

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1. Síntese dos polímeros impressos molecularmente

O Polímero com a Impressão Molecular da quercetina foi sintetizado a partir do monômero funcional MAA. A escolha do MAA justifica-se pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do ácido metacrílico e os grupos OH da molécula de Quercetina .

Desta forma, a presença de possíveis sítios de interação entre a quercetina e o MAA poderia facilitar o processo de reconhecimento molecular, uma vez que teoricamente, após o enrijecimento do polímero a cavidade impressa apresentaria maior especificidade para a quercetina. Dessa forma um complexo receptor-doador estável é formado entre a molécula molde e o monômero funcional no processo de impressão. A existência do tal complexo conduz à formação de sítios de ligação específicos bem definidos no MIP. A polimerização térmica foi realizada na presença de AIBN. Este foi usado como iniciador radicalar. O reagente de reticulação, EGDMA, formou uma estrutura tridimensional rígida. A molécula de quercetina contém cinco grupos hidroxilas e um grupo carbonila, que podem formar ligações de hidrogênio com os grupos funcionais, tais como hidroxila, amina e grupos carbonila. Da estrutura de quercetina ambos os –OH (número 3) e o –OH(número 5) da molécula de quercetina podem formar fortes ligações de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonila (número 4), e portanto, a interação inter-molecular entre a molécula molde e o monômero é enfraquecida. Os 3 grupos hidroxilas remanescentes como principais grupos funcionais impressos fornecem forte ligações de hidrogênio inter-molecular com o polímero e controlam a impressão precisa dos sítios (Figura 13).

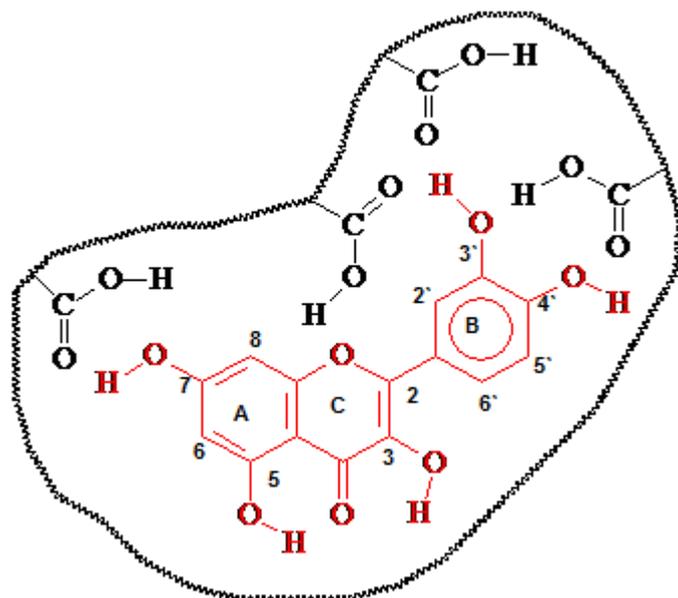


Figura 13 – Simulação das cavidades do MIP-QUE

Da mesma forma o polímero sintetizado com a impressão molecular da piraclostrobina pode formar fortes ligações de hidrogênio com o grupo carbonila da molécula molde como mostrado na Figura 14.

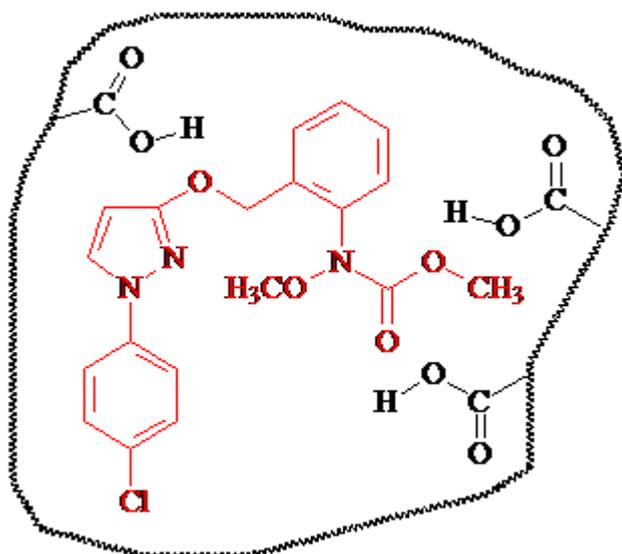


Figura 14 – Simulação das cavidades do MIP-PIRA

Na síntese do polímero usando a kanamicina como molécula molde foi utilizado o monômero funcional 3- aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), e o tetraetilortosilicato (TEOS) foi utilizado como agente reticulante. Este último promove o cruzamento entre as cadeias dos monômeros, formando a rede tridimensional ao redor da molécula molde. O processo sol-gel possui duas etapas principais. A primeira delas é a hidrólise de um alcóxido metálico (precursor) seguido de reações de condensação dos grupos hidroxila, a qual leva a formação do sol e, conseqüentemente a do gel. Na presença de um catalisador, a hidrólise dos alcoxissilanos se dá de forma mais rápida e eficiente. As reações sol-gel tem início quando o precursor é misturado com água, na presença de um catalisador ácido ou básico. Geralmente as reações de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, assim que a hidrólise é iniciada. A hidrólise leva a formação de grupos silanóis ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ), enquanto que as reações de condensação levam a formação de ligações siloxano ( $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ). Do mecanismo que ocorre no processo sol-gel apenas a hidrólise é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise terminarem, tornando o mecanismo muito complexo. Durante a transformação sol-gel, a viscosidade da solução aumenta gradativamente até que a fase sol se torne interconectada de forma rígida, formando um gel. Durante o processo de secagem a pressão atmosférica, o solvente é removido, produzindo um xerogel (gel seco). O sistema, que é inicialmente fluido (sol) tem a viscosidade aumentada e a medida que as reações de hidrólise e condensação evoluem, o solvente evapora, formando a fase de gel. Esse processo é chamado de policondensação, que aumenta a interconectividade da rede, expulsando o solvente. Na figura 15 é mostrada a simulação das cavidades do MIP-KANA.

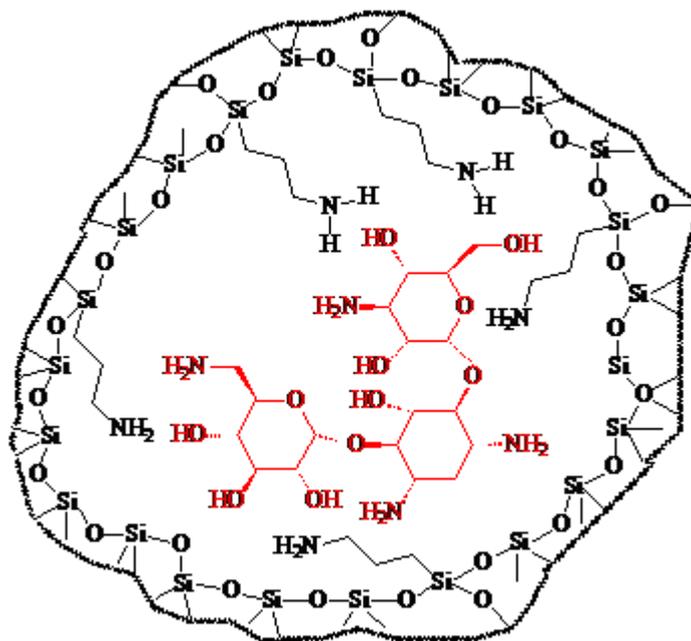


Figura 15 – Simulação das cavidades do MIP-KANA

### 3.2. Dessorção e limpeza das matrizes poliméricas

Como a quercetina não possui fluorescência natural a temperatura ambiente o monitoramento da lavagem do MIP quercetina foi feito por absorção (UV-Vis). Na Figura 16 observa-se o perfil de absorção para uma solução  $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de quercetina (16a) e um espectro de absorção dos últimos 5,0 mL de metanol passados pelo polímero (lavagem). O resultado indicou que a limpeza foi eficiente (16b). Para o MIP piraclostobina (Figura 17) o monitoramento das frações foi feito por espectrofluorimetria com excitação em 274 nm e emissão em 335 nm. A Figura 17a apresenta um espectro de fluorescência de uma solução  $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de PIRA. Na Figura 17b observa-se que a limpeza foi bem sucedida, uma vez que a última fração apresentou uma intensidade de sinal fluorescente muito baixa.

Para o MIP-Kanamicina (Figura 18) não é recomendado a utilização de metanol uma vez que este analito apresenta-se sob forma de um sal, logo a sua solubilidade neste solvente é muito baixa. Portanto, a dessorção de kanamicina neste polímero foi feita por meio de lavagem em funil simples com água ultrapurificada. As alíquotas (frações) foram acompanhadas por medições em espectrofluorímetro. As primeiras frações apresentaram grande quantidade de

kamanicina (Figura 18a). O monitoramento foi feito até não mais ser observado variação no sinal do controle da sonda fluorescente CdTe-TGA QDs (intensidade aproximada de 300 u.a.). Na Figura 18b observa-se que a limpeza do polímero foi bem sucedida.

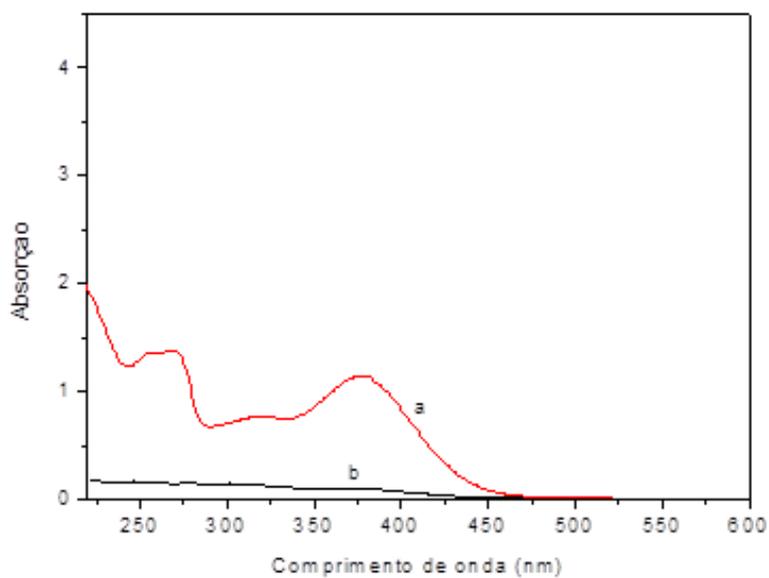


Figura 16 - Espectros de absorção após limpeza do MIP-QUE(a) solução de QUE  $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , (b) última fração recolhida de MeOH passados pelo polímero.

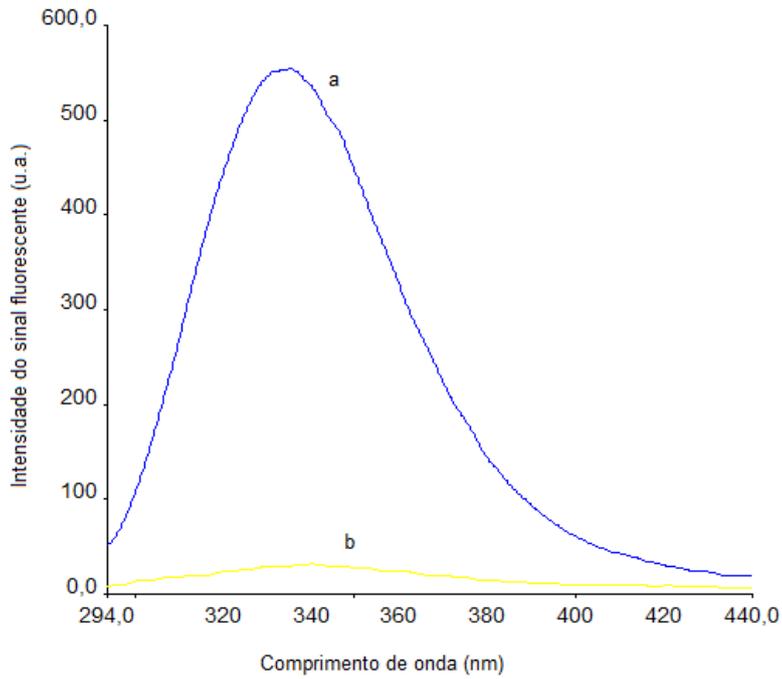


Figura 17 - Espectros de absorção (a) solução de PIRA  $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , (b) última fração da limpeza do MIP-PIRA.

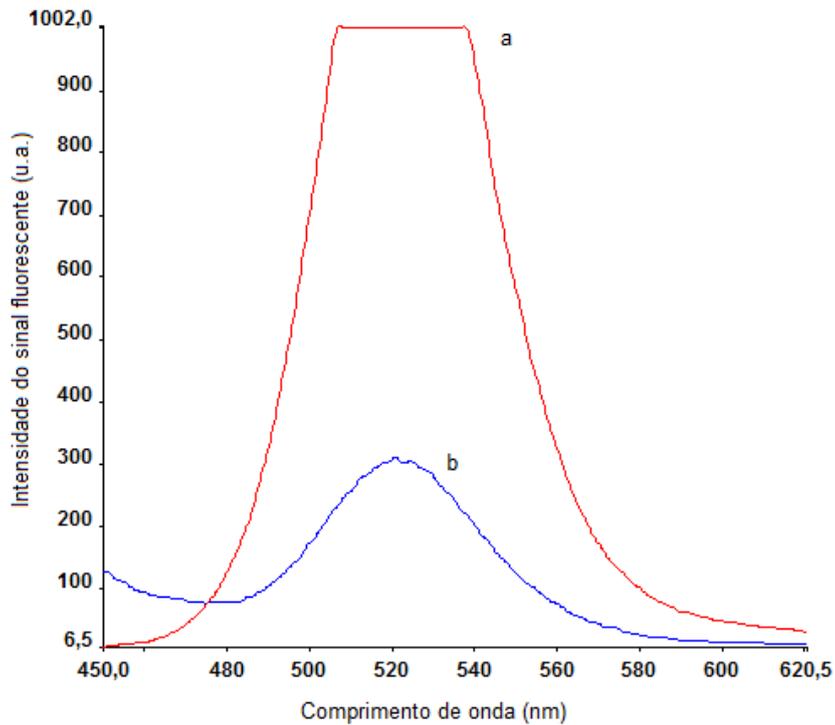


Figura 18 - Espectros de fluorescência da limpeza do MIP – KANA (a) referente as primeiras frações recolhidas e (b) para as frações finais até obtenção do sinal do controle da sonda fluorescente CdTe-TGA QDs (intensidade aproximada de 300 u.a.).

### 3.2.1. MIP-Quercetina

Neste subitem serão discutidos os resultados obtidos com o MIP-QUE, em relação à seletividade dos flavonoides. Serão considerados ainda estudos de validação e aplicabilidade do método analítico em análises de amostras usando MIP como sorvente para determinação seletiva de QUE. Alternativamente, utilizou-se uma abordagem baseada na supressão “quenching” de fluorescência da sonda fluorescente BSA induzido por quercetina.

### 3.2.2. Caracterização do MIP-Quercetina

A partir das frações do MIP-QUE na faixa entre 53 e 75  $\mu\text{m}$  foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 19). Embora uma comparação visual não seja adequada para apresentar conclusões em relação aos sítios de impressão do polímero, observou-se uma pequena porosidade no material (Figura 19b). Foi constatado também irregularidades na morfologia, contudo observa-se uma certa uniformidade nos tamanhos das partículas (Figura 19a).

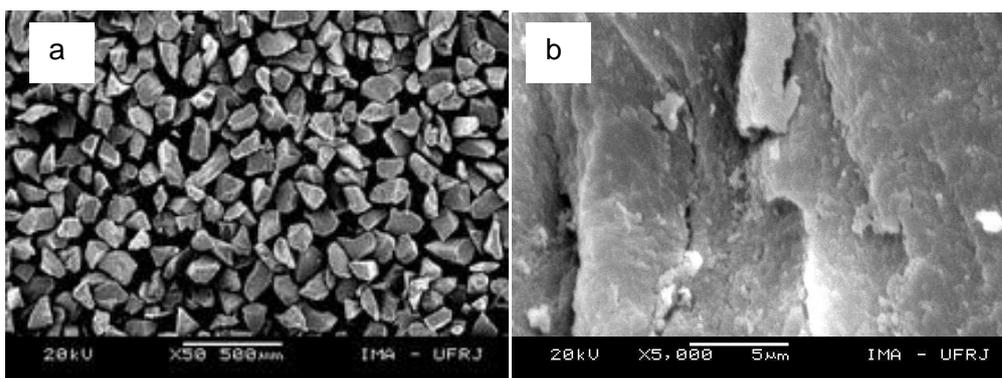


Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura do MIP-QUE (a) com aumento de 500 vezes, e (b) com aumento de 5.000 vezes.

A Figura 20a mostra o espectro de infravermelho da quercetina. As bandas entre  $3408$  a  $3131\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento dos grupos hidroxilas (OH) presentes na molécula de QUE. Essas bandas são intensas devido a existência

de 5 hidroxilas neste flavonóide. A banda em  $1611\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento C=O do grupo carbonila, já em  $1666\text{ cm}^{-1}$  observa-se estiramento característico de anel aromático (C=C). As bandas entre  $1014$  e  $1261\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento C-O-C em éter cíclico. Por fim, a região entre  $823$  a  $721\text{ cm}^{-1}$  corresponde a deformação C-H fora do plano de anel aromático tri e tetrassubstituído na QUE. Comparando-se os espectros de infravermelho da Figura 20, observa-se diferenças referentes a matriz polimérica após remoção do analito (Figura 20b) e a molécula de QUE. O espectro de infravermelho do MIP-QUE mostra uma banda  $3449\text{ cm}^{-1}$  referente a presença de grupo OH em MAA (monômero funcional que constitui o MIP). A banda intensa em  $1159\text{ cm}^{-1}$  pode ser identificada como estiramento assimétrico C-O-C proveniente do EGDMA uma vez que ele é responsável por grande parte da formação do bulk polímero. Finalmente em  $1729\text{ cm}^{-1}$  observa-se uma banda intensa referente a estiramento C=O tanto do EGDMA quanto do MAA (precursores). O espectro de infravermelho do NIP foi muito semelhante ao do MIP uma vez que a base polimérica é a mesma.

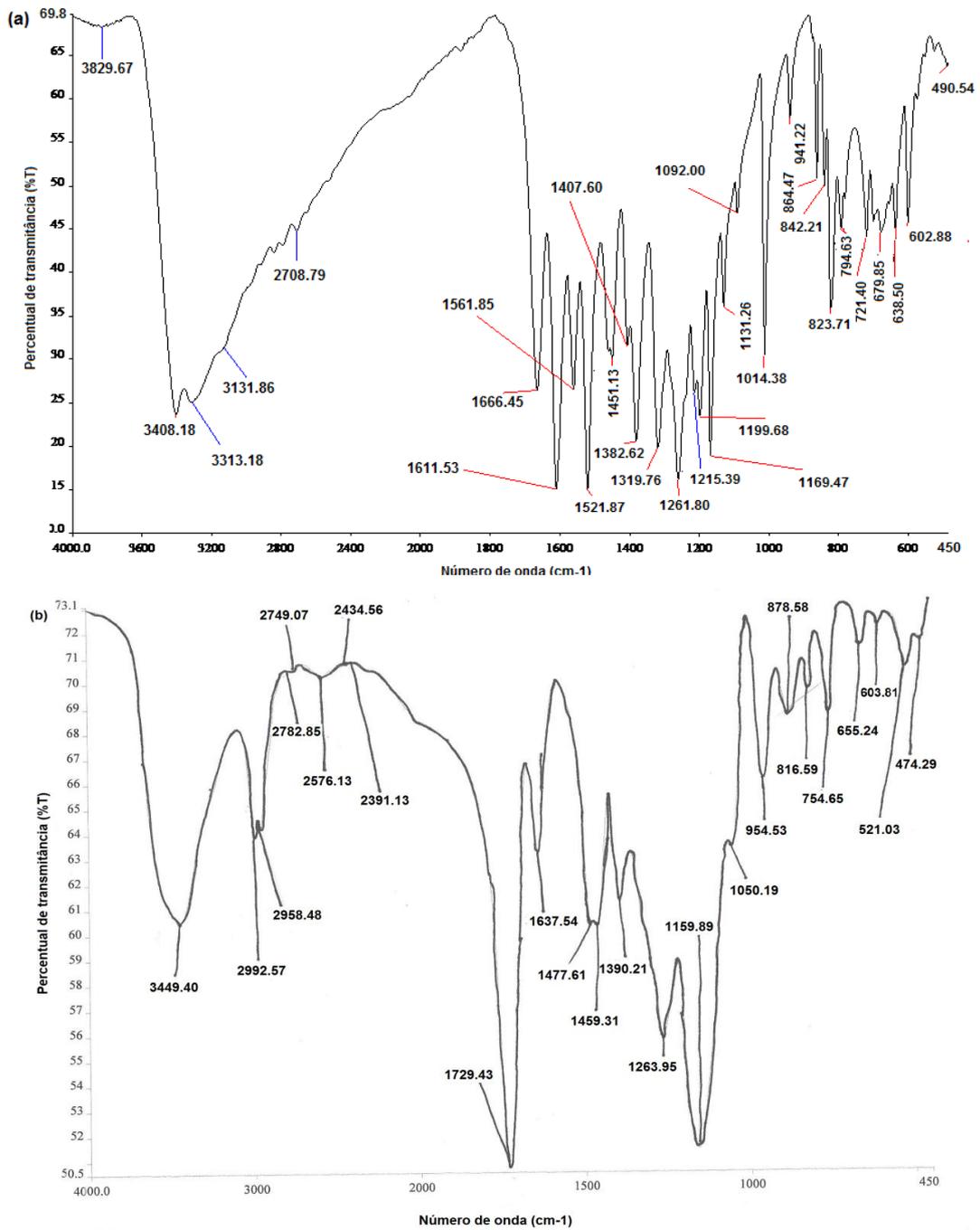


Figura 20 - Espectros de absorção no infravermelho da molécula de QUE (a) e do MIP-QUE (b) após remoção do analito.

### 3.2.3. Otimização do método de extração de QUE

#### 3.2.3.1. Escolha do solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos

Na Figura 21, é mostrada a recuperação de MIP-QUE obtida após a extração de QUE utilizando-se diferentes solventes. Observa-se que o MeOH por ser um solvente muito polar, foram suficientes apenas 2,0 mL para remover completamente a QUE da matriz polimérica. Logo este solvente não foi considerado adequado para as eluições, devido a eluição muito rápida do analito de interesse. Entretanto, quando se utilizou ACN e DCM as recuperações de QUE foram baixas, isso demonstra que tanto um quanto outro (solvente) podem ser utilizados como fase móvel devido a um tempo maior de retenção do analito nos cartuchos. O solvente escolhido para condicionamento dos cartuchos MIP-QUE e eluições foi ACN. Os mesmos testes com esses solventes foram feitos com o NIP (300,0 mg por cartucho) e observou-se que a impressão do MIP de fato é responsável pela retenção de QUE. O gráfico das eluições do NIP é apresentado na Figura 22.

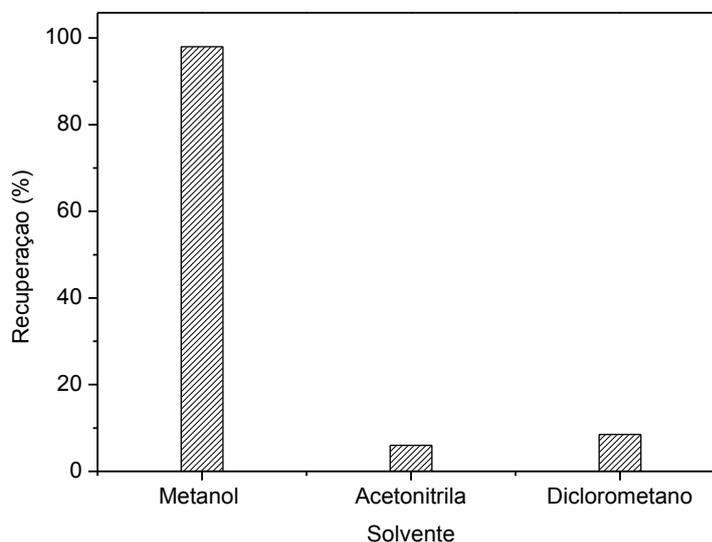


Figura 21 – Recuperação de MIP-QUE obtida após extração com diferentes solventes.

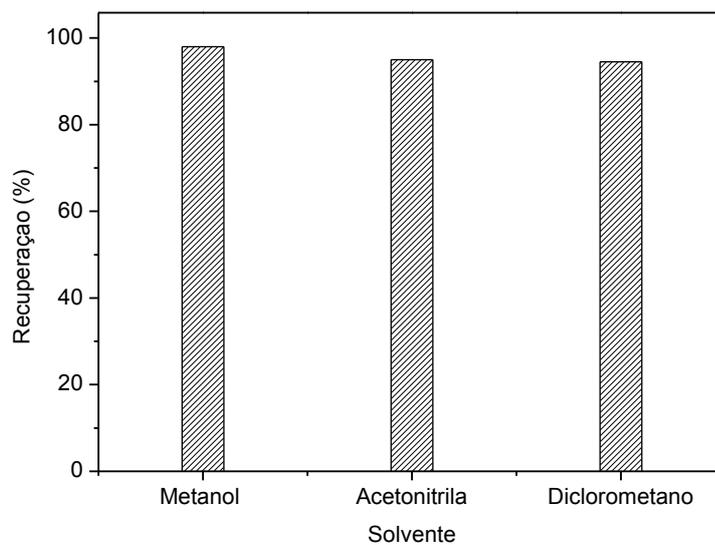


Figura 22 - Recuperação de NIP obtida após extração com diferentes solventes.

### 3.2.4. Estudo quimiométrico para otimização das medições de quercetina em presença de BSA

Primeiramente realizou-se planejamentos somente com a proteína para gerar a superfície de resposta do modelo de regressão. Em seguida realizou-se o mesmo plano experimental com o sistema BSA-quercetina para se obter nova superfície de resposta. A sobreposição destas representações do modelo da fluorescência da BSA, na ausência e presença de quercetina, gerou uma condição otimizada simultânea das condições iniciais (sem analito) e finais (com o analito). A medida de supressão de fluorescência considera a razão  $F_0/F$  e, dessa forma, chega-se a uma maior sensibilidade das curvas de supressão de fluorescência. Considera-se a condição de maior intensidade do sinal do controle (BSA sem analito =  $F_0$ ) e menor fluorescência na presença do analito (F).

