DAD.	170
Tabela 25 - Parâmetros das curvas analíticas dos padrões dos pesticidas obtidas por espectrofluorimetria, HPLC com detecção por DAD e fluorimetria.	170
Tabela 26 - LOD e LOQ para a determinação da PIRA por espectrofluorimetria e HPLC com detecção por fluorimetria.	173
Tabela 27 – Resultados encontrados utilizando detecção por HPLC e espectrofluorimetria em mol L ⁻¹ .	174

Lista de abreviaturas

¹H NMR – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

4-VP – 4—vinilpiridina

AA – Ácido acrílico

ACN – acetonitrila

AIBN – 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila

ALC – Agente de ligação cruzada

APTMS – 3-aminopropiltrimetoxissilano

AZO – Azoxistrobina

BET – Determinação superficial da área específica

BPO – Peróxido de benzoíla

CdTe – Telurato de cádmio

CE – Eletroforese capilar

CEC – Eletrocromatografia capilar

CFD - Cefadroxila

CFL – Cefalexina

CHN – Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio

CLB – Clenbuterol

DAD – Detecção por arranjo de diodos

DCM – Diclorometano

DIMO – Dimoxistrobina

DI-SPME – Microextração de imersão direta em fase sólida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTA – Análise térmica diferencial

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EGDMA ou EDMA – etileno glicol dimetacrilato

FLA – Flavona

FLU – Fluoxastrobina

FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier

GC-ITMS – Cromatografia em fase sólida acoplada a espectrometria de massa de íons

HPLC – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

If – Fator de impressão
IR – Iniciador radicalar
IV – Infravermelho
K' – Fator de retenção
K_{sv} – Constante de Stern-volmer
KANA - Kanamicina
KRESO – Kresoxim-metil
LC – Cromatografia líquida
LMR – Limite máximo de resíduo
LOD - Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
MeOH – Metanol
MEV – Microscopia de varredura eletrônica
MF – Monômero funcional
MIP – Polímero de impressão molecular
MISPE – Polímeros impressos molecularmente como fase sólida
MM – Molécula molde
MMA – Ácido metacrílico
MPA – Ácido 3-mercaptopropiônico
MQ – Média quadrática
MQ_{ep} – Média quadrática do erro puro
MQ_{faj} – Média quadrática da falta de ajuste
MQ_R – Média quadrática de regressão
MQ_r – Média quadrática de resíduos
NAR – Naringenina
NHS – N-hidroxissuccinimida
NIP- Polímero não impresso
PCP – Cefapirina
PICO – Picoxistrobina
PIRA – Piraclostrobina
PMT – Tubo fotomultiplicador
QDs – Quantum dots ou ponto quântico
QUE – Quercetina
R² – Coeficiente de determinação
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SPE – Extração em fase sólida

SPME-HPLC – Microextração em fase sólida acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência

SQ_{ep} - Soma quadrática do erro puro

SQ_R – Soma quadrática do modelo de regressão

SQ_t – Soma quadrática total

TBA-CFD – Tetrabutylamônio cefadroxila

TEOS – Tetraetilortosilicato

TFA – Ácido trifluoracético

TGA – Ácido tioglicólico

TGA – Análise termogravimétrica

THF – Tetrahidrofurano

T_r - Tempo de retenção

TRI – Trifloxitrobina

TRIM – Trimetilpropano trimetacrilato

u.a. – Unidades arbitrárias

UNA – Uso não alimentar