#### i) BSA (controle)

Um modo informativo para a apresentação de resultados, que é gerado pelo software, é o gráfico de Pareto. Neste gráfico, são mostradas a contribuição de todas as variáveis, suas interações, e o ranking da importância estatística de cada um deles no sistema.

### a) Estudo quimiométrico dos efeitos

A Figura 23 mostra o gráfico de Pareto resultante do planejamento  $2^2$ , onde as contribuições quadráticas da força iônica e do pH são indicadas. A linha vertical pode ser usada para julgar quais efeitos são estatisticamente significativos. Qualquer barra que estenda além da linha corresponde a um efeito significativo ao nível de 95%. Pelo gráfico nota-se a influência do pH sobre o sinal de fluorescência da BSA mostrando que o aumento da fluorescência é dependente da diminuição dos valores de pH na faixa estudada (indicado pelo sinal negativo do coeficiente do efeito). Não houve efeito de interação significativo.

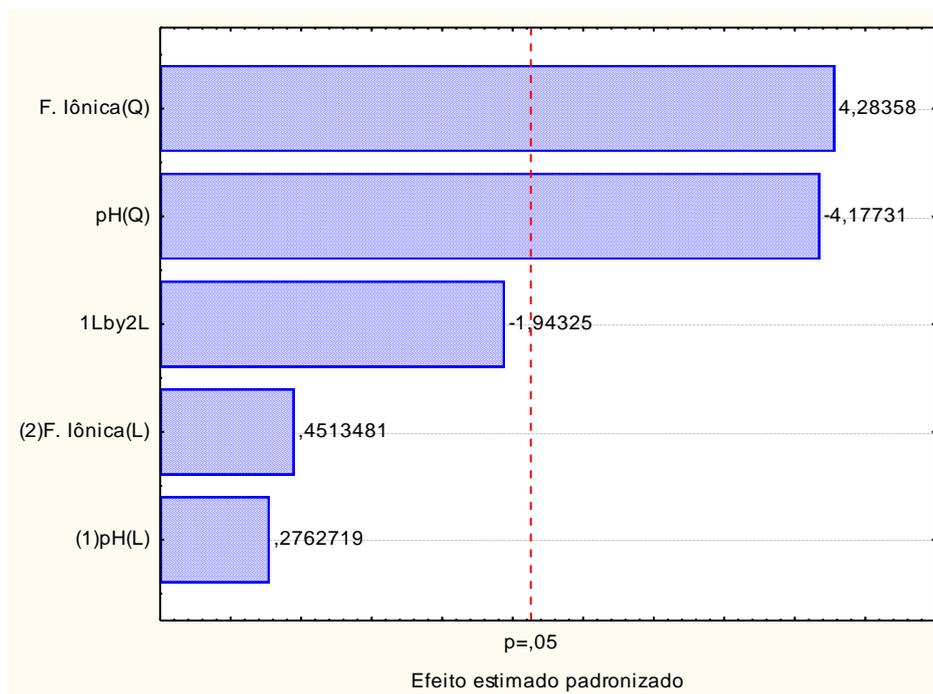


Figura 23 - Gráfico de Pareto indicando a influência significativa dos 2 fatores estudados (pH e força iônica do tampão) para a BSA.

### b) Avaliação do modelo

Pode-se assumir que o sistema estudado é regido por alguma função que é descrita pelas variáveis experimentais. Normalmente esta função pode ser aproximada por um polinômio, o qual pode fornecer uma boa descrição da relação entre os fatores e a resposta obtida. Como a ordem deste polinômio é limitada pelo tipo de planejamento usado, os planejamentos fatoriais de dois níveis podem estimar apenas efeitos principais e interações. Por isso optou-se pelo planejamento fatorial de três níveis (ponto central) para poder incluir a estimativa do grau de curvatura do modelo.

O modelo obtido pode não ser exatamente aquele que descreve a região estudada do sistema e, neste caso, não pode ser usado para fazer estimativas e muito menos para extrair conclusões sobre a região ótima. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando a análise de variância (ANOVA), mostrado na Tabela 6. Por isso, um bom modelo necessita ter uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. Isto equivale a dizer que a maior parte da variação total das observações em torno da média deve ser descrita pela equação de regressão e o restante certamente, ficará com os resíduos. Da variação que fica com os resíduos é esperado que a maior parte fique com o erro puro, que é o erro experimental, e não com a falta de ajuste, que está diretamente relacionada com o modelo. Outros parâmetros para observar se toda variação em torno da média foi explicada pela regressão são o valor do coeficiente de variação  $R^2$  e o gráfico dos resíduos do valor de  $R^2$  representa a fração da variação que é explicada pela falta de ajuste do modelo.

A análise da variância usa as médias quadráticas (MQ) para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa. Com isso se verifica o grau de ajuste do modelo pela comparação da razão  $MQ_R/MQ_r$  ao F crítico correspondente aos graus de liberdade obtidos ( graus de liberdade da média quadrática devida à regressão,  $MQ_R$  e da média quadrática residual,  $MQ_r$ ), devendo esta razão ser MAIOR do que este F crítico. Neste caso, o valor de  $MQ_R/MQ_r = 4,41$  maior do que o valor de F crítico, o que indica que o modelo de regressão é estatisticamente significativo. Para se avaliar a parte da variação explicada pela falta de ajuste do modelo compara-se a razão  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  também ao F crítico correspondente, onde  $MQ_{faj}$  é a média quadrática da falta de ajuste e o  $MQ_{ep}$  é a média quadrática do erro puro. Para não haver falta de ajuste, o valor da razão deve ser menor que o valor de F. Neste caso, a razão (1,68) é menor que o valor de F tabelado e, portanto o modelo proposto não apresenta falta de ajuste com os dados experimentais. A percentagem de variação explicada pela regressão, isto é, a razão entre a soma quadrática devida à regressão e a soma

quadrática total, é  $SQ_R$  (Soma quadrática do modelo de regressão) /  $SQ_t$  (soma quadrática total) = coeficiente de determinação,  $R^2 = 0,55$ . Esse valor porém, não deve ser comparado com 100%, por causa da contribuição devida ao erro puro.

O valor máximo explicável é a diferença entre a soma quadrática total ( $SQ_T$ ) e a soma quadrática do erro puro ( $SQ_{ep}$ ). Neste caso,  $SQ_T - SQ_{ep} = 67291,21 - 11290,77 = 56000,44$ . O valor desta diferença dividido pelo  $SQ_{Total} = 0,8322$  (= 83,22 %) da soma quadrática total. É com este novo valor que devemos comparar a variação explicada pela regressão. O valor de  $F_{5,18}$  calculado de 2,77 (no nível de 95%) indica que o um modelo de regressão é significativo visto que o valor da razão  $MQ_R/MQ_f$  igual a 4,41 é maior que o valor de  $F_{5,18}$  tabelado.

A tabela ANOVA gerada pelo programa Statistica, mostra o valor de F calculado e o valor de p. O programa indica que o valor de F é maior que o F crítico (tabelado) e por isso o modelo é significativo para o nível de confiança definido (neste caso, 95%).

Tabela 6 - Tabela ANOVA do modelo de regressão para a BSA.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>
<b>Regressão</b>	37057,76	5	7411,55
<b>Resíduo</b>	30233,46	18	1679,636
<b>Falta de ajuste</b>	18942,68	3	6314,23
<b>Erro puro</b>	11290,7	15	3752,7183
<b>Total</b>	67291,21	23	
<b>% variação explicável</b>	83,2%		
<b>% de variação explicada pela regressão</b>	55%		

A superfície de resposta é o resultado gráfico obtido pela metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, Response Surface Methodology). Este gráfico mostra a contribuição das variáveis (organizados sempre aos pares) de forma que

a condição ótima, quando atingida, aparece como o máximo da função (superfície). Pela Figura 24 (força iônica versus pH do tampão) pode-se observar que o modelo apresenta ponto de sela (sem um máximo ou mínimo absoluto).

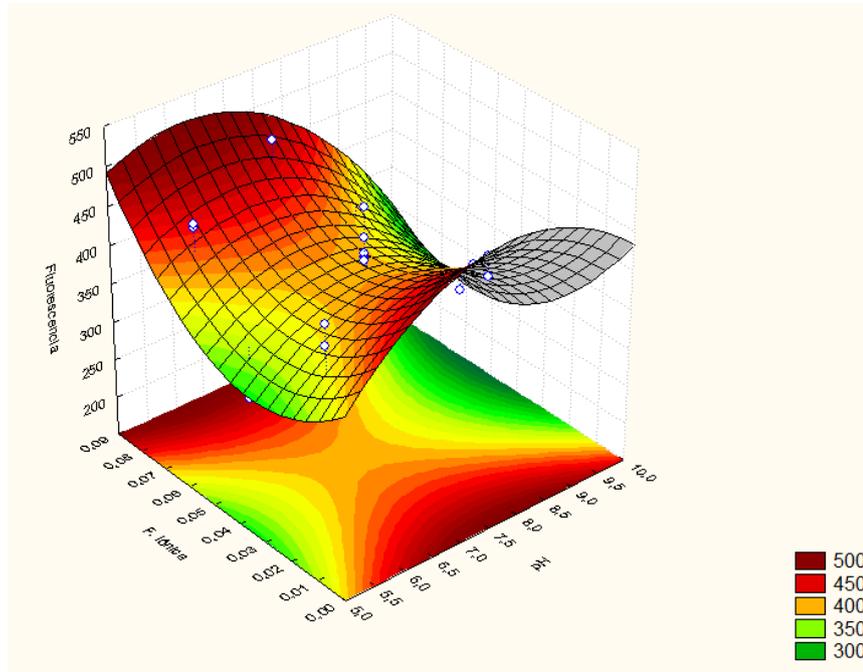


Figura 24 - Representação gráfica do modelo de regressão (gráfico de superfície de resposta) gerado a partir do desenho experimental testado para a BSA. Ponto de máximo 481,74 u.a.

ii) BSA-quercetina

a) Estudo quimiométrico dos efeitos

O gráfico de Pareto (Figura 25) também mostra que os efeitos dos termos quadráticos de pH e força iônica tiveram efeito significativo para a resposta da fluorescência. Os valores positivos dos efeitos indicam que um aumento do valor das variáveis implicará um aumento do sinal da resposta (para a faixa compreendida nos níveis do planejamento).

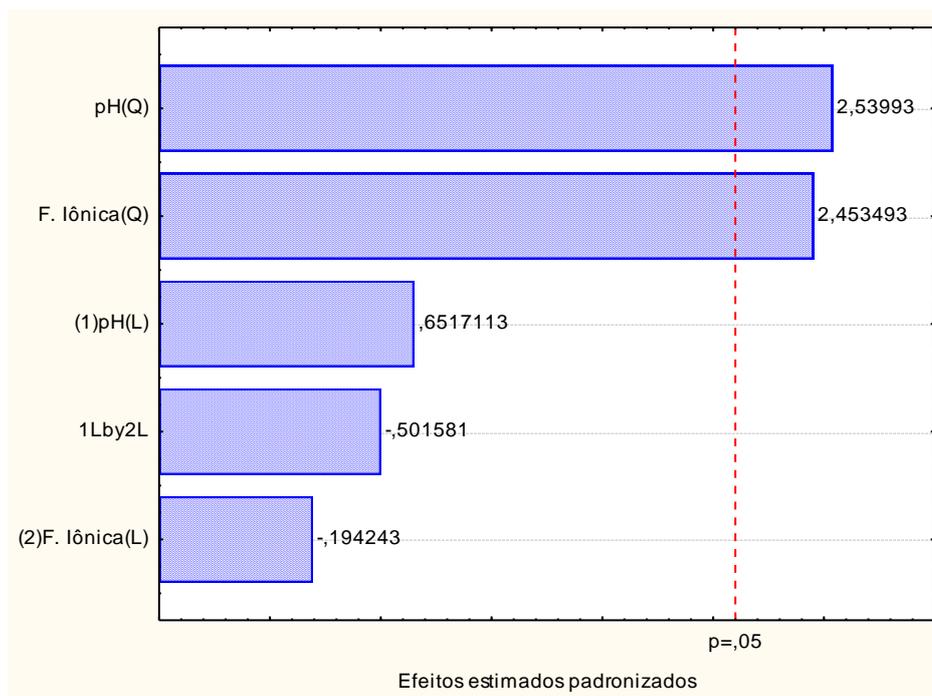


Figura 25 - Gráfico de Pareto indicando a influência significativa dos 2 fatores estudados (pH e força iônica do tampão) para BSA x QUE.

#### b) Avaliação do modelo

De acordo com este planejamento, foram feitas medições de soluções de quercetina  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando 2,5 mL de volume de tampão. Com base nos resultados obtidos deste planejamento, pode-se montar um modelo que descreve o comportamento deste sistema de forma mais adequada, facilitando a visualização da condição ótima de análise.

A regressão apresentou valor de  $R^2$  de 40,4% de um total de 94,2% de variação explicável. O modelo proposto não apresentou falta de ajuste ( $F_{\text{faj}} = 0,54$ ), pois a razão  $MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$  é menor que o valor de F (Tabela 7). Podemos ver pela Figura 26 que o modelo é adequado.

Tabela 7 - Tabela ANOVA do modelo de regressão para BSA x QUE.

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ
Regressão	36818,72	5	7363,743
Resíduo	54192,56	18	3010,698
Falta de ajuste	5295,08	3	1765,03
Erro puro	5295,08	15	3259,83
<b>Total</b>	<b>91011,27</b>	<b>23</b>	
<b>% variação explicável</b>	<b>94,2 %</b>		
<b>% de variação explicada pela regressão</b>	<b>40,4%</b>		

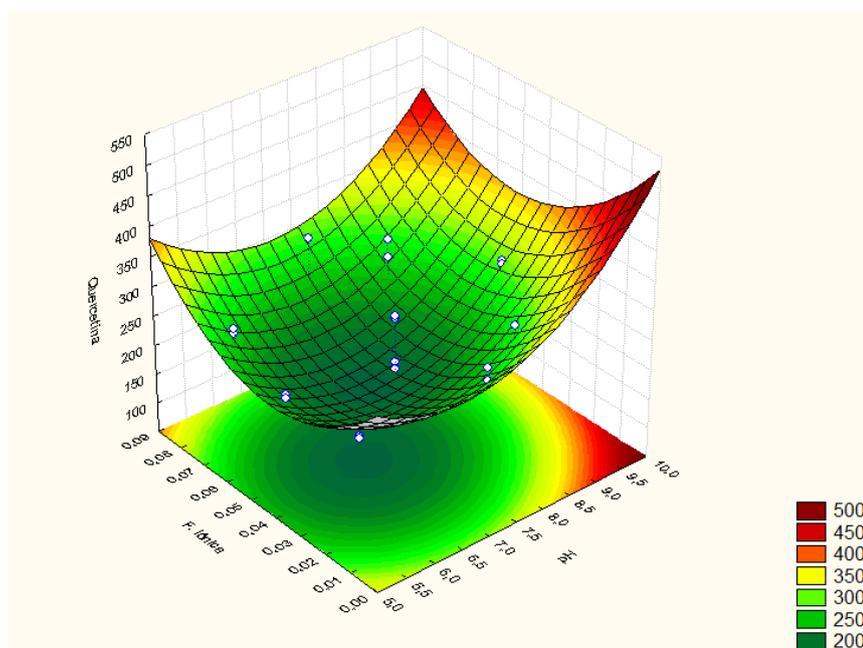


Figura 26 - Representação gráfica do modelo de regressão (gráfico de superfície de resposta) gerado a partir do desenho experimental testado para BSA x QUE. Ponto de mínimo 95,58 u.a.

### 3.2.4.1. Aplicação da otimização com restrição

Tendo obtido todos os modelos de regressão graficamente para o sinal fluorescência do sistema (fração protéica-analito), realizou-se a sobreposição das superfícies de resposta de todos os analitos através da função “desejabilidade” (Figura 27). Este é um método de programação não-linear e, no caso do programa Statistica que usa a abordagem de Derringer e Suich (1980), a ferramenta é a função “desirability”. Neste tratamento as respostas ( $Y_i$ ) são convertidas em uma outra função individual  $d_i$  que varia em uma faixa de  $0 \leq d_i \leq 1$ . Se a resposta for aquela que se quer,  $d_i = 1$  e se a resposta estiver fora da região aceitável,  $d_i = 0$ . Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a “desirability” global. Neste caso, a região identificada será gerada pela sobreposição das superfícies de resposta do controle e do modelo de resposta da fluorescência na presença da quercetina. Na Tabela 8 estão resumidas as condições experimentais para determinação da quercetina.

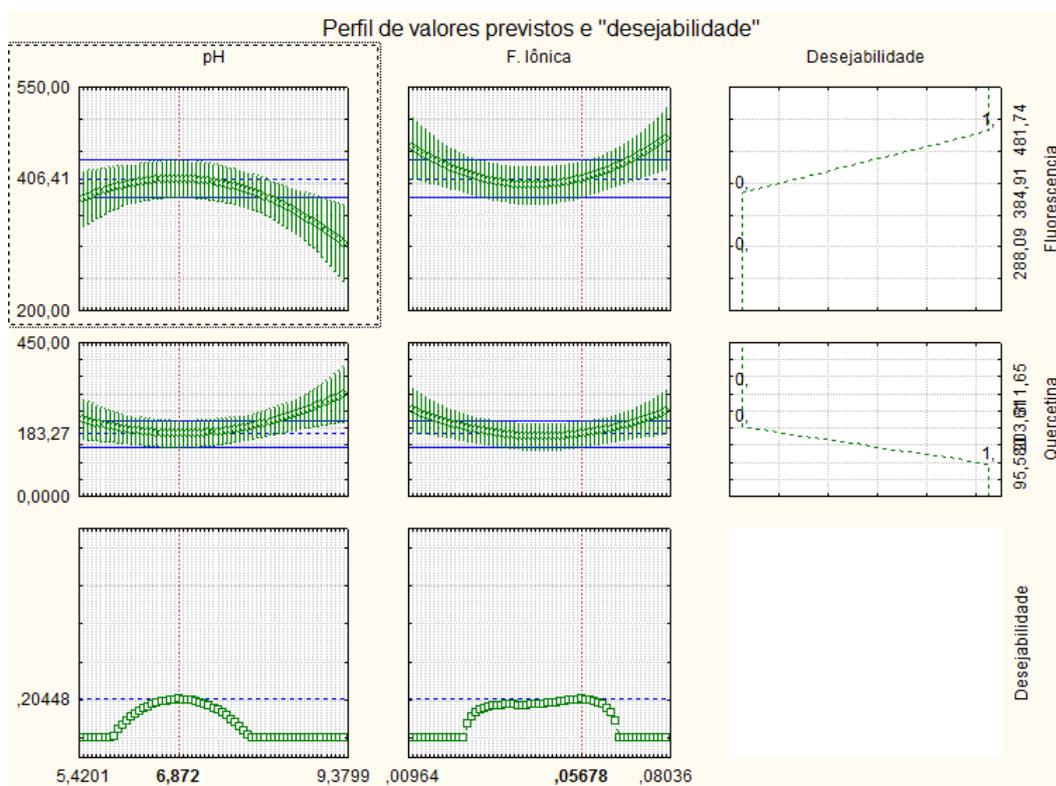


Figura 27 – Gráfico de desejabilidade

Tabela 8- Condições experimentais escolhidas para a determinação de quercetina.

<i>Parâmetros</i>	<i>Condições experimentais</i>
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	280/345 nm
Tampão fosfato (solução estoque)	0,056 mol L <sup>-1</sup>
pH	6,9
BSA (solução estoque)	50 µg µL <sup>-1</sup>
[Quercetina] (solução estoque)	1,0 x 10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>

### 3.2.5. Medições e aplicação do método

#### 3.2.5.1. Medições de BSA em presença de QUE (BSA-QUE)

A QUE induz o “quenching” de fluorescência da BSA na faixa  $2,0 \times 10^{-8}$  a  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. QUE possui um amplo perfil de absorção, portanto os valores de absorção dos pontos referentes a esta faixa foram monitorados nos comprimentos de onda 280 e 345 nm ( $\lambda_{ex}$  e  $\lambda_{em}$  da BSA). Os valores máximos de absorção de QUE para a concentração ( $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) foram de 0,0058 (345 nm) e 0,0097 (280 nm). Portanto comprovou-se que o decréscimo na intensidade do sinal fluorescente da BSA proporcional ao aumento da concentração de QUE era devido a supressão de fluorescência e não efeito de filtro interno, uma vez que os valores de fluorescência corrigidos foram iguais aos valores de fluorescência observados. A constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) calculada através do modelo foi igual a  $2 \times 10^6$  L mol<sup>-1</sup>.

Os espectros da curva de fluorescência do complexo BSA-QUE na faixa de  $2,0 \times 10^{-8}$  a  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> são mostrados na Figura 28. Os flavonóides NAR e FLA foram usados como comparação ao longo do trabalho por possuir estruturas semelhantes à QUE. Para NAR e FLA não foi observado o mesmo perfil de quenching de fluorescência, pois para a concentração de  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> de FLA e NAR observou-se uma diminuição na intensidade do sinal de 17 e 46% respectivamente, enquanto nesta mesma concentração a QUE praticamente extingue todo o sinal da BSA. Portanto a BSA foi considerada um sensor apropriado para determinação de QUE (somente), uma vez que a concentração

máxima de QUE utilizada na curva de trabalho foi de  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Acredita-se que concentrações mais elevadas de NAR fossem capazes de suprimir mais o sinal da BSA, já para FLA isso seria um pouco mais difícil uma vez que na sua estrutura existem possibilidades de favorecer a complexação FLA-BSA (Figura 29).

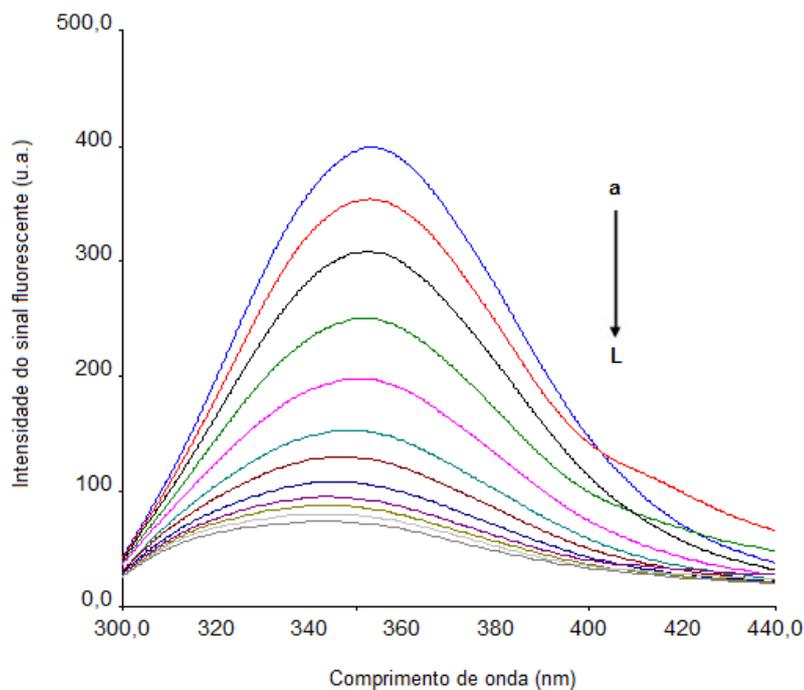


Figura 28 - Espectros da curva BSA com adição crescente de QUE (a) ensaio do controle, (b)  $2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , (c)  $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , (d)  $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , (e)  $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , (f)  $1,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , (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)  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

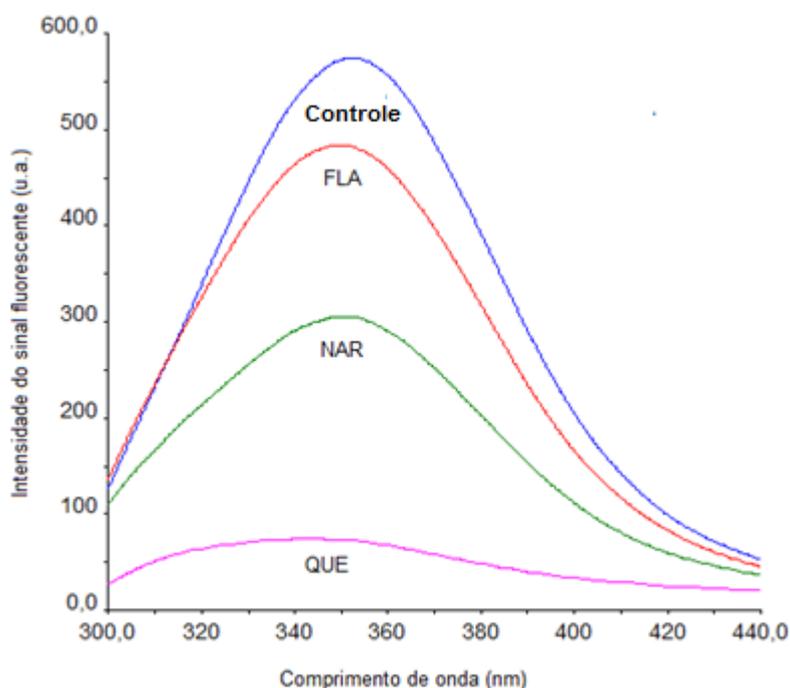


Figura 29 - Espectros de fluorescência de FLA, NAR e QUE na concentração de  $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  em presença de BSA.

### 3.2.5.2. Avaliação de desempenho e seletividade do MIP-QUE

Inicialmente testes para verificar a quantidade de QUE (volume) adicionada aos cartuchos MIP foram realizados a fim de minimizar a perda do analito durante as eluições, considerando-se que todas as soluções estoque foram preparadas em metanol devido a solubilidade dos flavonóides. Aos cartuchos MIP foram adicionadas alíquotas de 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 120,0; 160,0; 200,0; 240,0 e 280,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de QUE  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Foram recolhidos de cada cartucho 7 frações com 1,0 mL de ACN (solvente de eluição) em presença QUE, cada alíquota foi avolumada para 5,0 mL com ACN e as medições foram feitas em espectrofotometria de absorção monitorando-se os comprimentos de onda máximo de absorção da QUE (254 nm).

O gráfico da Figura 30 mostra que a perda de QUE em cada cartucho aumenta consideravelmente com o aumento do volume de solução adicionada. Provavelmente essa perda pode não ser o MeOH e sim a capacidade da coluna. Para as adições de 10,0; 20,0 e 40,0  $\mu\text{L}$  da solução de QUE ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) as recuperações variaram de 91,5 a 89,3% respectivamente. Ou seja, esta faixa foi considerado adequado para uma boa separação/recuperação de QUE. Contudo, a partir da adição de alíquotas de 60,0 a 280,0  $\mu\text{L}$  as recuperações variaram de 87,6

a 56,2% respectivamente, portanto foi escolhido para a continuação dos testes uma alíquota de adição de 20,0  $\mu\text{L}$  de solução de QUE ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) por cartucho.

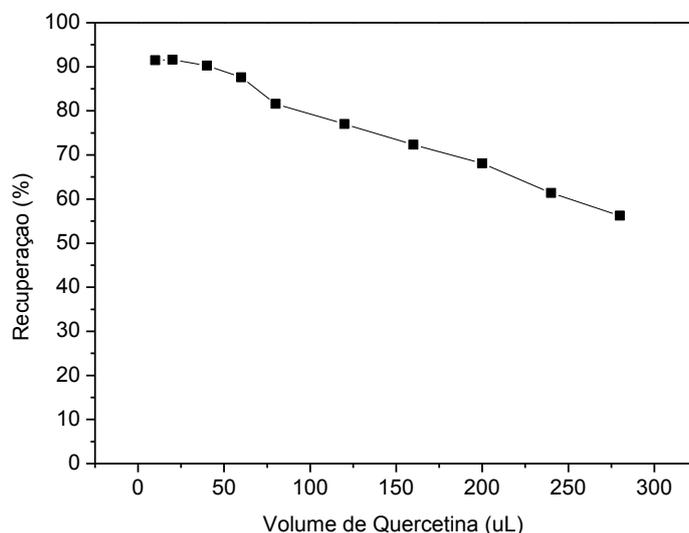


Figura 30 - Percentagem de recuperação com volumes crescentes de solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de QUE adicionados aos cartuchos MIP.

Posteriormente foi avaliada a seletividade e reconhecimento dos analitos QUE, NAR e FLA. A cada cartucho MIP e NIP foram adicionados individualmente 20,0  $\mu\text{L}$  de cada flavonóide na concentração original de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . As eluições foram feitas com ACN (devido ao resultado do teste de eluição), recolheu-se sete alíquotas de 1,0 mL, totalizando 7,0 mL de solvente orgânico (fase móvel) em cada cartucho. As frações foram avolumadas para 5,0 mL com ACN e as medições foram feitas em espectrofotometria de absorção. Os comprimentos de onda monitorados foram 254, 250 e 283 nm, para QUE, FLA e NAR, respectivamente.

Os resultados obtidos (Figura 31) com o MIP indicaram maior seletividade para quercetina em relação aos interferentes testados, o que comprova a eficiência da impressão molecular. Observa-se que após a eluição com 6,0 mL de ACN (fração 1 a 6) foram recuperados aproximadamente 8 % de QUE, e com a adição de mais 1,0 mL de solvente ao cartucho (fração 7) obteve-se uma recuperação de aproximadamente 91% de QUE, garantindo um bom reconhecimento do analito em relação a matriz polimérica. Contudo, como já era esperado para os analitos FLA e NAR não se obteve um reconhecimento

expressivo uma vez que com apenas 2,0 mL de ACN recuperou-se praticamente 100% de cada flavonóide. Este resultado foi considerado excelente, pois indica uma possível separação de QUE em uma amostra contendo uma mistura dos três analitos. O mesmo teste foi feito para o NIP (Figura 32) Não foi observado seletividade para nenhum flavonóides. A recuperação de 100% dos analitos com a adição de somente 2,0 mL de ACN mostra mais uma vez o sucesso da impressão molecular.

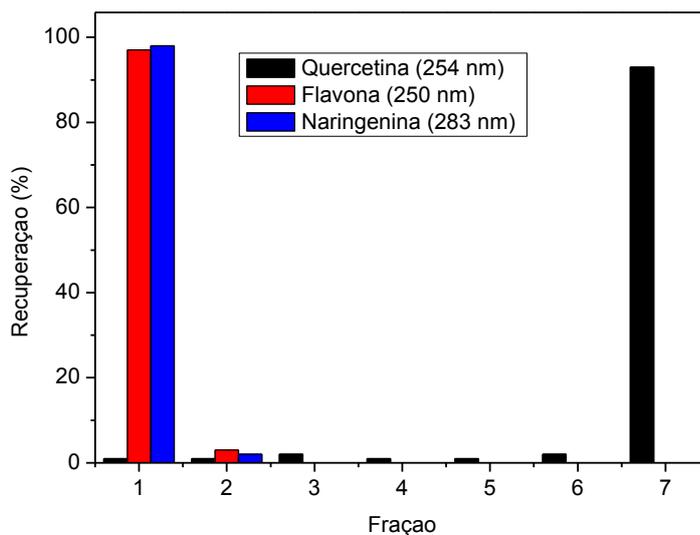


Figura 31 - Eluição do MIP-QUE para QUE e interferentes (FLA e NAR).

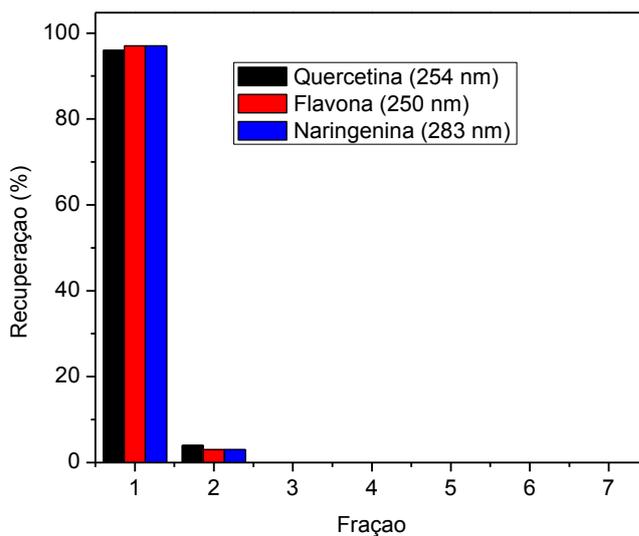


Figura 32 - Eluição do NIP para QUE e interferentes (FLA e NAR).

Testes similares para avaliar o reconhecimento do NIP e MIP em eluições com QUE foram feitos e monitorados com a sonda fluorescente BSA, nas mesmas condições de eluição citadas anteriormente. De cada fração eluída foram retiradas alíquotas de 20,0  $\mu\text{L}$ , e estas foram levadas a condição de trabalho da sonda fluorescente (5,0  $\mu\text{L}$  de BSA 50,0  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e 2,0 mL de tampão fosfato 0,05  $\text{mol L}^{-1}$  e pH 6,9). O gráfico com esses resultados encontra-se na Figura 33, e novamente foi observado que a QUE no cartucho MIP só é recuperado em quantidade considerável na sétima fração (recuperação de 92,3%). Já no NIP o reconhecimento de QUE não foi bom, pois se recupera praticamente 90% do analito na primeira fração. Desta forma verificou-se que a sonda fluorescente BSA também foi adequada para determinação de QUE.

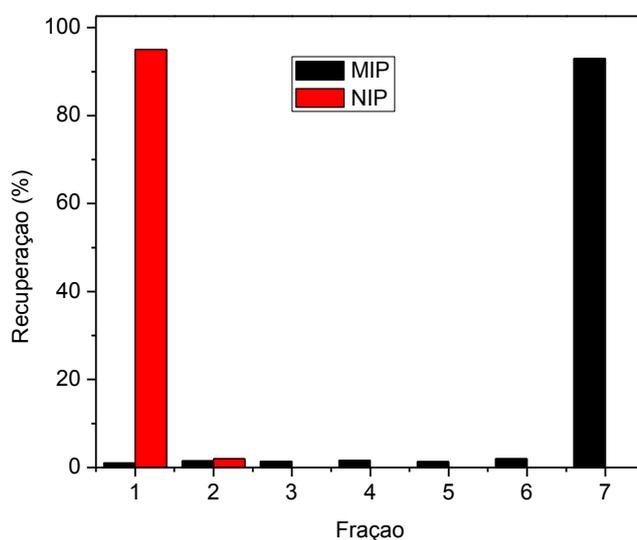


Figura 33 – Testes de recuperação de QUE nos cartuchos MIP e NIP após eluição de sete frações (cada cartucho), com medições na sonda fluorescente BSA.

Posteriormente foi feita uma mistura dos três flavonóides na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , desta solução, alíquotas de 20,0  $\mu\text{L}$  foram adicionadas aos cartuchos MIP a as eluições foram feitas com até 7,0 mL de ACN. Cada fração coletada (1,0 mL) foi avolumada em balão volumétrico de 5,0 mL e alíquotas de 10,0  $\mu\text{L}$  foram injetadas no HPLC. Nos cromatogramas obtidos (Figura 34) observa-se que após eluição feita com até 2,0 mL de ACN (Figura 34a) os interferentes foram completamente recuperados (100%), contudo houve uma pequena perda de 4% de QUE (insignificante). Na Figura 34b observa-se uma boa recuperação de QUE na sétima fração (93,4%) e na Figura 34c é mostrado o

cromatograma da mistura contendo os padrões de NAR, QUE e FLA passados pela coluna MIP, onde os tempos de retenção foram de 16.1, 19.6 min e 26.2 min respectivamente. Logo, o MIP-QUE se mostrou eficiente para a separação de QUE em uma mistura contendo os flavonoides FLA e NAR.

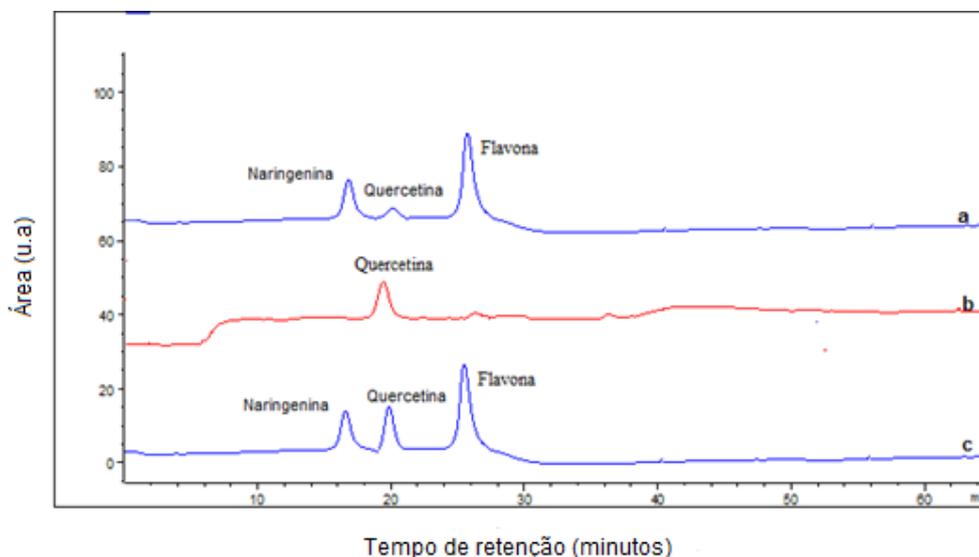


Figura 34 - Cromatograma (a) NAR, QUE e FLA eluídos do cartucho MIP após adição de 2,0 mL de ACN, (b) QUE passada pelo MIP e eluída com 7,0 mL de ACN e (c) mistura dos padrões dos flavonoides  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> NAR  $t_R=16,1$  min., QUE  $t_R= 19,6$  min. e FLA  $t_R=26,2$ min.

Considerando que o suplemento alimentar possui ácido ascórbico foi feito um teste de recuperação com um padrão deste ácido, seguindo o mesmo procedimento de eluição mencionado para os flavonóides. Foi observado mais uma vez que 2,0 mL de ACN são suficientes para recuperar todo o ácido ascórbico. Na Figura 35 encontram-se os gráficos com as recuperações para as eluições do ácido ascórbico (MIP e NIP).

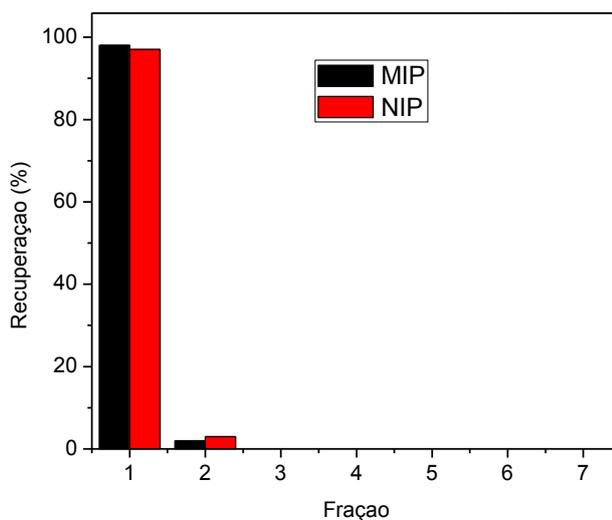


Figura 35 - Eluição de ácido ascórbico nos cartuchos MIP e NIP.

### 3.2.5.3.

#### Aplicação do MIP-QUE como SPE em amostras de suplemento alimentar e urina

Nos testes com o suplemento alimentar foram adicionados aos cartuchos MIP 20,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  do suplemento (referente a concentração de QUE). As eluições foram realizadas conforme mencionado anteriormente e as medições das alíquotas foram feitas através de cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD) (monitoramento a 254 nm e injeção de 20,0  $\mu\text{L}$ ). Conforme observado em testes anteriores o ác. ascórbico pode ser recuperado com apenas 2,0 mL de ACN enquanto a QUE só foi recuperada em quantidade significativa na sétima fração o que garantiu o sucesso no uso do MIP. Na Figura 36 são apresentados os cromatogramas da mistura dos padrões QUE e ácido ascórbico passados pela coluna MIP (36a), do suplemento alimentar (36b) ambos na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Após eluição as frações 1 e 2 foram misturadas e o cromatograma destas frações (36c) indica que ácido ascórbico foi recuperado completamente com um pequeno resíduo de QUE. O monitoramento da fração 7 (d) indicou que 93,6 % de QUE foi recuperada livre de ácido ascórbico. Os tempos de retenção foram de 19,6 min para QUE e 8,2 min. para o ácido ascórbico.

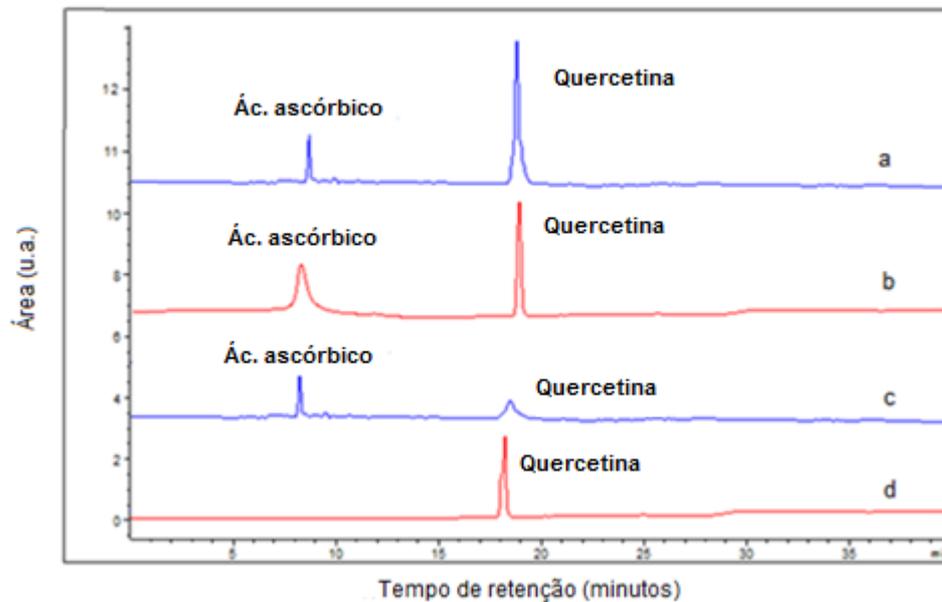


Figura 36 - (a) cromatograma da mistura de QUE e ácido ascórbico ( $1,0 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ ), (b) cromatograma do suplemento alimentar sem passar pelo MIP ( $1,0 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ ), (c) cromatograma das primeiras frações (2,0 mL) recolhidas da eluição no MIP-QUE e (d) cromatograma da sétima fração eluída no MIP-QUE.

Esse mesmo teste foi repetido, e monitorado por Espectrofotometria de absorção. Os resultados foram compatíveis com os encontrados na detecção por HPLC, e indicaram uma recuperação de 91,7% para QUE na sétima fração e de 98,0% de ácido ascórbico nas frações 1 e 2.

Nos testes com urina, os cartuchos MIP foram carregados com 100,0  $\mu L$  de amostras de urina enriquecidas com 20,0  $\mu L$  de uma solução de QUE  $1,0 \times 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ . A limpeza da matriz foi feita através da eluição com 5,0 mL de água sem perda significativa de QUE. Nos cromatogramas da Figura 37, observa-se o perfil da amostra de urina sem tratamento (37a), ou seja sem passar pelo cartucho MIP, neste estão contidos muitos interferentes. O cromatograma (37b) representa o último mL de água recolhido da coluna MIP, onde observa-se uma melhora em relação aos interferentes (limpeza) na região de interesse (tempo de retenção próximo a 20 min).

Em seguida foram adicionados aos cartuchos 4,0 mL de MEOH, estes foram recolhidos em uma única fração. Utilizou-se metanol devido a maior polaridade em comparação com ACN, habilitando o uso de um volume menor de solvente orgânico. Essa fração foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em balão volumétrico de 5,0 mL com ACN. Uma alíquota de 20,0  $\mu L$

da fração orgânica foi injetada no HPLC. No cromatograma (37c) observa-se que a recuperação de QUE foi de 92,5%. Mais uma vez a utilização MIP mostrou-se satisfatória.

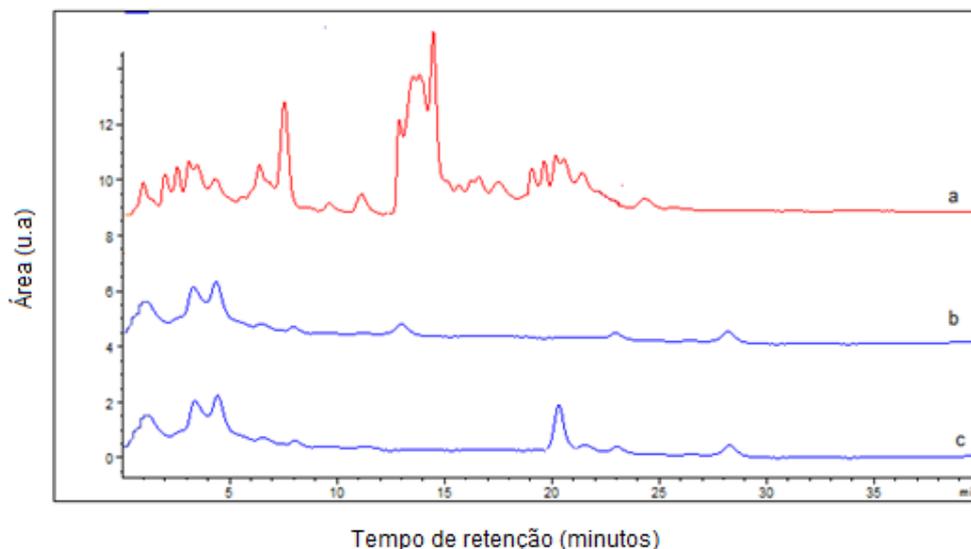


Figura 37 - Cromatogramas: (a) amostra sem tratamento (b) fração da urina após eluição no MIP (livre de interferente na região da QUE) e (c) fração da urina fortificada com QUE após eluição com 4,0 mL de MeOH.

Este teste foi repetido, agora com monitoramento da sonda fluorescente BSA (Figura 38). Os cartuchos MIP foram carregados com 100,0  $\mu\text{L}$  de urina fortificada com 20,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de QUE  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Foram adicionados no total 10,0 mL de água para a limpeza da matriz sem perda significativa de QUE. Na Figura 38a observa-se o perfil de fluorescência da sonda na presença de urina sem tratamento prévio, onde é possível perceber uma saturação do sinal fluorescente. Na Figura 38b é mostrado o espectro da sonda com urina passada pelo cartucho MIP e lavada com 5,0 mL de água ultrapurificada. Observou-se que 5,0 mL de água não foram suficientes para limpar a matriz de urina, portanto utilizou-se mais 5,0 mL de água, até que o sinal do controle da sonda permanecesse constante (Figura 38c). Em seguida 4,0 mL de metanol foram adicionados ao cartucho MIP e o volume recolhido foi levado a secar sob fluxo de nitrogênio, e o material foi retomado em 5,0 mL de ACN ( $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  de QUE). Uma alíquota de 20,0  $\mu\text{L}$  dessa solução foi levada a condição de trabalho da sonda fluorescente. A recuperação de QUE foi de 93,4 %. Na Figura 38d é mostrado o espectro da sonda em presença da urina fortificada e extraída no MIP conforme mencionada acima.

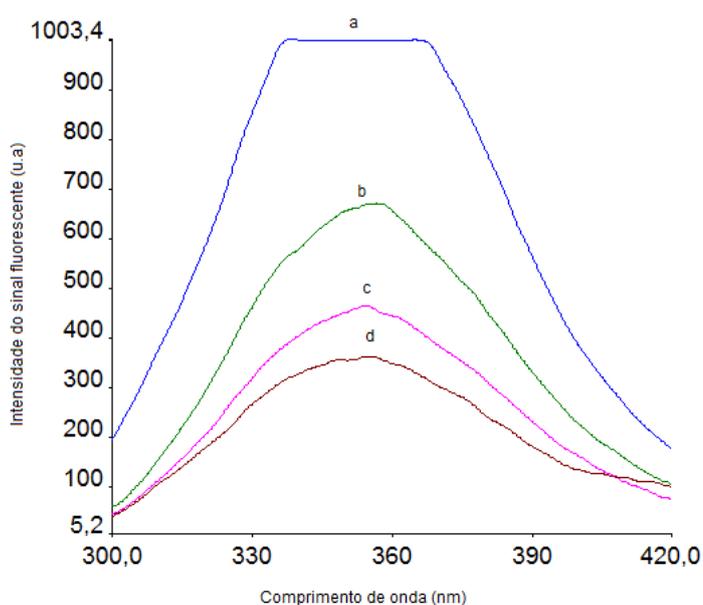


Figura 38 - Espectros de fluorescência da sonda de BSA: (a) com urina sem tratamento, (b) com urina após passar 5,0 mL de água, (c) após passar mais 5,0 mL de água e (d) recuperação de QUE na amostra de urina fortificada

Na Tabela 9 são apresentados todos os resultados de recuperação obtidos para as determinações de QUE em amostras de suplemento alimentar e urina.

Tabela 9 - Percentuais de recuperação obtidos em amostras de suplemento e urina enriquecida.

	<i>Suplemento alimentar (n=3)</i>	<i>Urina (n=3)</i>
Espectrofotometria de absorção	91,7 ± 1,8 %	93,0 ± 2,3 %
Espectrofluorimetria	-	93,4 ± 2,7 %
cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD)	93,6 ± 1,7 %	92,5 ± 1,4 %

### **3.2.6. Parâmetros da validação do método analítico**

De acordo com os testes anteriores, o MIP mostrou-se bastante seletivo. A seguir serão apresentados os demais parâmetros da validação: linearidade da resposta analítica, limite de detecção, limite de quantificação e precisão.

#### **3.2.6.1. Linearidade da resposta analítica**

Os parâmetros das curvas analíticas foram obtidos pela regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados, quando a variância é homogênea ao longo dos pontos amostrados, isto é, quando existe homoscedasticidade.

A avaliação da linearidade foi realizada através de ensaios com soluções padrão. Construíu-se três curvas analíticas, sendo cada ponto da curva o resultado médio de três medições com respectivos desvios. As faixas lineares obtidas cobriram as concentrações de analito entre  $2,0 \times 10^{-7}$  a  $6,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. (Figura 39)  $5,0 \times 10^{-9}$  a  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (Figura 40) e  $2,0 \times 10^{-8}$  a  $4,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (Figura 41) para determinações em espectrofotometria de absorção, cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD) e espectrofluorimetria respectivamente.

Os coeficientes angular e linear e o coeficiente de correlação das curvas analíticas encontram-se nas Tabelas 10, 11 e 12 onde são mostrados os resultados para as curvas analíticas obtidas por espectrofotometria de absorção, HPLC-DAD e pela sonda BSA. Na Tabela 13 são mostrados os parâmetros das curvas analíticas para os demais interferentes.

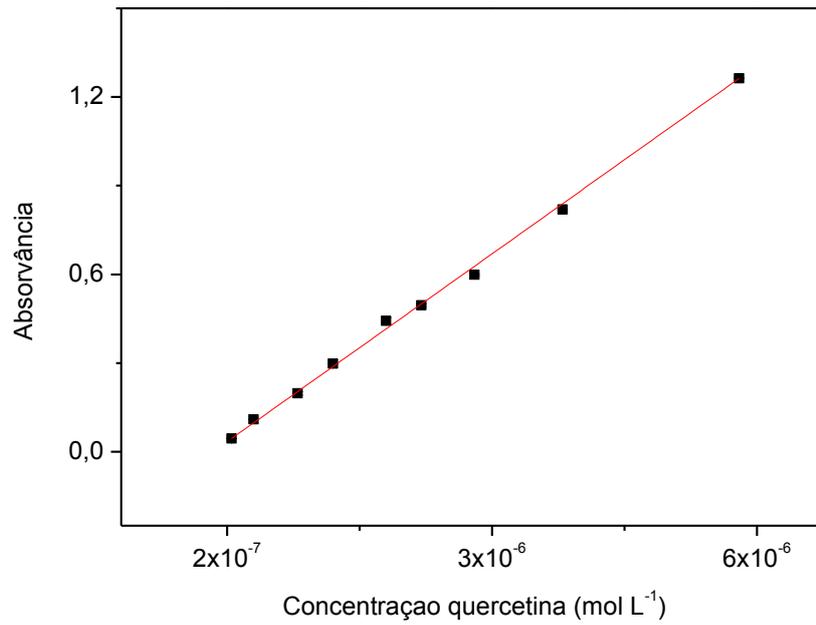


Figura 39 - Curva analítica obtida por espectrofotometria de absorção, para determinação de QUE.

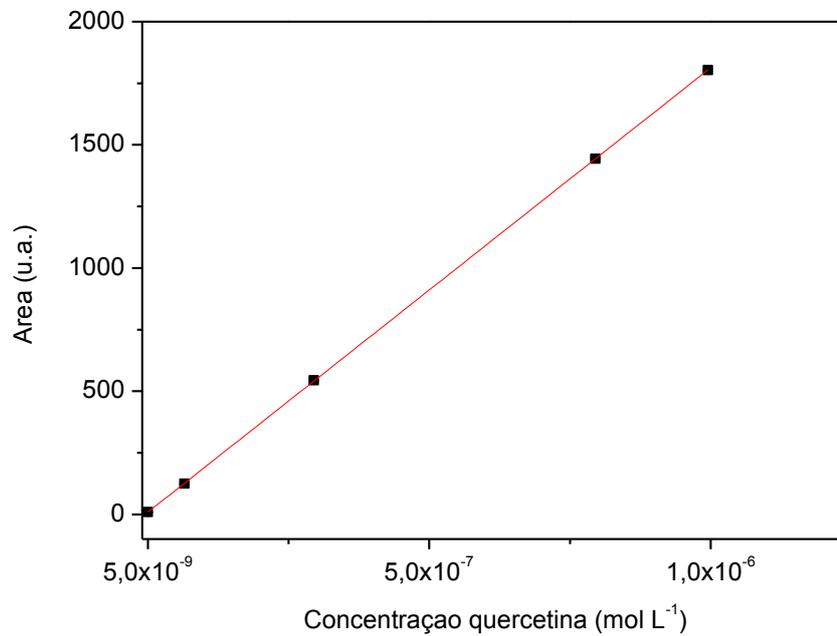


Figura 40 - Curva analítica obtida por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD) para determinação de QUE

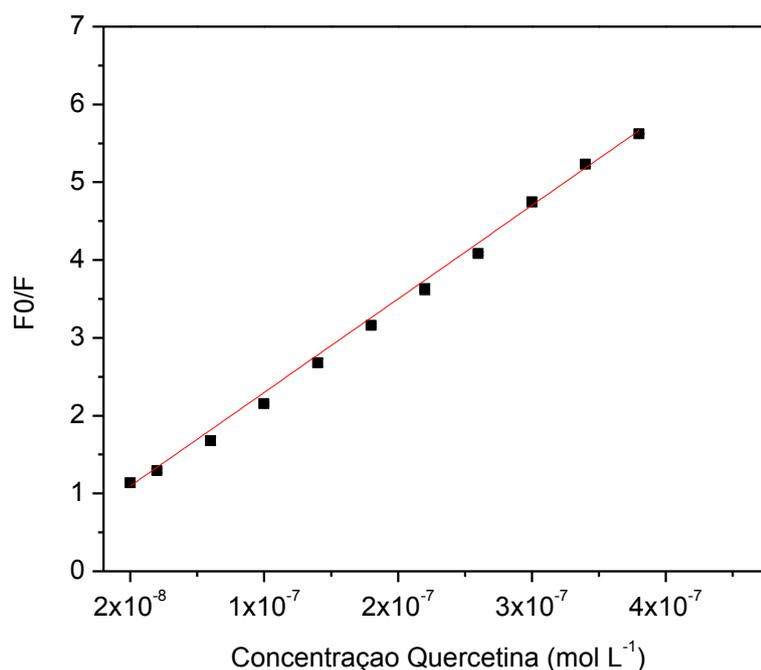


Figura 41 - Curva analítica obtida por espectrofluorimetria para determinação de QUE.

Tabela 10 - Parâmetros da curva analítica por espectrofotometria de absorção.

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	$2,23 \times 10^{+b}$	$2,23 \times 10^{+b}$	$2,21 \times 10^{+b}$	$2,22 \times 10^{+b}$
Interseção	$-1,71 \times 10^{-2}$	$-2,11 \times 10^{-2}$	$-1,57 \times 10^{-2}$	$-1,80 \times 10^{-2}$
R <sup>2</sup>	0,987	0,989	0,990	0,989

Tabela 11 - Parâmetros das curvas analíticas por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	$1,88 \times 10^{+9}$	$1,89 \times 10^{-2}$	$1,85 \times 10^{-2}$	$1,87 \times 10^{-2}$
Interseção	$1,028 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^{-2}$	$1,99 \times 10^{-2}$	$1,54 \times 10^{-2}$
R <sup>2</sup>	1,00	0,999	0,996	0,998

Tabela 12 - Parâmetros das curvas analíticas de complexação QUE-BSA por espectrofluorimetria.

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	$1,21 \times 10^{+7}$	$1,22 \times 10^{+7}$	$1,22 \times 10^{+7}$	$1,22 \times 10^{+7}$
Interseção	$7,69 \times 10^{-1}$	$7,40 \times 10^{-1}$	$7,88 \times 10^{-1}$	$7,66 \times 10^{-1}$
R <sup>2</sup>	0,997	0,997	0,998	0,998

Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas dos padrões de interferentes obtidas por Espectrofotometria de absorção e por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).

<b>Interferentes</b>	<b>Faixa (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Equação da reta</b>
<b>Espectrofotometria de absorção</b>			
<b>Naringenina</b>	2,0x10 <sup>-7</sup> a 4,0x10 <sup>-6</sup>	0,994	Y=1,795x10 <sup>4</sup> x + 1,78x10 <sup>-2</sup>
<b>Flavona</b>	1,0x10 <sup>-6</sup> a 4,0x10 <sup>-5</sup>	0,994	Y=1,824x10 <sup>4</sup> x + 4,72x10 <sup>-3</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	1,0x10 <sup>-7</sup> a 8,0x10 <sup>-6</sup>	0,998	Y=8,684x10 <sup>4</sup> x + 2,78x10 <sup>-3</sup>
<b>cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD)</b>			
<b>Naringenina</b>	3,0x10 <sup>-9</sup> a 5,0x10 <sup>-7</sup>	0,996	Y=3,042x10 <sup>9</sup> x + 1,22x10 <sup>1</sup>
<b>Flavona</b>	5,0x10 <sup>-8</sup> a 5,0x10 <sup>-6</sup>	0,989	Y=1,31x10 <sup>8</sup> x + 2,08x10 <sup>1</sup>
<b>Ácido ascórbico</b>	1,0x10 <sup>-9</sup> a 5,0x10 <sup>-7</sup>	0,999	Y=9,08x10 <sup>8</sup> x + 1,27x10 <sup>1</sup>

O método dos mínimos quadrados parte do pressuposto que os resíduos seguem uma distribuição normal, tem variância constante ao longo do eixo x e são independentes, ou seja, não há autocorrelação dos resíduos. Para verificar o ajuste ao modelo linear utilizou-se o teste F. O bom ajuste ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória no gráfico dos resíduos em torno da média (zero) apresentada nas Figuras 42-44 para determinações por espectrofotometria de absorção, cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD) e sonda fluorescente BSA, respectivamente.

O ajuste ao modelo linear e a significância da regressão foi verificado através da ANOVA. A análise demonstrou regressões significativas ( $p < 0,001$ ) e o ajuste ao modelo linear ( $p > 0,05$ ) para as duas técnicas utilizadas.

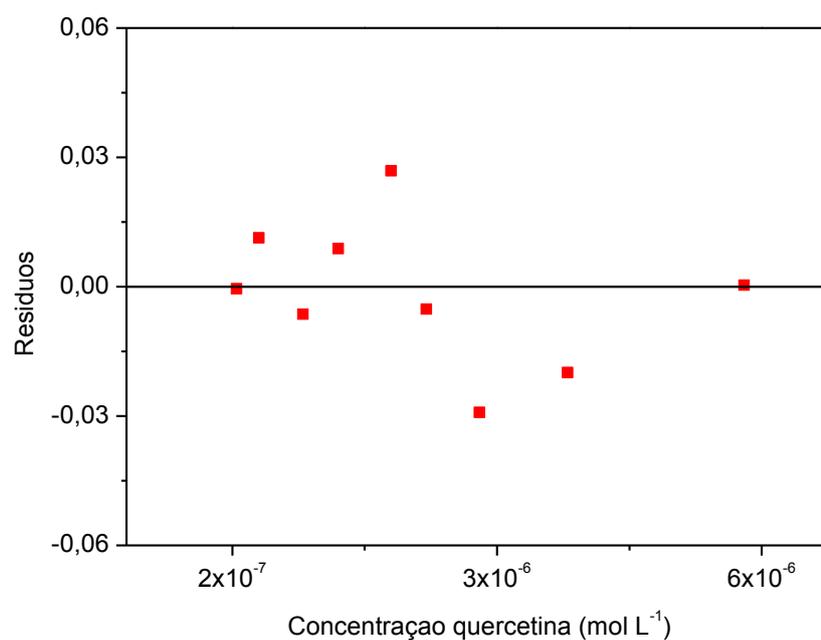


Figura 42 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a quercetina na determinação por espectrofotometria de absorção.

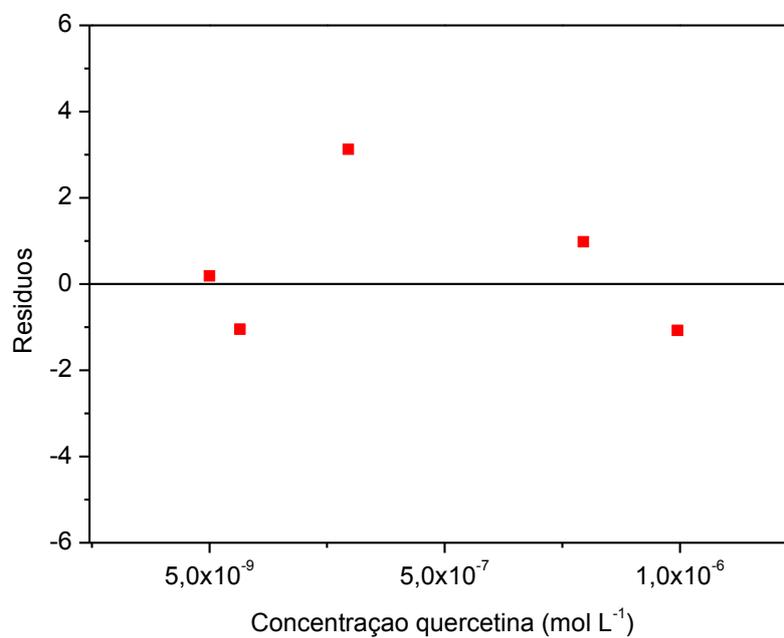


Figura 43 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a quercetina na determinação por cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD).

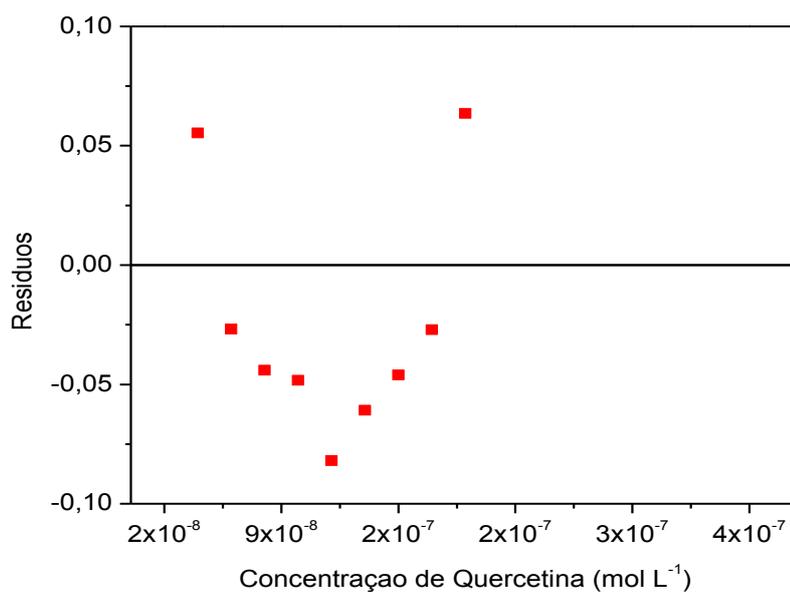


Figura 44 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a QUESBSA na determinação por espectrofluorimetria.

Na Figura 44, embora não estejam distribuídos aleatoriamente em relação à linha de resíduo zero, o modelo linear obtido apresentou um bom ajuste, como se pode observar pelo valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### 3.2.6.2.

#### Limite de detecção e de quantificação

O cálculo para obtenção dos LOD e LOQ foi realizado conforme Equação 7,8,9 e 10 descritas no capítulo 2. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - LOD e LOQ para a determinação da quercetina por espectrofotômetro, HPLC-DAD e sonda fluorescente BSA.

	<i>Espectrofotometria</i>	<i>HPLC-DAD</i>	<i>BSA</i>
LOD	$4,58 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	$2,53 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	$1,96 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$
LOQ	$7,32 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$	$4,33 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	$6,53 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$

### 3.2.6.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos da repetitividade. A repetitividade foi calculada pelo desvio padrão relativo (% RSD) indicado na Equação 11 conforme descrita na página 95. Foi avaliada uma concentração dentro da faixa de trabalho  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos por meio de 12 experimentos consecutivos produziram um % RSD de 6,4; 5,8 e 5,1 para as determinações espectrofométricas, cromatográficas e espectrofluorimétricas (sonda BSA), respectivamente.

### 3.2.6.4. Comparação da precisão entre métodos

Testes foram realizados entre os três métodos, comparando o método de referência adaptado (HPLC-DAD) com os métodos espectrofluorimétrico e espectrofotométrico. A concentração escolhida para o teste foi de  $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . O teste de t Student foi aplicado para  $n=5$  e os resultados se mostraram satisfatórios para um nível de 95% de confiança ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ), conforme mostrado na Tabela 15.

Tabela 15 - Resultados encontrados entre os métodos espectrofotômetro, HPLC-DAD e fluorimétrico (sonda BSA).

<i>n</i>	<i>Espectrofotometria</i> ( <i>mol L<sup>-1</sup></i> )	<i>HPLC-DAD</i> ( <i>mol L<sup>-1</sup></i> )	<i>Espectrofluorimetria</i> ( <i>mol L<sup>-1</sup></i> )
1	$3,50 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$
2	$3,56 \times 10^{-7}$	$3,80 \times 10^{-7}$	$3,12 \times 10^{-7}$
3	$3,90 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$	$3,23 \times 10^{-7}$
4	$3,00 \times 10^{-7}$	$3,20 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$
5	$3,00 \times 10^{-7}$	$3,00 \times 10^{-7}$	$3,11 \times 10^{-7}$
Média	$3,39 \times 10^{-7}$	$3,20 \times 10^{-7}$	$3,09 \times 10^{-7}$
Desvio padrão	$3,89 \times 10^{-8}$	$3,46 \times 10^{-8}$	$9,62 \times 10^{-9}$
$t_{\text{calculado}}$	0,434		0,521
$t_{\text{tabelado}}$	2,306		

### 3.3. MIP-Kanamicina

#### 3.3.1. Caracterização do MIP-KANA

A partir da fração de material (MIP-kanamicina) recolhido na peneira de 106,0  $\mu\text{m}$  foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 45). Observa-se uma diferença em relação as imagens obtidas com polímeros acrílicos o que evidencia a diferença da matriz acrílica para a Sol-Gel. Nas Figuras 45 a e b são observados pequenos aglomerados da matriz Sol-Gel.

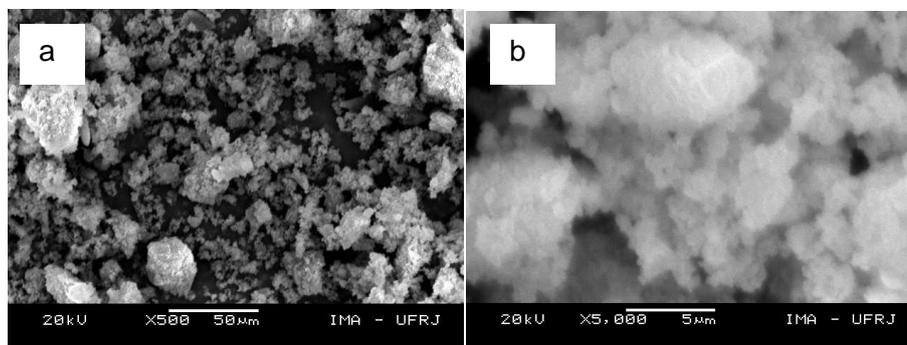


Figura 45 - Micrografias eletrônicas de varredura do MIP-kanamicina na matriz sol-gel (a) com aumento de 500 vezes e (b) com aumento de 5.000 vezes.

A Figura 46a mostra o espectro de infravermelho da kanamicina. É possível atribuir as bandas intensas no intervalo entre 3500 e 2941  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento N-H de amina primária e estiramento OH de álcool primário, ambos presentes na molécula de KANA. Já a banda intensa, em 2879  $\text{cm}^{-1}$  é característica de estiramento C-H referente aos carbonos  $\text{CH}_2$  na estrutura da KANA. As bandas em 1654 e 1595  $\text{cm}^{-1}$  podem ser identificadas como deformação dos grupos  $\text{NH}_2$ . O intervalo entre 1144 e 1032  $\text{cm}^{-1}$  é justificado por estiramento C-O-C em éter. Por fim a banda em 611  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída as ligações C-O-H. Na Figura 46b, encontra-se o espectro de infravermelho do MIP-KANA após a remoção do template. A diferença nas intensidades das bandas são um indício de que a limpeza da matriz foi eficiente. As bandas em 3367 e 3298  $\text{cm}^{-1}$ , indicam a presença de grupos  $\text{NH}_2$  na matriz polimérica provenientes do APTMS, os sinais em 2935 e 2883  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídos aos carbonos  $\text{CH}_2$  no APTMS assim como as bandas em 1414 a 1471  $\text{cm}^{-1}$ . Já as bandas intensas em 1120 e 1050

$\text{cm}^{-1}$ , são características de estiramento C-O em éter e a estiramento Si-O-Si proveniente da rede polimérica (formado após hidrólise e reação de polimezação). Por fim as bandas localizadas em 866 e 784  $\text{cm}^{-1}$  são correspondentes ao estiramento Si-C.

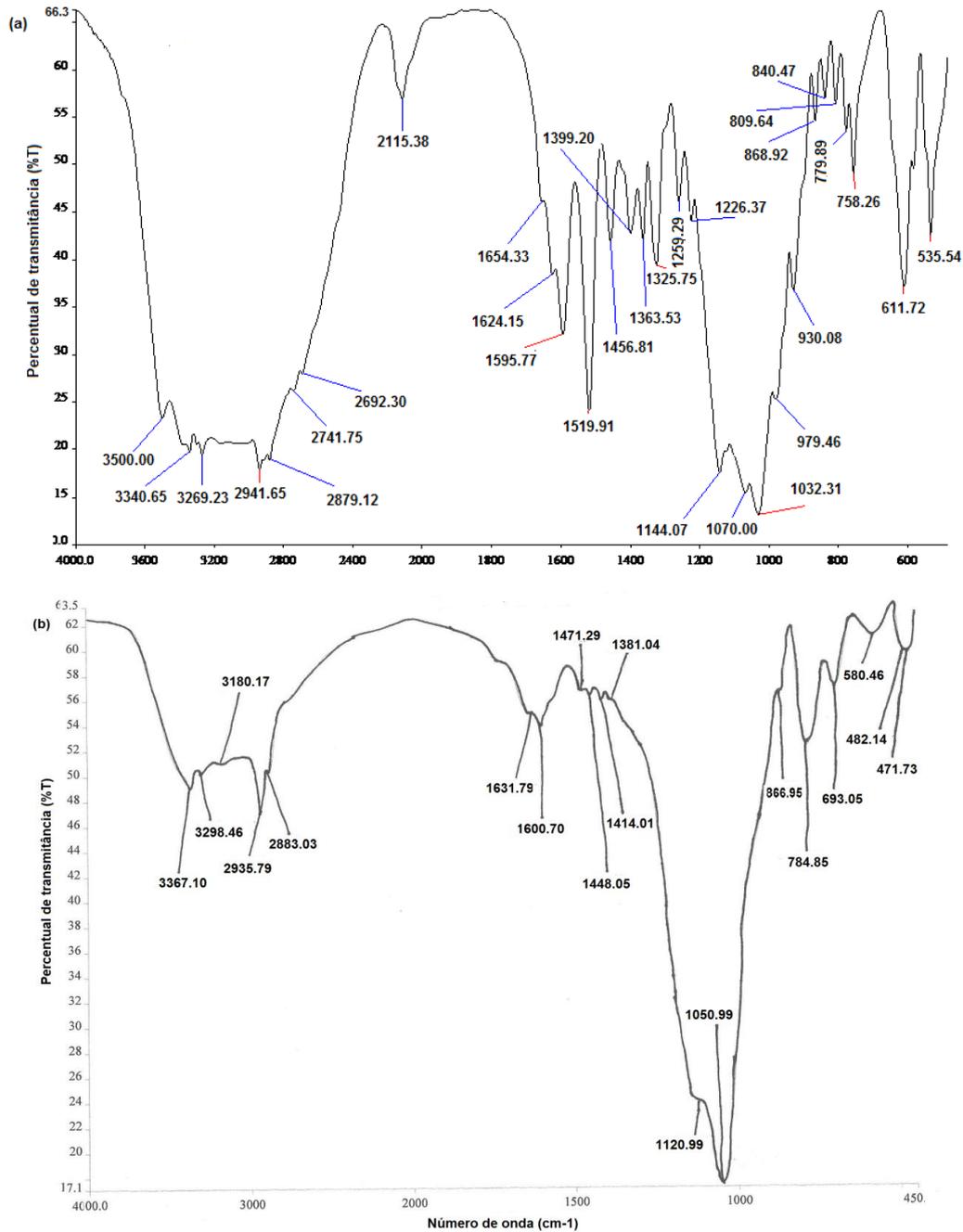


Figura 46 - Espectros de infravermelho da kanamicina (a) e MIP-kanamicina (b).

### **3.3.1.1. Caracterização do CdTe-TGA QDs**

A qualidade da sonda CdTe-TGA QDs foi monitorada através das suas propriedades ópticas (absorção e fluorescência). Na Figura 47a, encontra-se um espectro de absorção bem característico de Quantum Dots, onde é possível observar um amplo espectro de absorção. Esta característica habilita a excitação da sonda fluorescente de 300 a aproximadamente 495 nm. O que torna essa dispersão de nanopartículas vantajosa, pois é possível escolher o melhor comprimento de onda de emissão (fluorescência) de acordo com as condições de análise (principalmente quando trabalha-se com matrizes contendo fluidos biológicos). O espectro de fluorescência (Figura 47b) apresentou um comprimento de onda referente a intensidade máxima em 522 nm. O valor de FWHM calculado foi de 50 nm, o que sugere que os pontos quânticos (partículas) possuem uma boa uniformidade (monodisperso) em relação aos diâmetros das nanopartículas que o compõem.

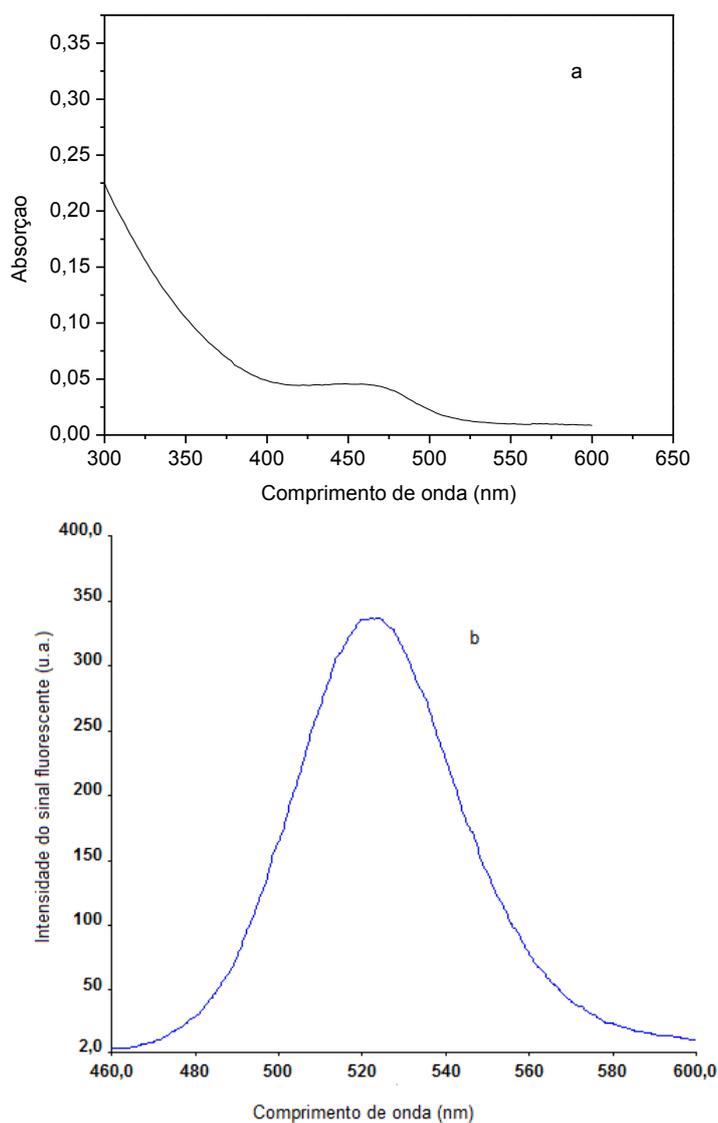


Figura 47 - (a) Espectro de absorção de CdTe-TGA QDs alíquota de 25,0  $\mu\text{L}$  avolumada com água para balão volumétrico de 5,0 mL e (b) espectro de fluorescência de CdTe-TGA QDs.

### 3.3.1.2.

#### Otimização do CdTe-TGA QDs para melhor condição de medição

##### 3.3.1.2.1.

#### Efeito do pH

O pH desempenha um papel fundamental na interação analito-nanopartícula. Com o pH ácido a intensidade diminui pois pH baixo favorece a precipitação das nanopartículas, devido ao deslocamento dos grupos tiol (TGA) da superfície dos QDs (Susha *et al.*, 2006). Neste trabalho, os pontos quânticos

obtidos foram dispersos em meio aquoso tamponado (1,0 mL de tampão fosfato 0,01 mol L<sup>-1</sup>) no intervalo de pH variando de 6,0 a 10,0. O sinal luminescente ( $\lambda_{ex}$  350 /  $\lambda_{em}$  522) foi medido antes e após a adição de 50,0  $\mu$ L de solução de KANA 1x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. A Figura 48a mostra o perfil de luminescência da dispersão dos pontos quânticos sem adição do analito, constatou-se que em pH 8,0 há maior intensidade do sinal analítico (aproximadamente 320 u.a.), o mesmo foi observado na dispersão CdTe-TGA QDs em presença de KANA (Figura 48b), sendo que neste caso a interação KANA-nanopartícula foi responsável por uma aumento de 70 u.a. (aproximadamente) em pH 8,0. Portanto este pH foi escolhido para continuação dos testes.

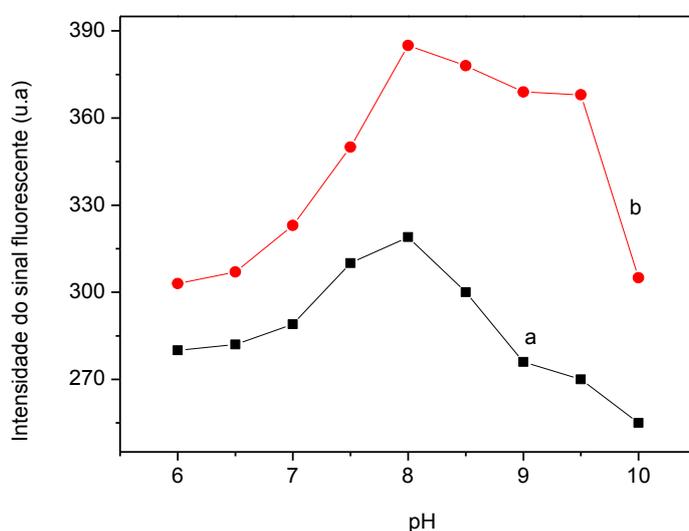


Figura 48 - (a) Intensidade do sinal fluorescente do CdTe-TGA QDs em função do pH na faixa de 6 a 10, (b) Intensidade do sinal fluorescente do CdTe-TGA QDs em presença de KANA em função do pH na faixa de 6 a 10.

### 3.3.1.2.2. Estabilidade da nanopartícula

Em seguida fez-se o monitoramento da variação do sinal fluorescente (sonda analítica) em função do tempo de medição em uma dispersão contendo 25,0  $\mu$ L de CdTe-TGA QDs, 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (pH 8) e 2,0 mL de água ultrapura (condição de trabalho). As medições foram feitas em intervalos de cinco minutos e os resultados (Figura 49) indicam uma boa estabilidade da sonda (a variação máxima do sinal do controle foi de apenas 13

unidades arbitrárias), o que possibilitou a realização de medições imediatas (em aproximadamente 5 minutos).

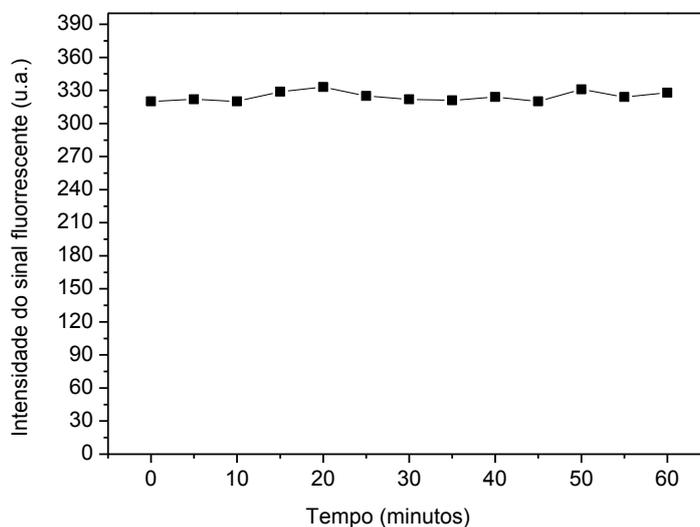


Figura 49 - Estabilidade do CdTe-TGA QDs em função do tempo (min.).

### 3.3.1.2.3.

#### Estudo da variação de QDs em presença de KANA

Um estudo para avaliar a influência da quantidade de QDs capaz de induzir a variação do sinal fluorescente foi realizado através da adição de alíquotas de 5,0 a 50,0  $\mu\text{L}$  de QDs (em cubetas distintas) na presença de uma quantidade fixa de KANA, (30,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  o que equivale a  $3,0 \times 10^{-10} \text{ mol}$ ), 2 mL de água ultrapurificada e 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 8). De acordo com o gráfico da Figura 50 onde o eixo Y corresponde a variação de fluorescência ( $\Delta F$ ) em relação ao sinal fluorescente na presença e na ausência de KANA, observou-se uma variação do sinal fluorescente proporcional ao aumento das alíquotas de QDs até 20,0  $\mu\text{L}$ . A partir da adição de 25,0  $\mu\text{L}$  de dispersão o sistema atingiu a saturação, uma vez que a variação da intensidade do sinal fluorescente com alíquotas maiores de QDs foi muito pequena. Portanto, para continuação do trabalho foram utilizadas alíquotas de 25,0  $\mu\text{L}$  de QDs, como sendo a menor quantidade de QDs em presença de KANA capaz de fornecer um melhor ganho em relação ao sinal analítico.

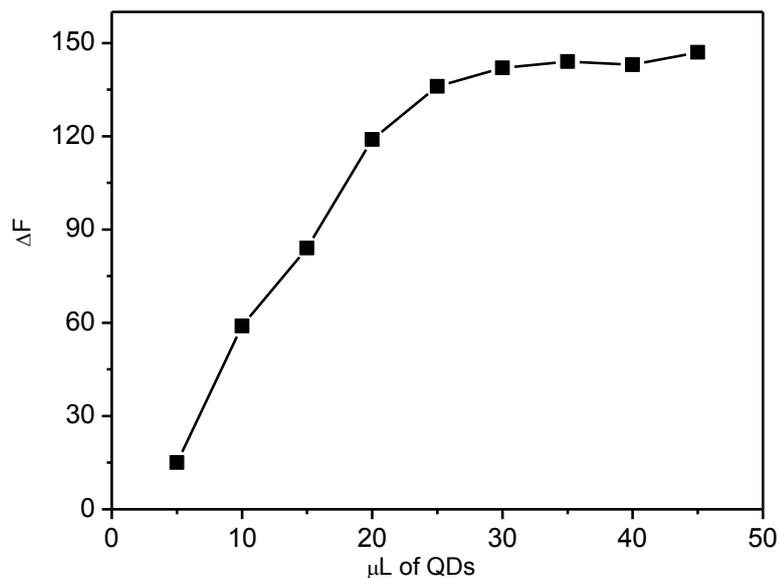


Figura 50 - Variação do sinal fluorescente ( $\Delta F$ ) em função de alíquotas de QDs na presença de KANA ( $3,0 \times 10^{-10}$  mol).

#### 3.3.1.2.4. Estudo dos interferentes

O efeito de diferentes substâncias sobre o sinal de luminescência da dispersão de nanopartícula foi avaliado a fim de monitorar a seletividade da interação entre a KANA e CdTe-TGA QDs. As substâncias testadas foram as mesmas presentes na composição da vacina contra febre amarela (Tabela 16). Como pode ser visto, as substâncias sacarose, glutamato de sódio, sorbitol e eritromicina (nas concentrações especificadas) influenciam muito pouco na intensidade do sinal fluorescente. Portanto não foram consideradas interferentes, uma vez que foi estabelecida uma tolerância de 4% (valor de repetibilidade estimado para a medição do sinal). Já a gelatina é um interferente potencial, pois ela induz um aumento de aproximadamente 200% na intensidade do sinal do controle, logo ela não pode estar presente na dosagem de KANA, portanto o MIP-KANA foi utilizado para separar este interferente em amostras de vacina.

Tabela 16 - Efeito de substâncias presentes na vacina contra febre amarela na intensidade do sinal fluorescente da sonda do CdTe-TGA QDs.

<i>Substâncias</i>	<i>Concentração</i>	<i>Varição na intensidade do sinal fluorescente (%)</i>
Sacarose	$1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	- 2,0
Glutamato de sódio	$1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	- 2,5
Sorbitol	$1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	- 2,4
Gelatina bovina	$1,3 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$	+ 202
Eritromicina	$1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	- 2,3

### 3.3.2.

#### Solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos

Testes de eluição de KANA nos cartuchos MIP e NIP foram feitos com água ultrapurificada, a água foi escolhida como solvente de eluição em detrimento da solubilidade da KANA e também devido a condição de medição (dispersão aquosa de nanopartículas). Os cartuchos MIP e NIP contendo 300,0 mg dos polímeros foram carregados com 100,0  $\mu\text{L}$  ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$ ) de uma solução de KANA. A eluição foi feita através da adição de 2,0 mL de água ultrapurificada (foram recolhidas duas frações de 1,0 mL).

Em seguida, a cada fração foi adicionado 25,0  $\mu\text{L}$  de TGA-CdTe QDs, 1,0 mL de água ultrapurificada e 1,0 mL de tampão fosfato (conforme condição de medição descrito no capítulo 2). Posteriormente as medições foram feitas por espectrofluorimetria. O gráfico da Figura 51 mostra as percentagens de recuperação para eluições. É possível observar que o MIP reteve praticamente toda a KANA (recuperação de apenas 3%). Todavia, o NIP não foi capaz de reter o analito e a recuperação de KANA foi superior a 90%, o que comprova a eficiência da impressão molecular. Portanto água foi utilizada como solvente de condicionamento e de eluição dos cartuchos.

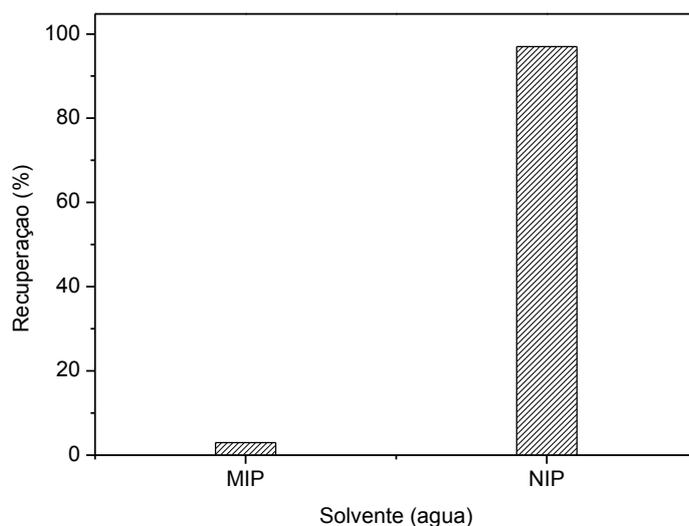


Figura 51 - Eluição de KANA com água ultrapurificada nos cartuchos MIP e NIP.

### 3.3.3. Avaliação de desempenho e seletividade do MIP-KANA

De acordo com testes feitos anteriormente observou-se que somente KANA e gelatina interagem com nanopartícula promovendo mudança na intensidade do sinal fluorescente. Portanto, testes individuais foram feitos para avaliar as recuperações/seletividade de KANA e gelatina após eluição nos cartuchos. Nas colunas MIP e NIP foram adicionadas alíquotas de 10,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{L}$  de solução estoque  $1,0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$  de KANA e 10,0 50,0 e 100,0  $\mu\text{L}$  de solução  $2,0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$  de gelatina. As eluições feitas com água ultrapurificada foram recolhidas em 6 frações de 1,0 mL. As frações foram reconstituídas nas condições de análise e as medições foram feitas por espectrofluorimetria. Na Figura 52 observa-se que no NIP (alíquota de 50,0  $\mu\text{L}$ ) a KANA foi eluída completamente após adição de 2,0 mL de água (fração 2), praticamente 100% de KANA foi recuperada. Já no MIP (alíquota de 50,0  $\mu\text{L}$ ) a retenção do analito foi satisfatório, uma vez que na fração 6 foram recuperados aproximadamente 91,4 % de KANA, contudo nas frações de 1 a 5 observou-se uma pequena perda de KANA o que totalizou aproximadamente 10% de recuperação.

Na Figura 53 encontram-se os resultados para eluição da gelatina (alíquota de 50,0  $\mu\text{L}$ ) tanto no MIP quanto no NIP, este analito foi recuperado acima de 90% já na primeira fração. O que mostra que MIP e NIP não são seletivos para gelatina. Este resultado habilitou a utilização do MIP como sorvente para

separação seletiva e recuperação da KANA. É importante ressaltar que o MIP com impressão molecular da KANA é inédito na literatura. As recuperações com as alíquotas de 10,0 e 100,0  $\mu\text{L}$  de KANA e gelatina foram bem semelhantes tanto no MIP quanto no NIP, o que demonstrou que mesmo com alíquotas maiores não houve saturação nos sítios dos cartuchos MIP.

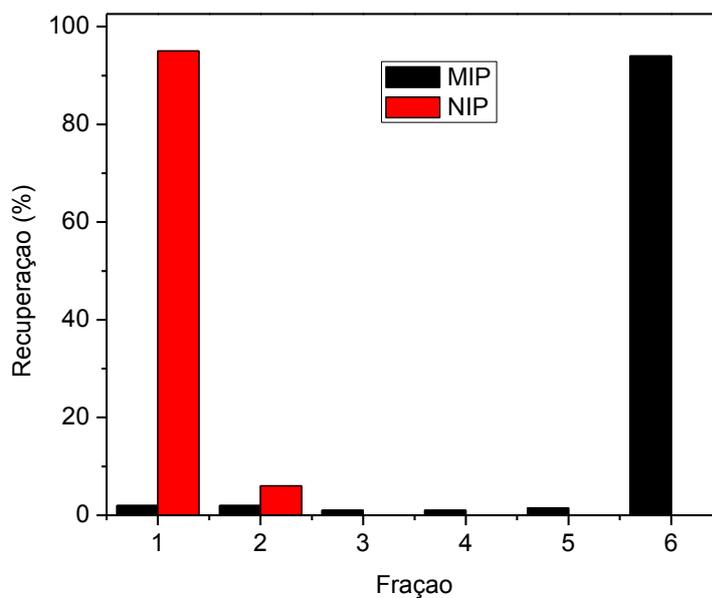


Figura 52 - Seletividade do MIP-KANA e NIP para a KANA.

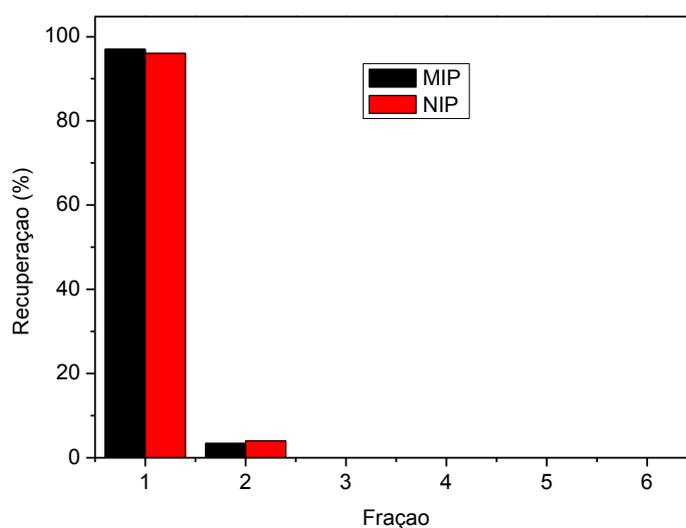


Figura 53 - Eluição de gelatina no MIP-KANA e no NIP.

Dando continuidade aos testes, foi preparada uma mistura contendo KANA e gelatina nas respectivas concentrações  $1,0 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$  e  $2,0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ . Alíquotas de  $50,0 \mu\text{L}$  dessa solução foram adicionados aos cartuchos MIP e NIP. As eluições foram feitas com até  $6,0 \text{ mL}$  de água ultrapurificada e as frações recolhidas foram reconstituídas nas condições de análises. Na Figura 54 observa-se que no gráfico do MIP após percolação  $2,0 \text{ mL}$  de água obteve-se uma recuperação de 100% para a gelatina. Já a KANA foi recuperada em grande parte somente na fração 6 (recuperação acima de 90%). Logo, o MIP mostrou uma boa seletividade frente a separação dos dois analitos. Mais uma vez os resultados com NIP (Figura 55) não apresentaram seletividade e a recuperação dos dois analitos foi de praticamente 100 % após percolação de  $2,0 \text{ mL}$  de água.

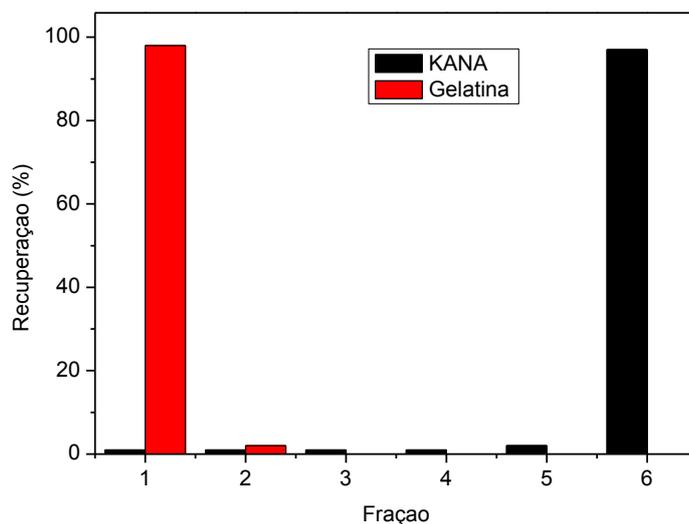


Figura 54 – Percentagens de recuperações (solução contendo KANA e gelatina) obtidas com os cartuchos MIP para KANA e gelatina após percolação de  $6,0 \text{ mL}$  de água ultrapurificada.

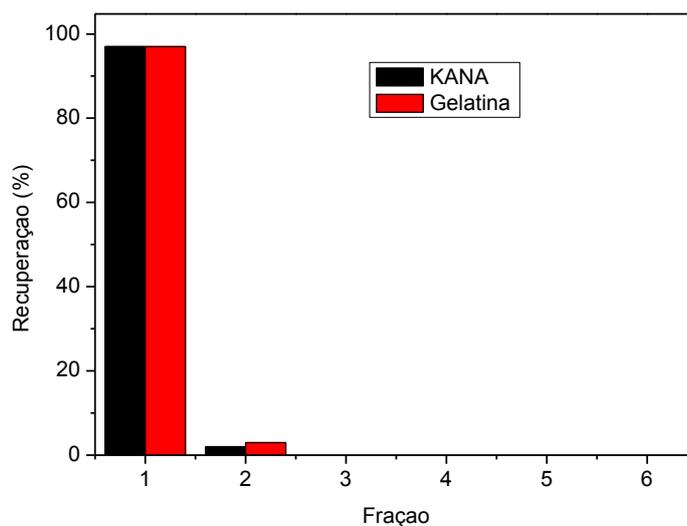


Figura 55 - Percentagens de recuperações obtidas com os cartuchos de NIP para KANA e gelatina por espectrofluorimetria após percolação de 6,0 mL de água.

### 3.3.4. Aplicação do MIP-KANA como SPE em amostras de vacina e urina

A amostra de vacina contra febre amarela foi reconstituída em 5,0 mL (10 doses) com água estéril para injetáveis, desta amostra foram retiradas alíquotas de 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu$ L, estas foram avolumadas para 3,0 mL com água e em seguida foram adicionados aos cartuchos MIP 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu$ L respectivamente (a diluição foi necessária devido a elevada quantidade de gelatina na vacina). As eluições foram feitas com 6,0 mL de água ultrapurificada (de acordo com estudos anteriores) e as medições foram realizadas em espectrofluorímetro. Na Figura 56a encontra-se o espectro de fluorescência para uma alíquota de 50,0  $\mu$ L de amostra de vacina (sem tratamento), devido a grande quantidade de gelatina observa-se que o sinal estourou. Na figura 56 (b e c), são representados o espectro do controle (aproximadamente 276 u.a.) e o espectro referente à sexta alíquota recolhida corresponde a recuperação de 92,8% de KANA. Todas as frações foram monitoradas e constatou-se que, na terceira fração não havia mais gelatina, pois o sinal fluorescente desta fração foi muito próximo ao sinal do controle (considerando uma perda de aproximadamente 2% de KANA que ocorre em todas as frações). Os resultados de recuperação das eluições das alíquotas de 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu$ L (triplicata) de vacina encontram-se na Tabela

17 (como mostrado mais adiante). Logo, conclui-se que o MIP foi seletivo e eficiente para a separação e recuperação KANA em amostras de vacina.

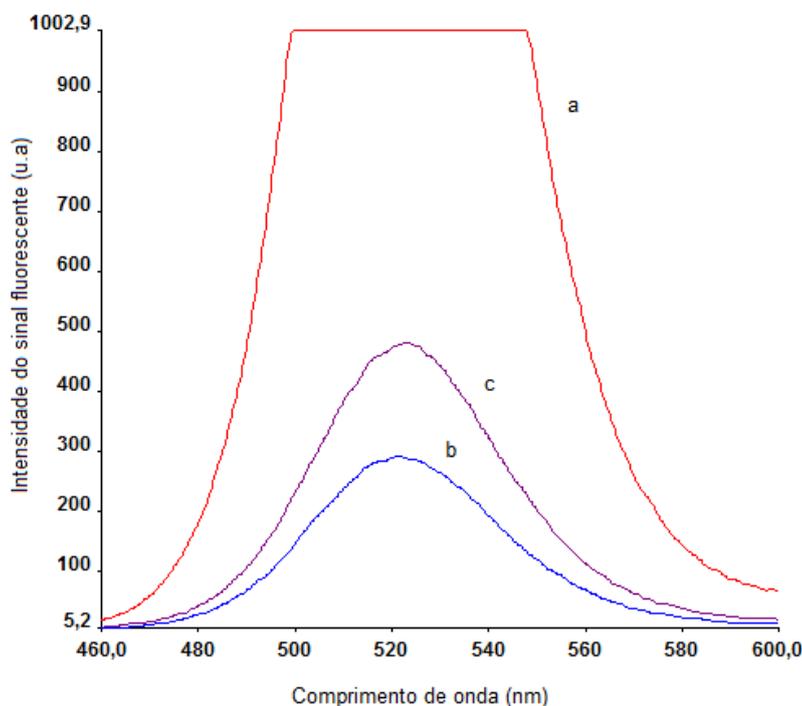


Figura 56 - Espectros: (a) Amostra de 50,0 µL de vacina sem tratamento, (b) controle referente ao sinal fluorescente da sonda (CdTe-TGA QDs), (c) fração 6 da amostra de 50,0 µL de vacina após eluição no MIP (livre de gelatina).

Nos testes com urina primeiramente verificou-se a intensidade do sinal fluorescente nos comprimentos de onda escolhidos para análise da KANA (350/522 nm) da matriz de urina (50,0 µL de avolumados para 3,0 mL). Observou-se um intenso sinal fluorescente (Figura 57a). Portanto o MIP foi utilizado para limpar a matriz de urina e dosar a KANA. Amostras de 100,0 µL de urina foram fortificadas com 10,0; 50,0 e 100,0 µL de uma solução estoque de KANA  $1,0 \times 10^{-5}$  g mL<sup>-1</sup> e adicionadas aos cartuchos MIP. A remoção dos interferentes presentes na matriz foi feita através da adição de 2,0 mL de água a cada cartucho MIP. Verificou-se que não houve perda considerável de analito. Em seguida adicionou-se mais 4,0 mL de água aos cartuchos, frações de 1,0 mL foram recolhidas (e levadas a condição de trabalho) e as medições foram feitas conforme o procedimento de análise. Para a alíquota de 50,0 µL de KANA (na amostra de urina) verificou-se que 92% de KANA foi recuperada na fração 6, e a partir da terceira fração observou-se que não haviam mais interferentes na matriz de urina. Na Figura 57 (b e C) observa-se o sinal do controle (sonda fluorescente) e o sinal

referente à sexta fração (eluída) da amostra de urina. Este resultado foi considerado satisfatório, pois foi possível recuperar grande parte de KANA livre dos interferentes presentes na matriz de urina. Os valores de recuperação para as amostras de urina fortificadas com 10,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{L}$  de KANA foram iguais e encontram-se na Tabela 17.

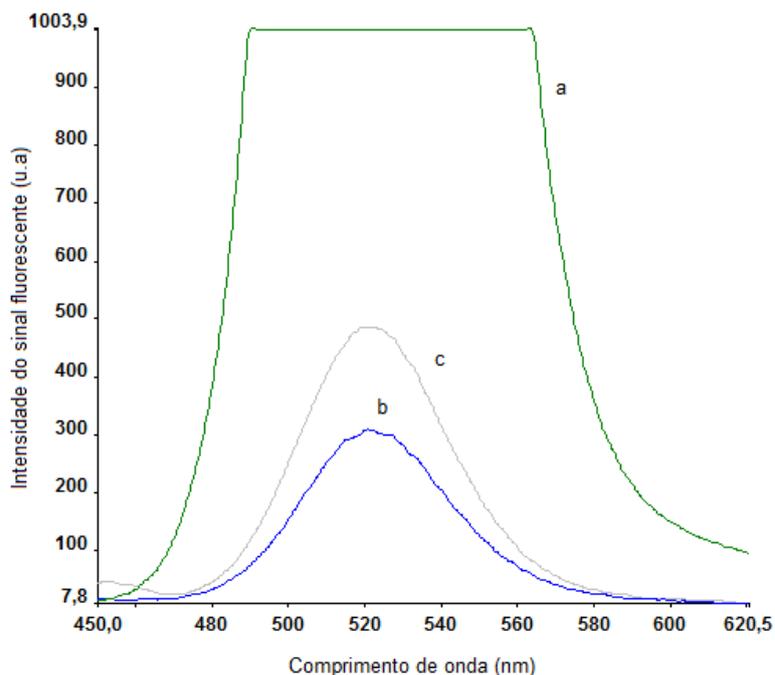


Figura 57- Espectros: (a) Amostra de 50  $\mu\text{L}$  urina sem tratamento (b) controle referente ao sinal fluorescente da sonda (CdTe-TGA QDs), e (c) fração 6 da amostra de urina fortificada com 50  $\mu\text{L}$  de KANA ( $166,7 \text{ ng mL}^{-1}$ ) após eluição no MIP (livre de interferentes).

Tabela 17 - Valores de recuperação de KANA na vacina e urina usando MIP.

Vacina (n=3)		Urina (n=3)	
50 $\mu\text{L}$ ( $166,7 \text{ ng mL}^{-1}$ )	$92,8 \pm 2,3 \%$	10 $\mu\text{L}$ ( $33,3 \text{ ng mL}^{-1}$ )	$92,4 \pm 1,5\%$
100 $\mu\text{L}$ ( $333,7 \text{ ng mL}^{-1}$ )	$94,3 \pm 1,4 \%$	50 $\mu\text{L}$ ( $166,7 \text{ ng mL}^{-1}$ )	$92,0 \pm 1,1\%$
200 $\mu\text{L}$ ( $666,7 \text{ ng mL}^{-1}$ )	$94,5 \pm 1,4 \%$	100 $\mu\text{L}$ ( $333,7 \text{ ng mL}^{-1}$ )	$91,6 \pm 1,3\%$

### 3.3.5. Parâmetros da validação do método analítico

A seguir serão apresentados os parâmetros de validação: linearidade da resposta analítica, limite de detecção, limite de quantificação e precisão para o MIP-KANA.

#### 3.3.5.1. Linearidade da resposta analítica

A avaliação da linearidade para KANA foi realizada por meio de ensaios com soluções padrão. Construiu-se três curvas analíticas, sendo cada ponto da curva o resultado médio de três medições com respectivos desvios. As faixas lineares obtidas cobriram as concentrações de analito de 19,3 a 1370,3 ng mL<sup>-1</sup> ( $1,9 \times 10^{-9}$  a  $1,3 \times 10^{-6}$  g mL<sup>-1</sup>). A Figura 58 apresenta a curva analítica construída para a KANA por espectrofluorimetria. Na Figura 59 encontram-se os espectros de fluorescência referentes à curva analítica em presença de concentrações crescentes de KANA (linhas *b* a *m*). A linha *a* representa o controle da curva. Os coeficientes angular e linear e o coeficiente de correlação encontram-se na Tabela 18 e 19. São mostrados os parâmetros (média das três curvas) para a curva analítica da gelatina.

No eixo da concentração de KANA foi colocado o Log natural do valor de cada concentração. Assim foi possível linearizar a curva. Como é uma reta a equação obtida será sempre  $y = a + bx$  (o que se torna mais prático para o cálculo da concentração de uma amostra desconhecida). A diferença é que o valor encontrado pela extrapolação da reta não será diretamente o da concentração de Kana (como sempre acontece com as curvas analíticas). O

valor encontrado pela reta será o de Ln da concentração ( $\ln X$ ).

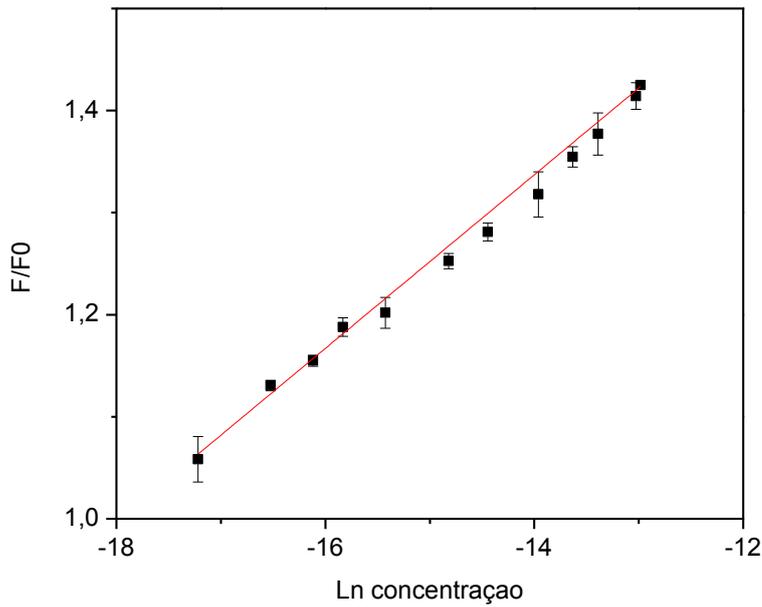


Figura 58 - Curva analítica obtida com concentrações crescentes do padrão de KANA de 19,3 a 1370,3  $\text{ng mL}^{-1}$ ) obtida por espectrofluorimetria.

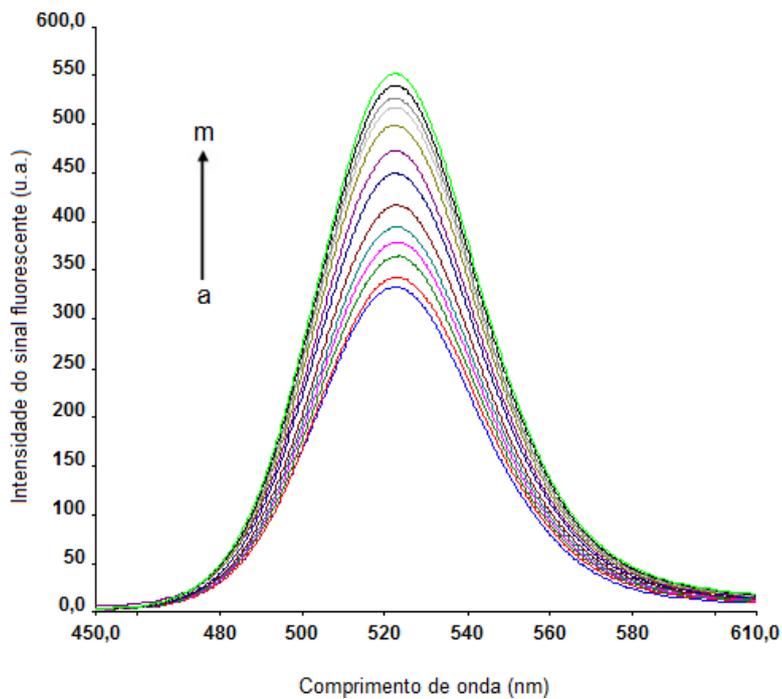


Figura 59 - Espectros de fluorescência da curva analítica CdTe-TGA QDs na presença de alíquotas crescentes de KANA (nas concentrações de 19,3 a 1370,3  $\text{ng mL}^{-1}$  linhas *b-m*), linha *a* representa o controle.

Tabela 18 - Parâmetros das curvas analítica de padrão de KANA obtidas por espectrofluorimetria.

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	0,15 Ln	0,07 Ln	0,08 Ln	0,08 Ln
Interseção	3,62	2,42	2,48	2,48
R <sup>2</sup>	0,993	0,986	0,996	0,994

Tabela 19 - Parâmetros da curva analítica do padrão da gelatina obtidas por espectrofluorimetria.

<i>Analito</i>	<i>Faixa</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Equação da reta</i>
Gelatina	330 a 15510 (ng mL <sup>-1</sup> ) ou 3,3 x 10 <sup>-7</sup> a 1,5 x 10 <sup>-5</sup> g mL <sup>-1</sup>	0,999	Y=1x10 <sup>+8</sup> x + 0,3834

O método dos mínimos quadrados parte do pressuposto que os resíduos seguem uma distribuição normal tem variância constante ao longo do eixo x e são independentes, ou seja, não há autocorrelação dos resíduos. Para verificar o ajuste ao modelo linear utilizou-se o teste F. O bom ajuste ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória no gráfico dos resíduos em torno da média (zero) apresentada na Figura 60 para determinações por espectrofluorimetria. O ajuste ao modelo linear e a significância da regressão foi verificado através da ANOVA. A análise demonstrou regressões significativas ( $p < 0,001$ ) e o ajuste ao modelo linear ( $p > 0,05$ ) para as duas técnicas utilizadas.

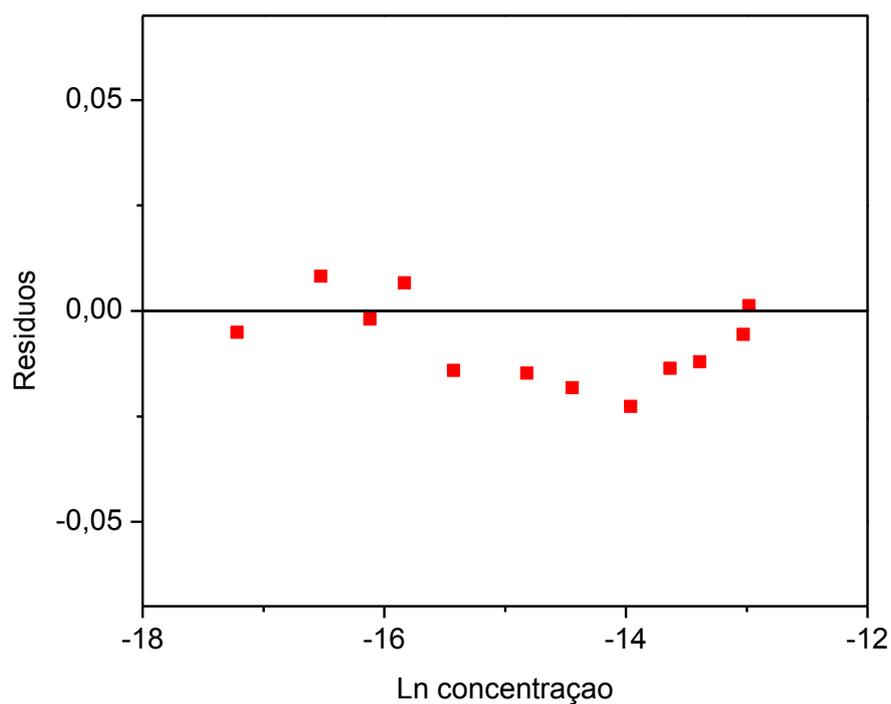


Figura 60 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a KANA.

### 3.3.5.2. Limite de detecção e quantificação

Os cálculos para obtenção de LDQ e LQO foram realizados conforme Equação 7, 8, 9 e 10, descritas no capítulo 2. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 - LOD e LOQ para a determinação da KANA por espectrofluorimetria.

LOD	9,0 ng mL <sup>-1</sup>
LOQ	17,0 ng mL <sup>-1</sup>

### 3.3.5.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos da repetitividade. A repetitividade foi calculada pelo desvio padrão relativo (% RSD) indicado na Equação 11, conforme descrito na página 95. Foi avaliada uma concentração dentro da faixa de trabalho ( $3,0 \times 10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$ ).

Os resultados obtidos por meio de 12 experimentos consecutivos produziram um % RSD de 7,3 para as determinações espectrofluorimétricas.

## 3.4. MIP-Piraclostrobina

### 3.4.1. Caracterização do MIP-PIRA

A partir da fração de material recolhido na peneira de  $106 \mu\text{m}$  (MIP-PIRA após remoção do analito) foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Observa-se uma certa porosidade no material, provavelmente devido aos sítios de impressão (Figura 61b). Foi constatado também irregularidades na morfologia e no tamanho das partículas uma vez que o maceramento do polímero foi manual (figura 61a).

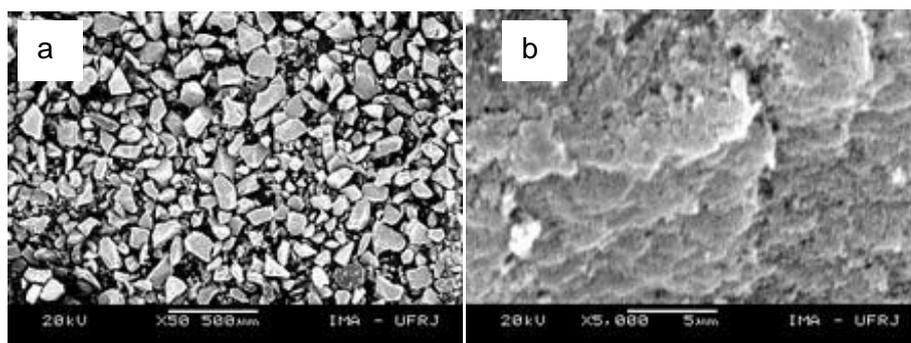


Figura 61 - Micrografias eletrônicas de varredura do MIP-PIRA (a) com aumento de 500 vezes e (b) com aumento de 5.000 vezes.

Na Figura 62a está representado o espectro de infravermelho da PIRA, este se caracteriza pela presença de halogênio (cloro) com banda de estiramento intensa aproximadamente em  $740 \text{ cm}^{-1}$ . É possível também atribuir a banda em

770  $\text{cm}^{-1}$  a deformação fora do plano de C-H de anel aromático *orto*-dissubstituído. Já a banda intensa em 819  $\text{cm}^{-1}$  provavelmente evidencia a presença de anel aromático *para*-dissubstituído (deformação fora do plano). A banda em 1239  $\text{cm}^{-1}$  pode ser identificada com estiramento C-N, de acordo com a estrutura da PIRA. Em 1717  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda de estiramento intensa referente a C=O. No espectro de infravermelho do MIP (polímero limpo) mostrado na Figura 62b não são observados os sinais característicos de PIRA em torno de 770 a 740  $\text{cm}^{-1}$ , isso pode demonstrar a eficiência da remoção do analito das cavidades do MIP. Já a banda intensa em 1161  $\text{cm}^{-1}$  pode ser identificada como estiramento assimétrico C-O-C proveniente do EGDMA uma vez que ele é responsável por grande parte da formação do bulk polímero. E finalmente em 1731  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda intensa referente a estiramento C=O tanto do EGDMA quanto do ácido meta acrílico (precursores). O espectro de infravermelho do NIP foi muito semelhante ao do MIP.

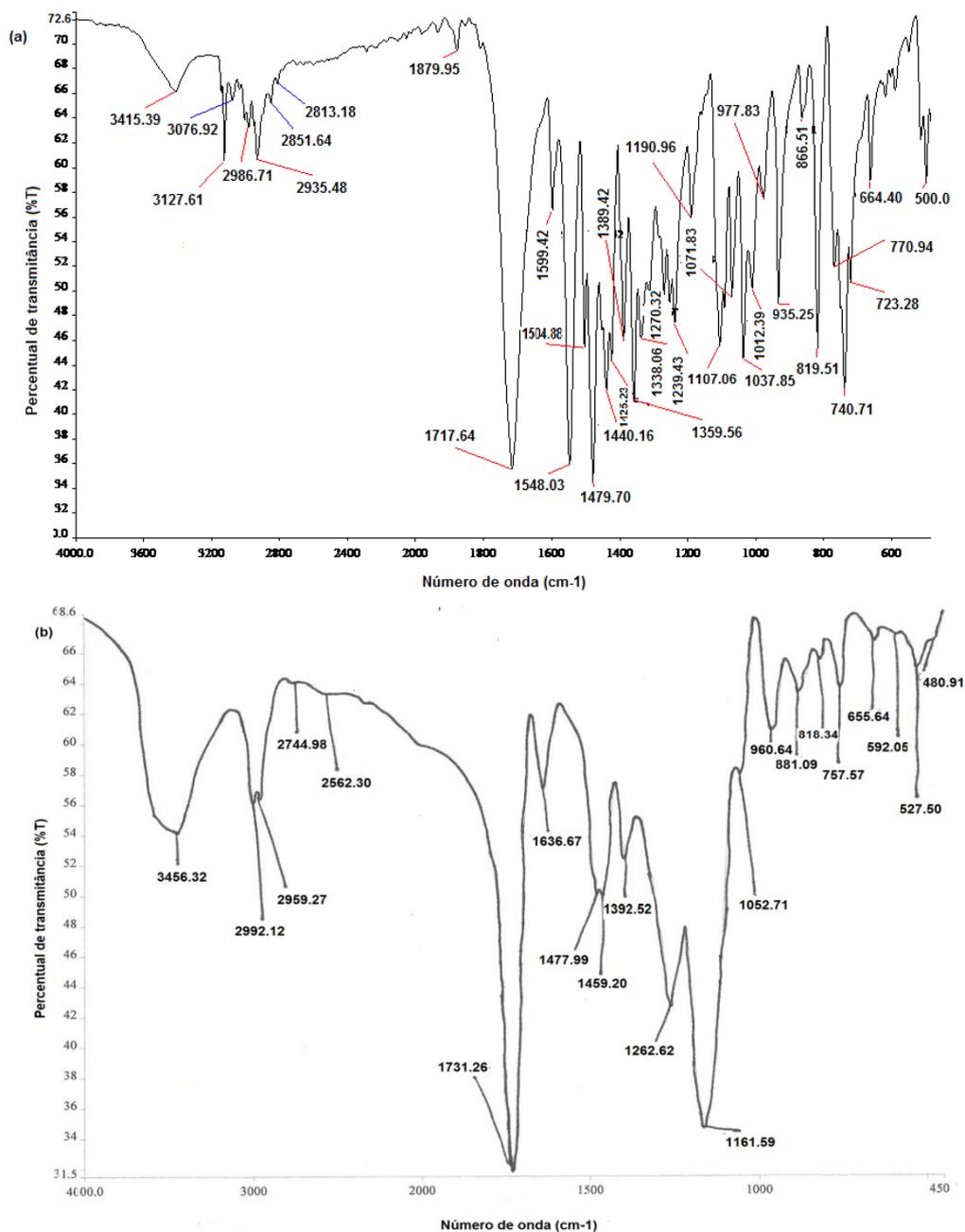


Figura 62 - Espectros de infravermelho para PIRA (a) e MIP-PIRA (b).

### 3.4.2.

#### Efeito da proporção do solvente no sinal fluorescente da piraclostrobina

A solubilidade da PIRA foi testada nos solventes orgânicos metanol e acetonitrila, já que a solubilidade em água deste analito é praticamente nula. Os testes realizados mostraram boa solubilidade tanto em metanol quanto em acetonitrila, portanto a solução estoque de piraclostrobina foi feita em metanol.

Para a condição de medição em espectrofluorímetro um teste univariado foi realizado a fim de verificar a menor proporção do solvente orgânico (em água) no meio, de forma que o sinal fluorescente permanecesse intenso. Proporções de 10, 20, 40, 60, 80 e 100% (v/v) de metanol foram testadas.

As soluções de trabalho foram preparadas com adição de 15,0  $\mu\text{L}$  de solução estoque  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de PIRA e avolumadas em balão volumétrico de 5,0 mL (concentração final PIRA  $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ). Foram obtidos resultados de intensidade fluorescente variando de 300 u.a (para medição com 100% de metanol) a 180 u.a. (para proporção metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  10% v/v). Contudo foi escolhido para as medidas fluorescentes a proporção metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  20% (v/v) cuja intensidade do sinal fluorescente permaneceu em torno de 250 u.a, logo foi possível utilizar pouca quantidade de solvente orgânico no meio. A Figura 63 mostra os espectros de excitação e emissão da PIRA na condição otimizada.

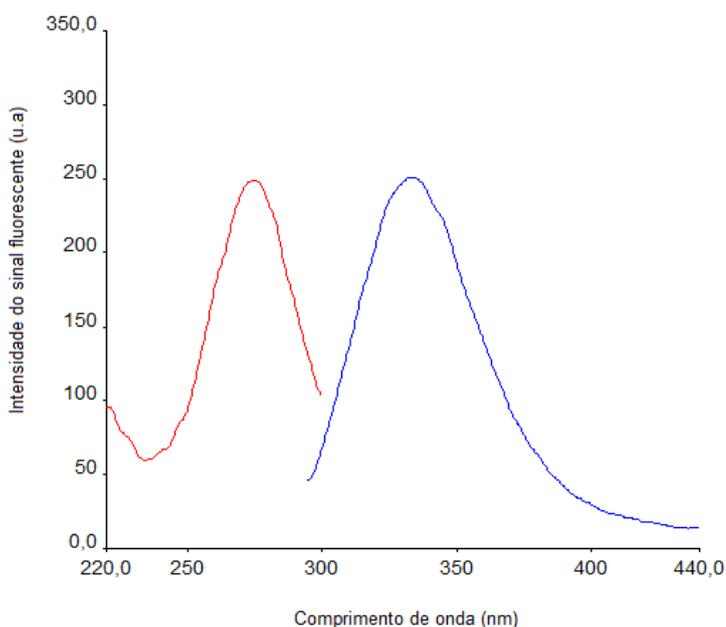


Figura 63 - Espectros de excitação e emissão de PIRA na concentração de  $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , (metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  20:80 %v/v).

### 3.4.3. Otimização do método de extração de PIRA

#### 3.4.3.1. Escolha do solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos

Testes univariados referentes a eluição de PIRA no MIP foram realizados com diferentes solventes, o que possibilitou maior retenção do analito foi escolhido como solvente de condicionamento dos cartuchos. Os solventes testados (com variação de polaridade) foram MeOH, ACN e DCM. Os cartuchos contendo 300,0 mg de MIP foram carregados com 10,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de PIRA (em metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  20/80% v/v). Em seguida foram recolhidas duas frações de 1,0 mL de cada solvente percolado pelas colunas. As frações dos solventes metanol e acetonitrila foram avolumadas para 5,0 mL com água. As frações recolhidas com diclorometano foram evaporadas até secura sob fluxo de nitrogênio e em seguida foram avolumadas de acordo com a condição de medição (5,0 mL de uma mistura metanol: $\text{H}_2\text{O}$  20:80% v/v). Posteriormente fizeram-se as medições de todas as frações por espectrofluorimetria. Verificou-se que a fração do metanol forneceu o maior sinal analítico (primeira fração recolhida), o que mostra que este solvente é mais polar e retira complementemente o analito do cartucho. Um resultado semelhante foi observado para a eluição com acetonitrila, recuperação no solvente de aproximadamente 90%. Já as eluições feitas com diclorometano foram mais promissoras, uma vez que os resultados indicaram uma perda muito pequena de PIRA após a percolação de 2,0 mL de diclorometano pelo cartucho. Na Figura 64, observa-se uma remoção de analito inferior a 10%. Provavelmente devido a baixa polaridade do DCM as moléculas de PIRA permanecem retidas por mais tempo nos sítios do polímero. Portanto o DCM foi escolhido como solvente de condicionamento e eluição dos cartuchos. Testes similares foram feitos no NIP e estes mostram (Figura 65) que as cavidades do MIP também interferem na adsorção do analito uma vez que no NIP com apenas 1,0 mL DCM recolhido observou-se que praticamente toda a PIRA (quase 100%) foi removida.

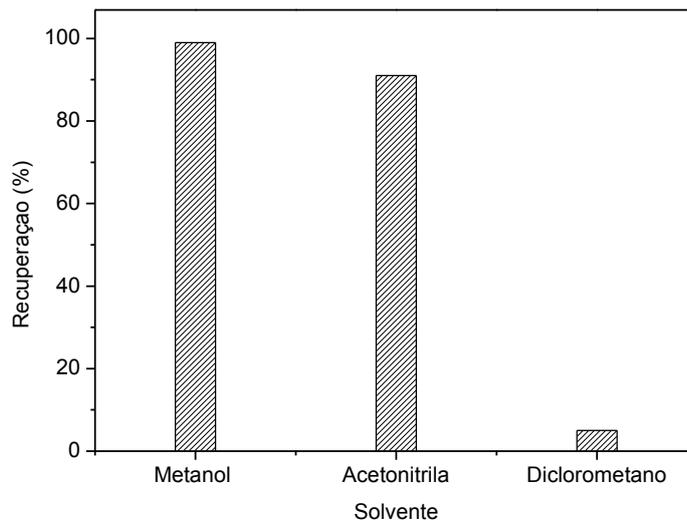


Figura 64 - Solvente de eluição para o MIP-PIRA.

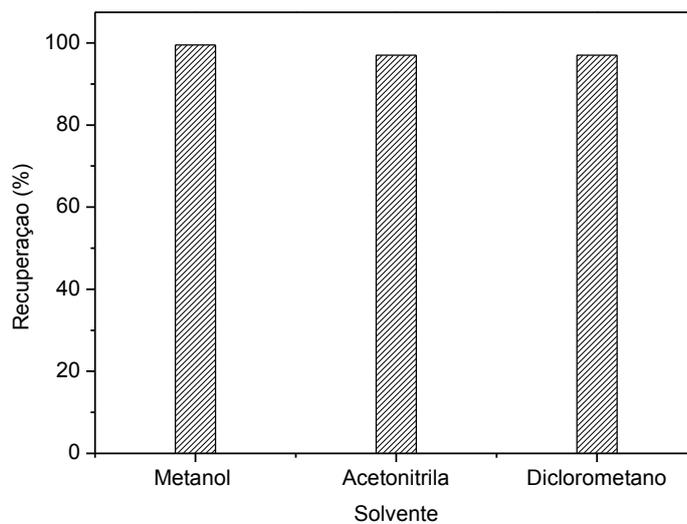


Figura 65 - Eluição de PIRA no NIP com diferentes solventes.

#### 3.4.4.

#### Medição e aplicação do método em amostras de água de rio e urina humana

Nesta etapa são descritos os resultados obtidos no desenvolvimento, e aplicabilidade do método analítico, além dos resultados das análises de amostras

de água de rio e urina humana utilizando MIP como sorvente para determinação seletiva da PIRA.

#### **3.4.4.1.**

##### **Avaliação de desempenho e avaliação do MIP-PIRA**

De acordo com testes feitos com os pesticidas PICO, DIMO, FLU, AZO, PIRA, TRI e KRESO, somente a AZO emite sinal fluorescente no mesmo comprimento de onda da PIRA (analito de interesse). Desta forma foi testada a seletividade do MIP-PIRA frente AZO e PIRA e as medições foram monitoradas por espectrofluorimetria. Como todos os pesticidas absorvem no UV-vis, paralelamente foram feitos testes em HPLC com detecção por arranjo de diodos, a fim de verificar a eficiência do MIP na separação dos demais pesticidas.

Primeiramente, para avaliar a quantidade de analito recuperado após eluição (por espectrofluorimetria) foram adicionados aos cartuchos MIP e NIP alíquotas de 20,0 µL de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PIRA e alíquotas de 25,0 µL de uma solução  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de AZO. As eluições foram feitas com DCM e foram recolhidas 9 frações de 1,0 mL. Posteriormente o DCM foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e as frações foram reconstituídas nas condições de análises.

O MIP apresentou maior afinidade para a PIRA em relação a AZO (Figura 66), o que comprova a eficiência MIP PIRA durante o processo de extração. A PIRA foi eluída completamente após adição de 9,0 mL de DCM (recuperação de 92 %) enquanto que a AZO foi eluída completamente após a eluição de 2,0 mL de DCM (recuperação de 100 %). O mesmo teste foi feito para o NIP, e ambos PIRA e AZO foram extraídas do polímero com até 2,0 mL de DCM (Figura 67). Comprovando assim a eficiência do MIP PIRA. É importante ressaltar que o MIP com impressão molecular da PIRA é inédito na literatura.

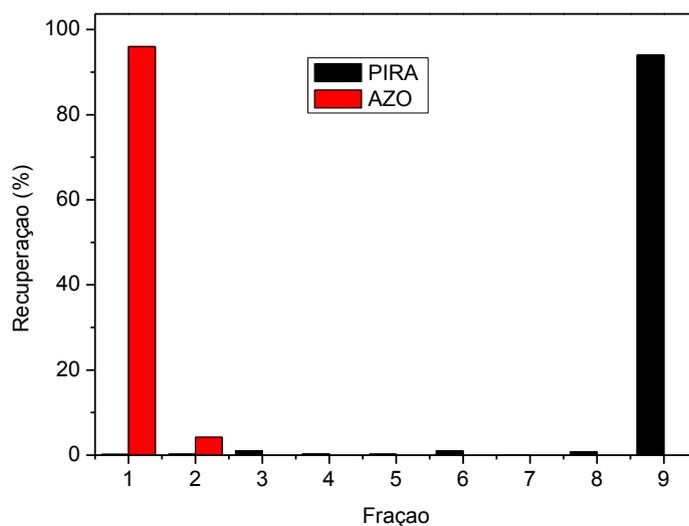


Figura 66 - Seletividade do MIP-PIRA para os analitos piraclostrobina e azoxistrobina.

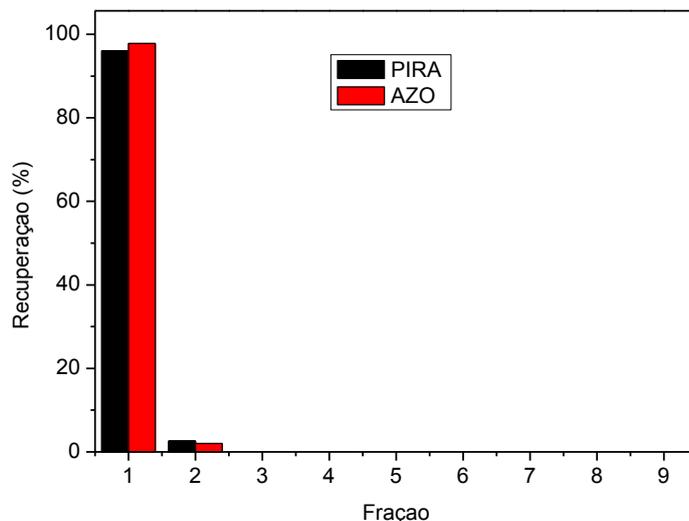


Figura 67 - Eluição de PIRA e AZO no NIP.

A fim de comparar com os resultados obtidos na determinação fluorescente foram feitas análises em cromatografia líquida com detecção por fluorimetria. Os cartuchos foram carregados com 30,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque  $2,0 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$  de PIRA e 10,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  de AZO. Os resultados são mostrados na Figura 68. Observou-se o mesmo perfil de reconhecimento para a PIRA e AZO, o que habilitou a utilização da determinação

espectrofluorimétrica em matrizes de urina e água de rio enriquecidas com PIRA sem a necessidade de utilização de HPLC.

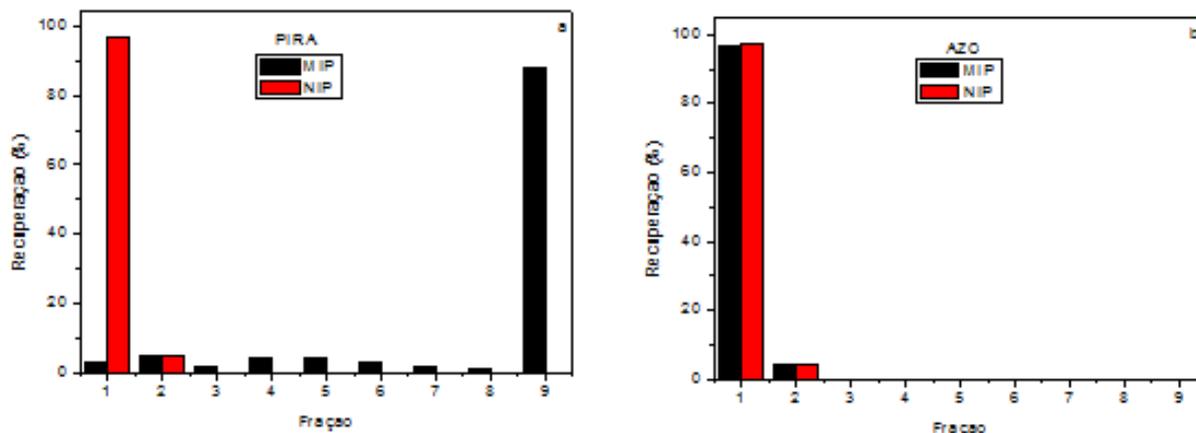


Figura 68 - Percentagens de recuperações obtidas com os cartuchos MIP e NIP para PIRA (a) e AZO (b) usando cromatografia líquida com detecção por fluorimetria após percolação de 9 mL de DCM.

Para os testes individuais (com todos os pesticidas) os cartuchos MIP e NIP foram carregados com 10,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de PIRA, 30,0  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de AZO, KRESO, TRI, FLU, PICO e DIMO. Da mesma forma como mencionado anteriormente foram recolhidas 9 alíquotas após eluição com DCM. As medições foram feitas em HPLC-DAD (220 nm). Os resultados são mostrados na Figura 69. Foi possível observar que para os seis pesticidas (AZO, DIMO, PICO, FLU, TRI e KRESO) ocorreu recuperação acima de 85% tanto no MIP quanto no NIP com a eluição feita pela adição de apenas 1,0 mL de DCM. Isto evidencia que nesses polímeros a retenção desses analitos é extremamente baixa. Em contrapartida para a PIRA observa-se que existe uma diferença marcante em termos de reconhecimento. O NIP praticamente não retém a PIRA (mais de 85% de analito recuperado com eluição de apenas 1,0 mL de DCM), já no MIP o reconhecimento de PIRA foi satisfatória, pois somente na última eluição (9,0 mL de DCM) foi recuperado maior quantidade de PIRA (aproximadamente 92% do analito). Foi constatado que no decorrer das eluições ocorre uma pequena perda de PIRA, contudo esta não é relevante, considerando-se que utilizando o MIP é possível separar com facilidade a PIRA dos demais pesticidas. Logo o MIP-PIRA foi considerado adequado para separação e recuperação de PIRA.

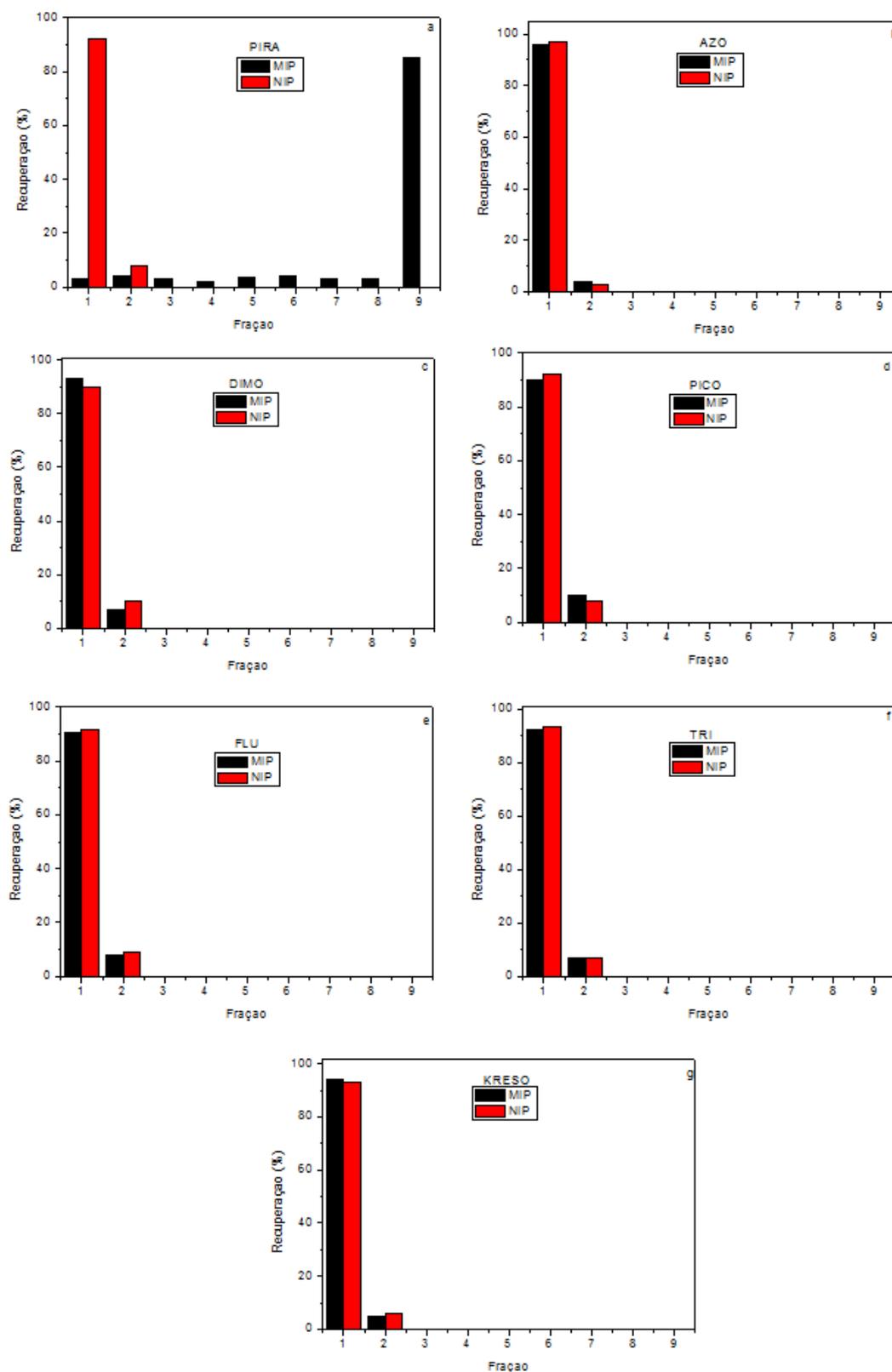


Figura 69 - Percentagens de recuperações obtidas com os cartuchos de MIP e NIP para os sete pesticidas usando HPLC com detecção-DAD após percolação de 9,0 mL de DCM: a) PIRA b) AZO c) DIMO d) PICO e) FLU f) TRI g) KRESO.

Uma mistura contendo os sete pesticidas ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi passada pela coluna MIP e em seguida injetada no HPLC ( $15,0 \mu\text{L}$ ) e a detecção foi feita por fluorimetria e absorção DAD. A 274 nm somente PIRA e AZO podem ser detectadas por fluorimetria. Na figura 70a observa-se que o tempo de retenção para AZO (1) é de 6,5 min (analito mais polar) e de 12,6 min para PIRA (2) (analito menos polar que a AZO). Na 70b é mostrado o cromatograma dos sete pesticidas detectados por UV-vis DAD, observa-se que AZO (1) e PIRA (6) apresentam os mesmos tempos de retenção mencionados anteriormente. Para FLU (2), DIMO (3), KRESO (4) PICO (5) os tempos de retenção variaram de 7,5 a 9,7 min, já para TRI (7) o tempo de retenção foi de 13 min. Como não é possível observar todos os pesticidas no HPLC com detecção por fluorimetria a partir deste ponto todas as análises em HPLC foram feitas por detecção UV-vis DAD.

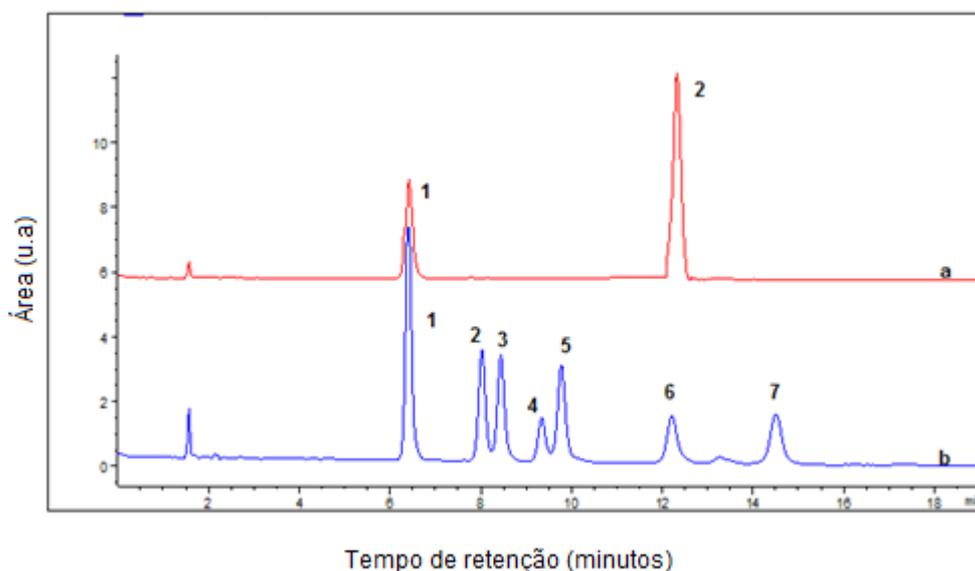


Figura 70 - Cromatogramas dos pesticidas (a) com detecção por fluorimetria (1) AZO e (2) PIRA e (b) com detecção DAD (1) AZO; (2) FLU; (3) DIMO; (4) KRESO; (5) PICO, (6) PIRA e (7) TRI.

Para avaliar a separação de PIRA e AZO, foi adicionado ao cartucho MIP uma mistura de  $15,0 \mu\text{L}$  destes dois pesticidas ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), fez-se as eluições com  $9,0 \text{ mL}$  de DCM, após evaporação do solvente o eluato foi avolumado para  $5,0 \text{ mL}$  (metanol: $\text{H}_2\text{O}$  20% v/v) e foram injetados  $20,0 \mu\text{L}$  no HPLC. Na Figura 71a observa-se o cromatograma dos padrões (passados pela coluna MIP) e na 71b o cromatograma dos primeiros dois mL eluídos do cartucho MIP (após reconstituição). Neste praticamente toda AZO foi recuperada (96%) e um pouco de PIRA foi perdida (3% de recuperação). Na figura 71c é apresentado

o cromatograma referente a nona eluição (após reconstituição) onde a recuperação de PIRA foi de 93,4%, confirmando o sucesso da separação promovida pelo cartucho MIP.

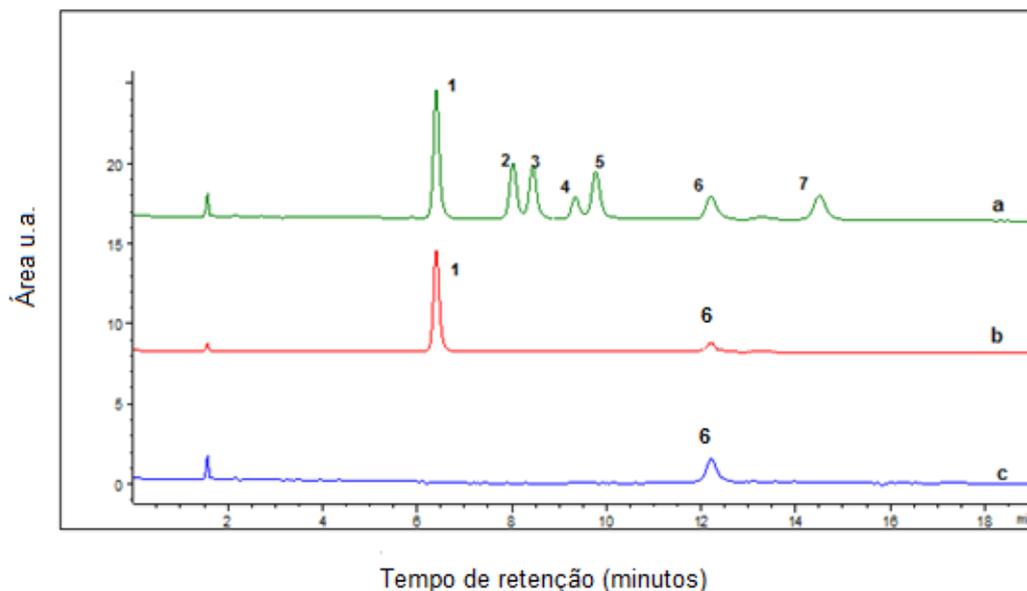


Figura 71 - Cromatogramas dos padrões de pesticidas (a) com detecção por arranjo de diodos (1) AZO; (2) FLU; (3) DIMO; (4) KRESO; (5) PICO, (6) PIRA e (7) TRI, (b) AZO (1) e (6) PIRA após eluição com 2,0 mL de DCM, (c) PIRA após a eluição da nona fração.

Um estudo da mistura dos sete pesticidas foi realizado por HPLC, da mesma forma como descrito anteriormente (9 frações eluídas no cartucho MIP). Um maior reconhecimento para PIRA na coluna MIP foi comprovado em relação aos demais pesticidas. Na Figura 72 (a e b) são mostrados os cromatogramas da mistura dos sete pesticidas (fração 1 e 2) e o cromatograma contendo apenas a PIRA (fração 9). Observou-se uma pequena perda de PIRA nas frações iniciais, e uma recuperação de 94,1% de PIRA na fração 9 livre dos demais pesticidas. Este resultado foi considerado excelente, pois o MIP promoveu a separação de PIRA com uma boa recuperação.

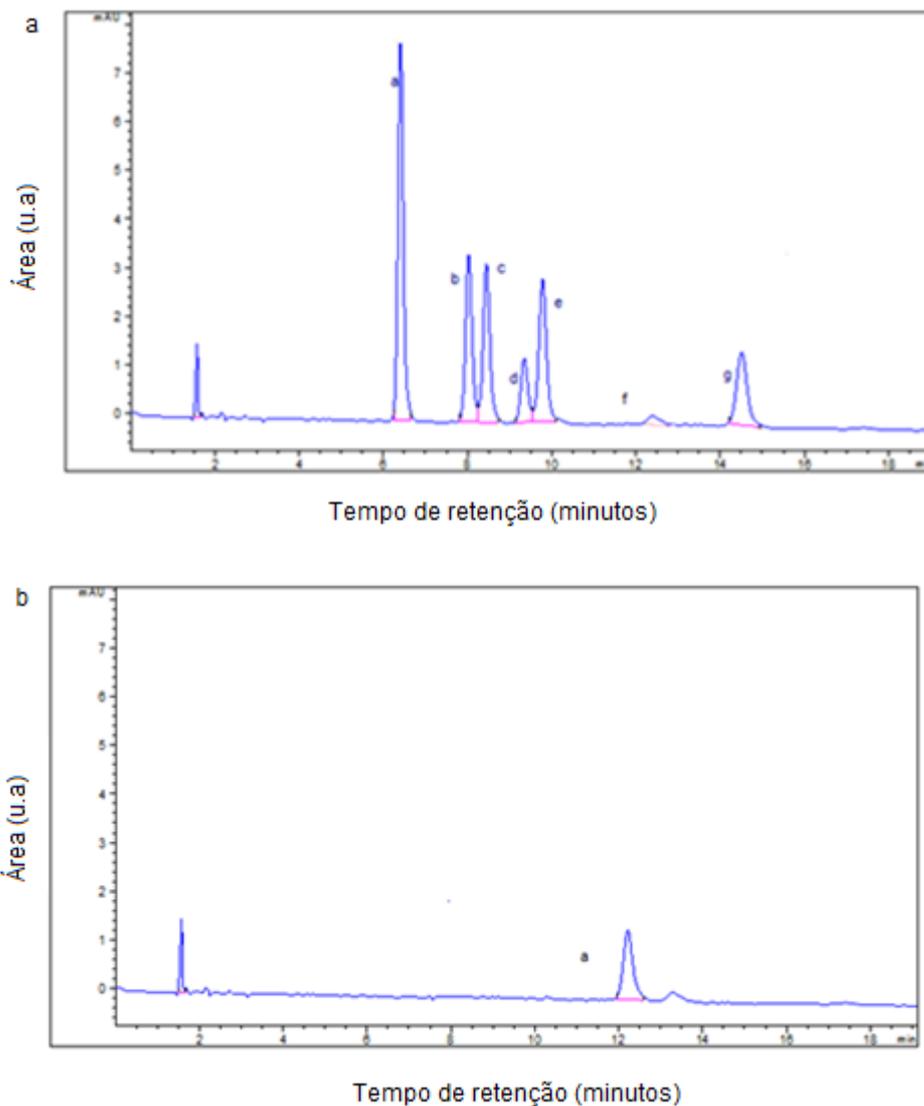


Figura 72 - Cromatograma das frações 1 e 2 (a) contendo os seguintes pesticidas: a) AZO; b) FLU; c) DIMO; d) KRESO; e) PICO; f) PIRA e g) TRI e (b) PIRA recuperada na fração 9.

### 3.4.5.

#### Aplicação do MIP-PIRA como SPE em amostras de urina e água de rio fortificadas com PIRA.

Amostras de 100,0  $\mu\text{L}$  de urina foram fortificadas com 10,0  $\mu\text{L}$  de uma solução  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de PIRA.

Foi verificado que a matriz de urina apresenta um sinal fluorescente alto nos comprimentos de onda escolhidos para as análises da PIRA (274/335 nm), por isso foi necessário um tratamento prévio da matriz. Além da elevada retenção do analito no MIP, a matriz polimérica foi extremamente relevante para minimizar a

presença dos interferentes na amostra. O procedimento foi realizado conforme descrito no capítulo 2. A Figura 73 mostra o cromatograma (a) da urina sem tratamento (sem passar pelo MIP), o cromatograma da urina (b) após a limpeza feita no cartucho e o cromatograma da urina fortificada (c) após eluição na coluna MIP. A limpeza dos interferentes presentes na matriz foi feita através da adição de 3,0 mL de água ao cartucho MIP contendo amostra, em seguida adicionou-se mais 1,0 mL de água ao cartucho e fez-se a injeção de 10,0  $\mu\text{L}$  desta fração no HPLC. Foi verificado que não houve perda de analito e também não havia mais interferente na matriz de urina (em relação ao tempo de retenção do analito). Posteriormente a PIRA foi recuperada (c) através da eluição com até 9,0 mL de DCM, foi utilizado esta quantidade para garantir a completa remoção de PIRA do cartucho, a detecção de PIRA nesta fração foi feita através da injeção de 10,0  $\mu\text{L}$  de amostra no HPLC. Na Figura 74, encontram-se os espectros de detecção por fluorimetria da amostra de urina, onde (a) corresponde a amostra de urina sem tratamento, (b) urina após percolação pelo cartucho MIP e limpa com 4,0 mL de água e (c) recuperação de PIRA na amostra de urina na concentração de  $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  (equivamente a uma recuperação de 94,6%).

Os valores de recuperação das amostras de urina detectados por HPLC e espectrofluorimetria encontram-se na Tabela 21 mostrada mais adiante.

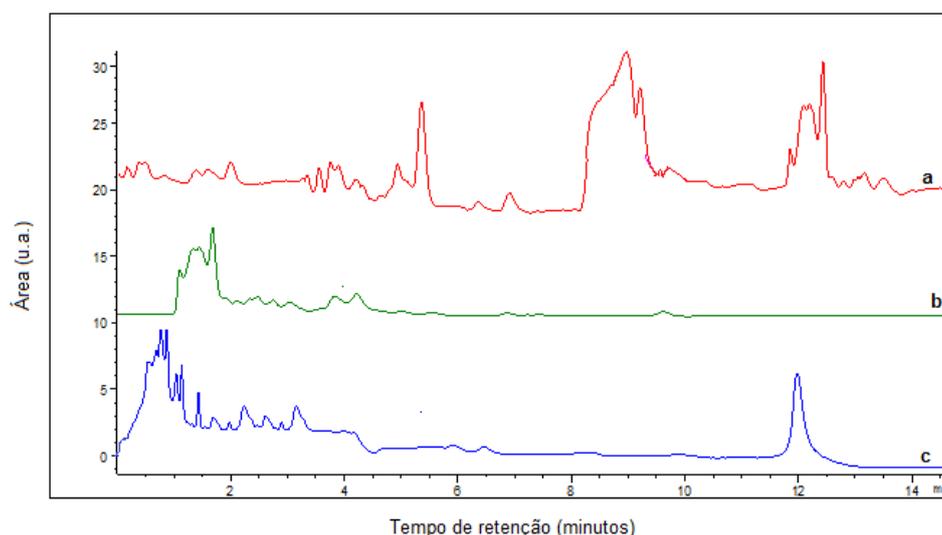


Figura 73 - Cromatogramas: (a) Amostra sem tratamento (b) fração da urina após eluição no MIP (livre de interferente na região da PIRA) e (c) fração da urina fortificada com PIRA na concentração de  $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  após eluição com 9,0 mL de DCM.

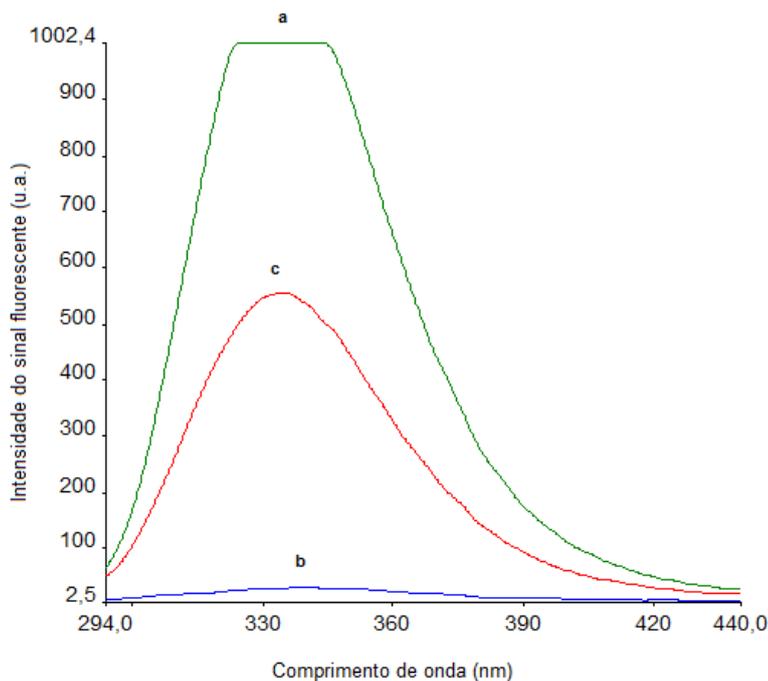


Figura 74 - Espectros: (a) Amostra sem tratamento (b) fração da urina após eluição no MIP e (c) fração da urina fortificada com PIRA recuperada na concentração de  $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  após eluição com 9 mL de DCM.

Amostras de 50,0 mL de água de rio foram fortificadas com 15,0  $\mu\text{L}$  ( $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) PIRA, estas foram adicionadas aos cartuchos MIP, o eluato foi monitorado por HPLC e espectrofluorimetria (Figura 75 e 76), e não foi observado resíduo de PIRA. O cromatograma 75a representa uma amostra de água de rio sem tratamento (passagem pelo MIP) e o cromatograma 75b a última fração de água recolhida após percolação no MIP. Observou-se uma limpeza adequada. Em seguida adicionou-se 9,0 mL de DCM. O solvente eluído foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e as amostras foram retomadas na condição de análise (balão de 5,0 mL) cromatograma 75c. Para a PIRA, o procedimento adotado forneceu um fator de pré-concentração de 10 vezes, além de uma boa eficiência na extração. Os resultados da Figura 76, também apresentam uma boa recuperação para a PIRA na determinação por fluorimetria. Na Figura 76a é mostrado o espectro da água de rio sem tratamento e na Figura 76b é mostrado o espectro da eluição da água de rio após a percolação de 9,0 mL de DCM. Os valores das recuperações para a determinação de PIRA em água do rio são mostrados na Tabela 21.

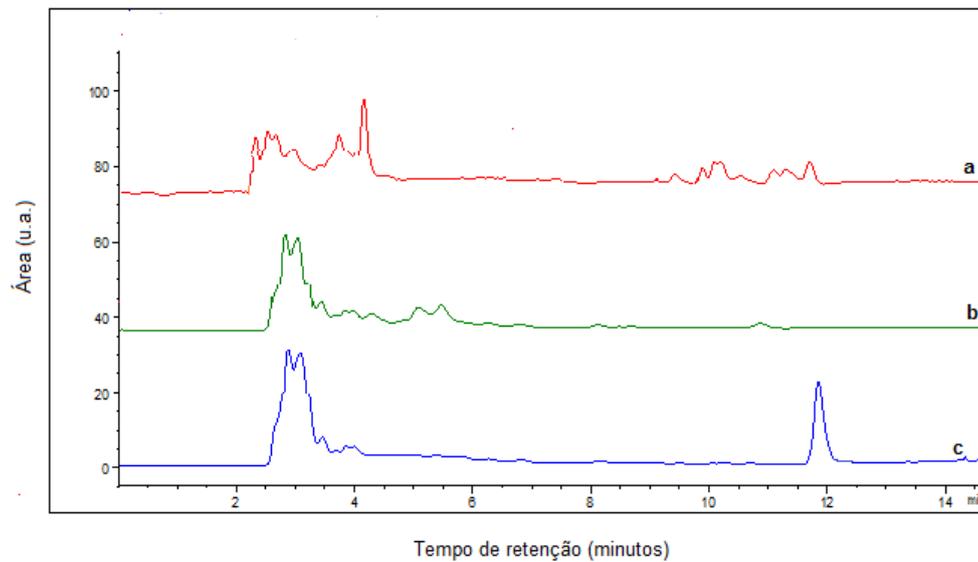


Figura 75 - Cromatogramas: (a) água de rio sem tratamento (antes de passar pelo cartucho), (b) água de rio após eluição no cartucho MIP e (c) Recuperação de PIRA na amostra de água de rio, após eluição com 9,0 mL de DCM.

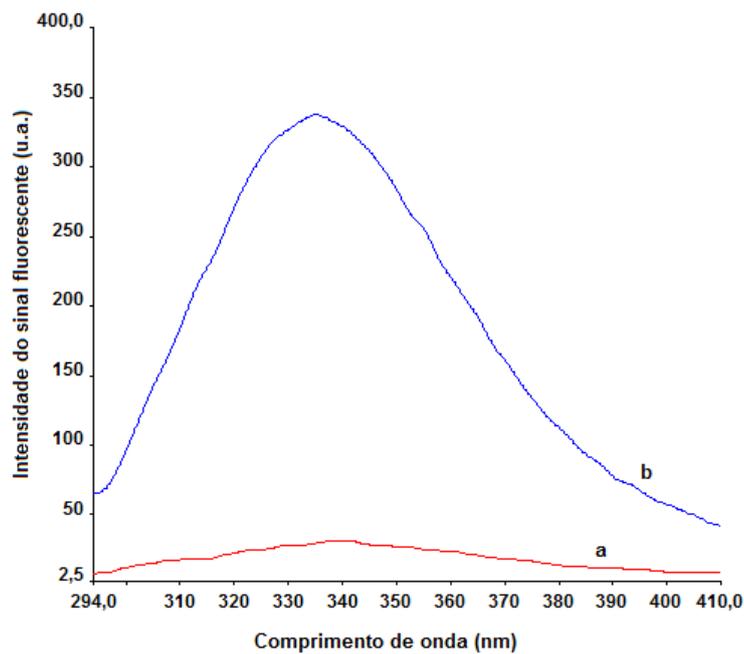


Figura 76 - Espectros de fluorimetria: (a) água de rio sem tratamento (antes de passar pelo cartucho), e (b) Recuperação de PIRA na amostra de água de rio, após eluição com 9,0 mL de DCM.

Tabela 21 - Valores de recuperação de PIRA em amostras de água do rio e urina.

	Amostras	
	Água do rio (n=3)	Urina (n=3)
Espectrofluorimetria	102,3 ± 1,1 %	100,3 ± 1,5%
HPLC com detecção por fluorimetria	105,6 ± 1,2 %	104,8 ± 1,8%

### 3.4.6.

#### Parâmetros da validação dos métodos analíticos

A seguir serão apresentados os parâmetros de validação: linearidade da resposta analítica, limite de detecção, limite de quantificação, precisão para o MIP-PIRA.

#### 3.4.6.1.

##### Linearidade da resposta analítica

A avaliação da linearidade para PIRA foi realizada através de ensaios com soluções padrão. Construiu-se três curvas analíticas, sendo cada ponto da curva o resultado médio de três medições com respectivos desvios. As faixas lineares obtidas cobriram as concentrações de analito entre  $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (detecção por fluorimetria),  $2,2 \times 10^{-9}$  a  $7,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (detecção cromatográfica por fluorimetria) e  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $2,0 \times 10^{-6}$  (detecção cromatográfica UV-vis DAD). A Figura 77, Figura 78 e Figura 79 apresentam curvas analíticas construídas para a PIRA para determinações por espectrofluorimetria, cromatografia com detecção por fluorimetria e cromatografia por detecção DAD. Os coeficientes angular e linear e o coeficiente de correlação das curvas analíticas encontram-se nas Tabelas 22, 23 e 24. Na Tabela 25 encontram-se os parâmetros dos demais pesticidas.

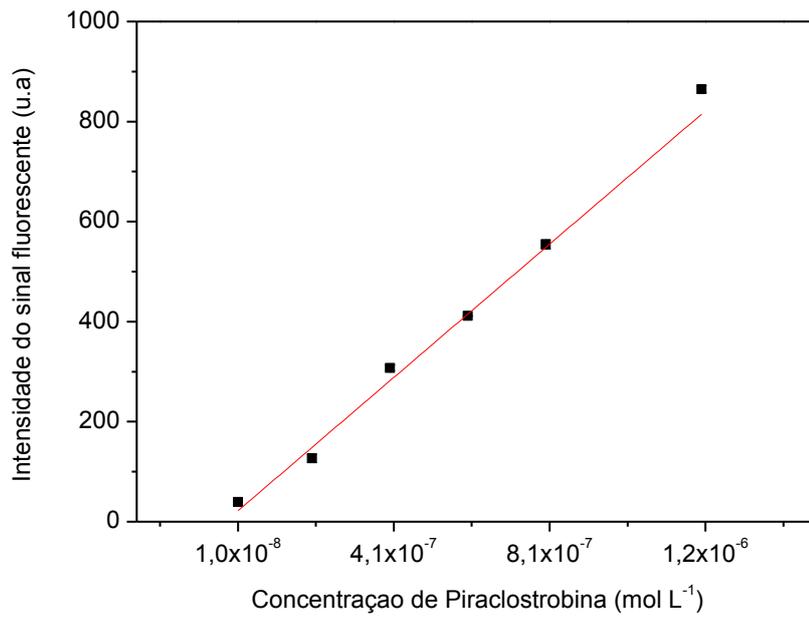


Figura 77 - Curva analítica do padrão de PIRA (mol L<sup>-1</sup>) obtida por espectrofluorimetria.

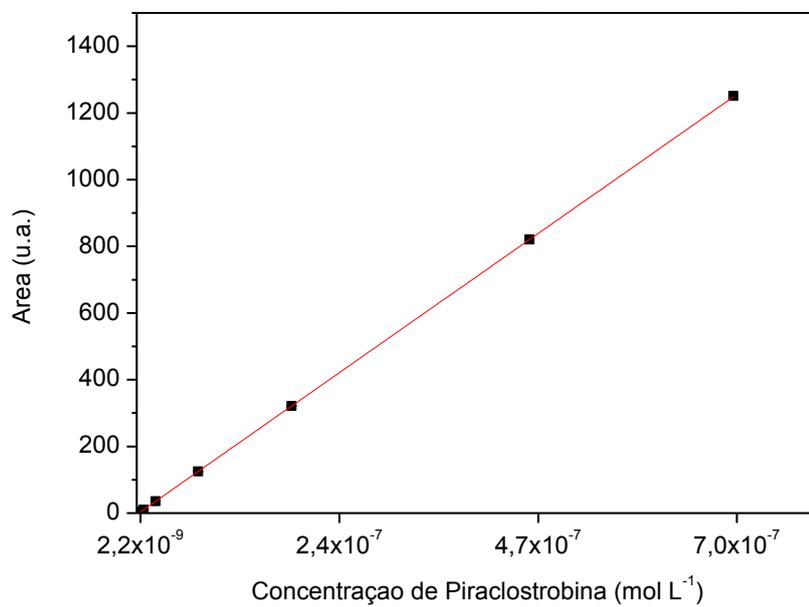


Figura 78 - Curva analítica de PIRA (mol L<sup>-1</sup>) obtida por HPLC com detecção por fluorimetria.

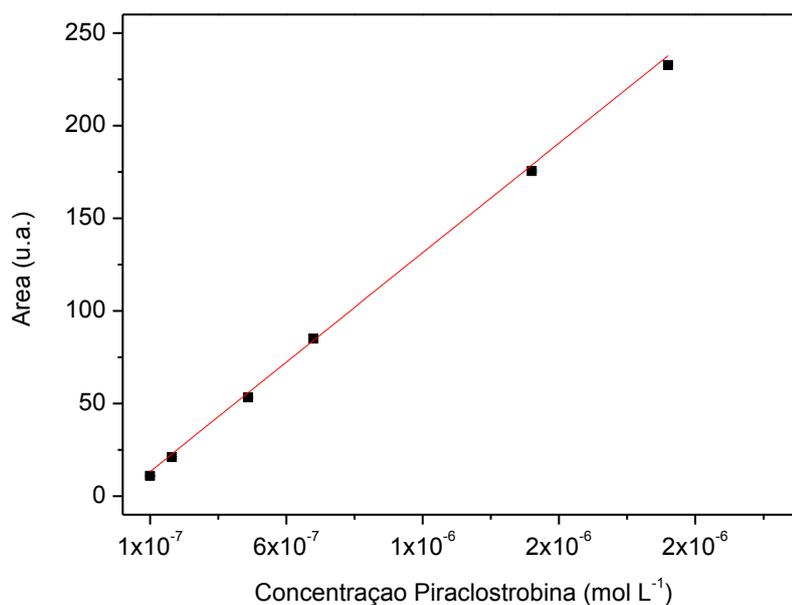


Figura 79 - Curva analítica do padrão de PIRA (mol L<sup>-1</sup>) obtida por HPLC com detecção de absorção (DAD).

Tabela 22 - Parâmetros das curvas analíticas de padrão de PIRA obtidas por espectrofluorimetria.

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	7,15x10 <sup>+8</sup>	7,18 x10 <sup>+8</sup>	7,18 x10 <sup>+8</sup>	6,98 x10 <sup>+8</sup>
Interseção	-4,98	-6,42	-7,82	9,72
R <sup>2</sup>	0,996	0,996	0,996	0,996

Tabela 23 - Parâmetros das curvas analíticas de padrão de PIRA obtidas por HPLC com detecção fluorimétrica.

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	1,78x10 <sup>+9</sup>	1,79x10 <sup>+9</sup>	1,79x10 <sup>+9</sup>	1,79 x10 <sup>+9</sup>
Interseção	6,26x10 <sup>-2</sup>	-3,9 x10 <sup>-1</sup>	-3,18 x10 <sup>-1</sup>	-2,15 x10 <sup>-1</sup>
R <sup>2</sup>	0,989	0,986	0,997	0,990

Tabela 24 - Parâmetros das curvas analíticas de padrão de PIRA obtidas por HPLC com detecção DAD.

	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>Curva média</i>
Inclinação	$1,17 \times 10^{+8}$	$1,16 \times 10^{+8}$	$1,16 \times 10^{+8}$	$1,17 \times 10^{+8}$
Interseção	$3,83 \times 10^{-1}$	$1,60 \times 10^{-1}$	$6,46 \times 10^{-1}$	$3,97 \times 10^{-1}$
R <sup>2</sup>	0,997	0,996	0,998	0,995

Tabela 25 - Parâmetros das curvas analíticas dos padrões dos pesticidas obtidas por espectrofluorimetria, HPLC com detecção por DAD e fluorimetria.

<b>Pesticidas</b>	<b>Faixa (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Equação da reta</b>
<b>Cromatografia líquida com detecção por fotometria de absorção (DAD)</b>			
<b>Azoxistrobina</b>	$6,0 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-6}$	0,996	$Y=7,11 \times 10^{+8}x + 8,7292$
<b>Fluoxastrobina</b>	$2,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-7}$	0,998	$Y=3,69 \times 10^{+8}x + 0,0046$
<b>Dimoxistrobina</b>	$2,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-7}$	0,989	$Y=3,96 \times 10^{+8}x - 0,5576$
<b>Kresoxim-metil</b>	$4,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-7}$	0,987	$Y=1,65 \times 10^{+8}x - 0,2662$
<b>Trifloxistrobina</b>	$2,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-7}$	0,995	$Y=2,84 \times 10^{+8}x + 0,5636$
<b>Picoxistrobina</b>	$2,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-7}$	0,996	$Y=3,85 \times 10^{+8}x - 0,6454$
<b>Cromatografia líquida com detecção por fluorimetria</b>			
<b>Azoxistrobina</b>	$3,0 \times 10^{-8} - 3,0 \times 10^{-6}$	0,996	$Y= 1,67 \times 10^{+8}x -2,5500$
<b>Espectrofluorimetria</b>			
<b>Azoxistrobina</b>	$5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	1,000	$Y=9,18 \times 10^{+7}x + 2,7200$

O método dos mínimos quadrados parte do pressuposto que os resíduos seguem uma distribuição normal tem variância constante ao longo do eixo x e são independentes, ou seja, não há autocorrelação dos resíduos. Para verificar o ajuste ao modelo linear utilizou-se o teste F. O bom ajuste ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória no gráfico dos resíduos em torno da média (zero) apresentada nas Figuras 80, 81 e 82, para determinações por espectrofotômetro, HPLC com detecção por fluorimetria e HPLC com detecção por absorção (DAD), respectivamente.

O ajuste ao modelo linear e a significância da regressão foi verificado através da ANOVA. A análise demonstrou regressões significativas ( $p < 0,001$ ) e o ajuste ao modelo linear ( $p > 0,05$ ) para as duas técnicas utilizadas.

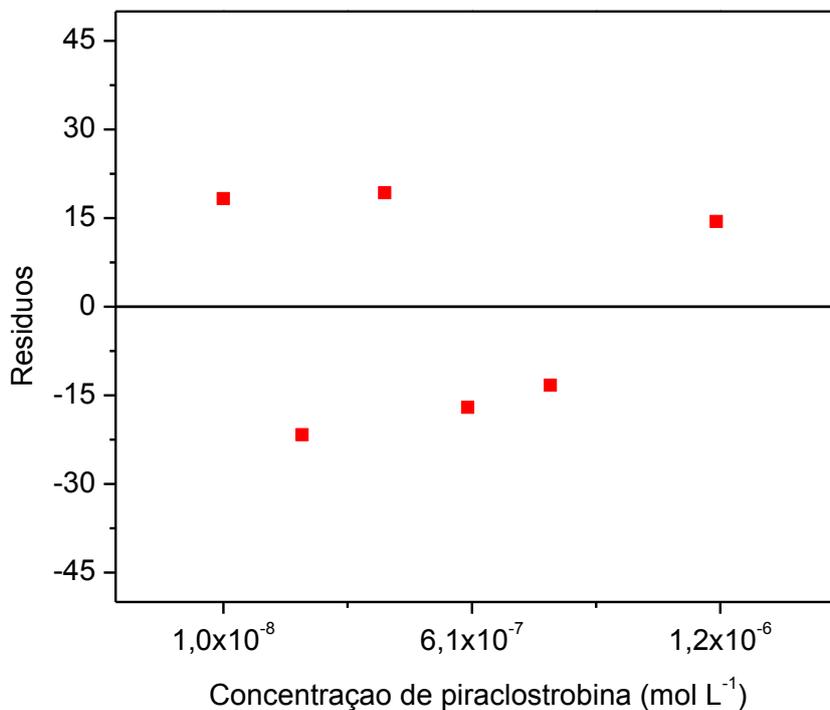


Figura 80 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a PIRA na determinação por espectrofluorimetria.

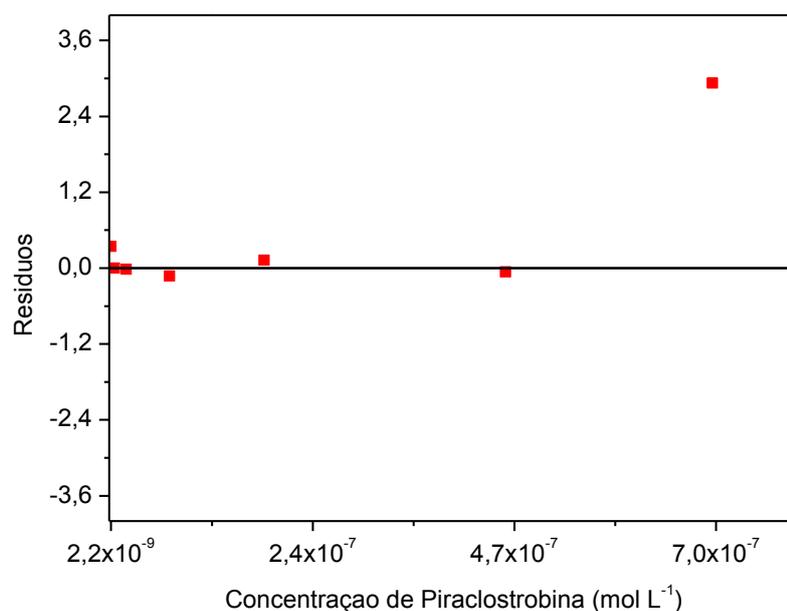


Figura 81 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a PIRA na determinação por HPLC com detecção por fluorimetria.

Na Figura 81 embora o valor do resíduo do último ponto seja aproximadamente 2,5, este valor é muito pequeno, quando comparado com o valor da área prevista pelo modelo linear (aproximadamente 1250 u.a.).

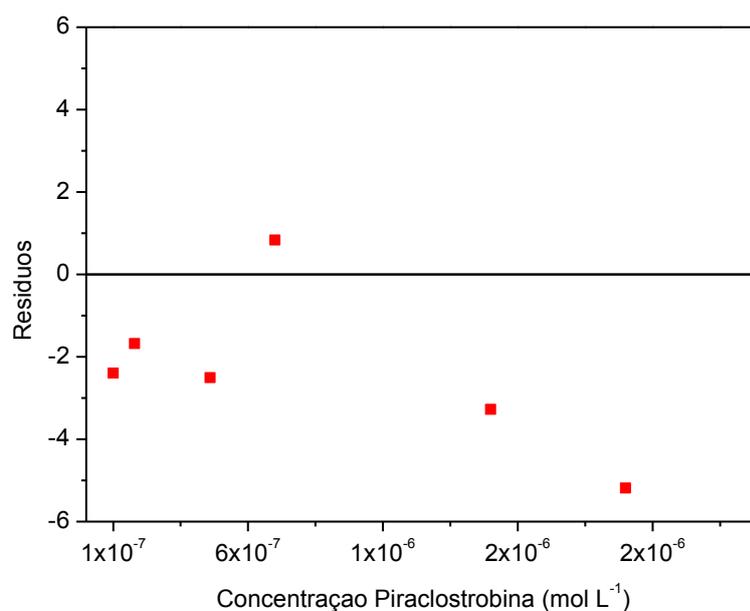


Figura 82 - Gráfico de resíduos da curva analítica para a PIRA na determinação por HPLC com detecção por absorção (DAD).

### 3.4.6.2. Limite de detecção e de quantificação

Os cálculos para obtenção de LOD e LOQ foram realizados conforme Equações 7, 8, 9 e 10 descritas no capítulo 2. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 26. Observa-se que a melhor detectabilidade deu-se por fluorescência, já que a PIRA fluoresce mais do que absorve.

Tabela 26 - LOD e LOQ para a determinação da PIRA por espectrofluorimetria e HPLC com detecção por fluorimetria.

	<i>Espectrofluorimetria</i>	<i>HPLC com detecção por fluorimetria</i>	<i>HPLC com detecção por (DAD)</i>
LOD (mol L <sup>-1</sup> )	4,67 x 10 <sup>-9</sup>	7,67 x 10 <sup>-10</sup>	6,60 x 10 <sup>-8</sup>
LOQ (mol L <sup>-1</sup> )	8,87 x 10 <sup>-9</sup>	1,56 x 10 <sup>-9</sup>	9,65 x 10 <sup>-8</sup>

### 3.4.6.3. Precisão

A precisão dos métodos foi avaliada em termos da repetitividade. A repetitividade foi calculada pelo desvio padrão relativo (% RSD) indicado na Equação 11, conforme descrita na página 95. Foi avaliada uma concentração dentro da faixa de trabalho (2,0 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos por meio de 12 experimentos consecutivos produziram um % RSD de 7,6, 7,1 e 7,8 para as determinações por espectrofluorimetria, HPLC com detecção por fluorimetria e HPLC com detecção por DAD, respectivamente.

### 3.4.6.4. Comparação da precisão entre métodos

Testes foram realizados entre os três métodos, comparando o método de referência adaptado (HPLC com detecção por fluorimetria) com os métodos espectrofluorimétricos e HPLC-DAD. A concentração escolhida para o teste foi de 2,0 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. O teste de t Student foi aplicado para n=5 e os resultados se

mostraram satisfatórios para um nível de 95% de confiança ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ), conforme mostrado na Tabela 27.

Tabela 27 - Resultados encontrados utilizando detecção por HPLC e espectrofluorimetria em mol L<sup>-1</sup>.

<i>n</i>	<i>Espectrofluorimetria</i>	<i>HPLC -fluorimetria</i>	<i>HPLC-DAD</i>
1	1,98 x10 <sup>-7</sup>	2,07 x10 <sup>-7</sup>	2,08 x10 <sup>-7</sup>
2	2,27 x10 <sup>-7</sup>	1,96 x10 <sup>-7</sup>	2,21 x10 <sup>-7</sup>
3	2,00 x10 <sup>-7</sup>	1,99 x10 <sup>-7</sup>	2,12 x10 <sup>-7</sup>
4	1,95 x10 <sup>-7</sup>	2,00 x10 <sup>-7</sup>	2,16 x10 <sup>-7</sup>
5	1,98 x10 <sup>-7</sup>	1,97 x10 <sup>-7</sup>	2,00 x10 <sup>-7</sup>
Média	2,04 x10 <sup>-7</sup>	2,00 x10 <sup>-7</sup>	2,11 x10 <sup>-7</sup>
Desvio padrão	1,32 x10 <sup>-8</sup>	4,32 x10 <sup>-9</sup>	7,99 x10 <sup>-9</sup>
$t_{\text{calculado}}$	0,557		0,021
$t_{\text{tabelado}}$	2,306		