

# ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR VISANDO A SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE FENITROTIONA EM TOMATE

Dissertação de Mestrado apresentada por Leonardo Augusto de Barros ao Programa de Pós-Graduação Química em do Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. SUSANNE RATH

#### CAMPINAS/SP

#### **FEVEREIRO DE 2010**

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

B278e	Barros, Leonardo Augusto de. Estudos de modelagem molecular visando a síntese de um polímero de impressão molecular para a determinação de fenitrotiona em tomate / Leonardo Augusto de Barros Campinas, SP: [s.n], 2010.
	Orientadora: Susanne Rath.
	Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	<ol> <li>Modelagem molecular. 2. MISPE-HPLC.</li> <li>Fenitrotiona. 4. Tomate. I. Rath, Susanne.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</li> </ol>

**Título em inglês:** Studies of molecular modelling for the synthesis of a molecularly imprinted polymer for the determination of fenitrothion in tomato

Palavras-chaves em inglês: Molecular modelling, MISPE-HPLC, Fenitrothion, Tomato

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Susanne Rath (orientadora), Isarita Martins Sakakibara (UNIFAL-MG), Marco Aurélio Zezzi Arruda (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 24/02/2010

"A alma não tem segredo que o Comportamento não revele"

Lao-Tsé

### **A**GRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Susanne Rath, pela qual tenho uma admiração incondicional tanto como pessoa e como profissional; meus sinceros agradecimentos por me aceitar como aluno e pela orientação segura e irrefutável participação em minha formação científica.

À UNICAMP, especialmente ao Instituto de Química e à CPG, por todo o suporte de infra-estrutura disponibilizado para a realização deste trabalho.

Ás agências de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP, respectivamente, pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio pesquisa concedidos.

Aos professores que gentilmente aceitaram ao convite para participar de minha banca de Qualificação e de Defesa: Marco Aurélio Zezzi Arruda, Anne Hélène Fostier, Munir Salomão Skaf, Isarita Martins, Marili Villa Nova Rodrigues e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Ao Prof. Rogério Custódio, pelos ensinamentos sobre Modelagem Molecular.

Aos meus amigos de trabalho com os quais convivi nestes dois anos: Cyntia, Fernando, Isarita, Keity, Lais, Larissa, Livia, Martins, Rafael Porto e, pelas valiosas sugestões, um agradecimento especial ao Ricardo. Obrigado a vocês por todo companheirismo e paciência durante todo esse tempo.

Aos meus queridos amigos, que são a base de minha vida: Alexandre Pistori, Ana Lúcia Neves, Andressa Barros, Danilo Telles, Fernando Quites, Henrique Araújo, João Paulo Cancian, João Paulo Dias e Patrícia Neves. Um agradecimento especial ao Luciano Neves, por todo suporte e companheirismo ao qual me proporcionou em todos esses anos, e ao André Ricardo Panassolo, pela confiança de sempre.

A minha fiel companheira, Boo, e a minha família, os quais eu amo acima de tudo e incondicionalmente.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado!

vii

### **CURRICULUM VITAE**

#### Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/3959187662567213

#### 1. Formação Acadêmica

2008-2010 Mestrado em Química Analítica. IQ/UNICAMP, Brasil.
Título: Estudos de modelagem molecular visando a síntese de um polímero de impressão molecular par a determinação de fenitrotiona em tomate.
Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2003-2007 Graduação em Bacharelado em Química. UFSCar, Brasil.

#### 2. Produção Científica

#### 2.1. Artigo aceito para publicação

BARROS, L.A.; MARTINS, I.; RATH, S. A selective molecularly imprinted polymersolid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. DOI 10.1007/s00216-010-3629-4.

#### 2.2. <u>Resumo de trabalho científico aceito para apresentação em</u> <u>congresso</u>

BARROS, L.A.; RATH, S. Development and validation of a selective molecularly imprinted polymer based solid phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes using HPLC. In: 35<sup>o</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2010. Boston, EUA.

#### 2.3. <u>Apresentação de trabalhos em eventos científicos</u>

BARROS, L.A.; PEREIRA, L.A.; RATH, S. Avaliação da eficiência de extração de fenitrotiona em tomate através de extração líquido-líquido e extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE). In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA), 2009, Salvador/BA.

BARROS, L.A.; PEREIRA, L.A.; RATH, S. Seletividade de adsorção de um polímero de impressão molecular para fenitrotiona em relação aos seus análogos. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2009, Fortaleza/CE.

BARROS, L.A.; PEREIRA, L.A.; CUSTÓDIO, R.; RATH, S. Modelagem molecular visando a síntese de um polímero de impressão molecular para fenitrotiona. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2009, Fortaleza/CE.

#### 3. Monitoriais

08/2009 – 12/2009	Programa de Estágio Docente (PED C), DQA/IQ/UNICAMP. Química III – QA 313 (Coordenadora: Profa. Dra. Susanne Rath)
03/2009 – 07/2009	Programa de Estágio Docente (PED C), DQA/IQ/UNICAMP. Química Clássica – QA 282 (Coordenadora: Profa. Dra. Solange Cadore)

#### 4. Cursos Científicos

*"Validação de métodos cromatográficos para análises de fármacos"*, ministrada pela Profa. Dra. Susanne Rath e pela Profa. Dra. Marili Villa Nova Rodrigues,com duração de <u>32 horas</u>, no IQ/UNICAMP, realizada no período de 9 a 12 de Novembro de 2009.

*"Cromatografia multidimensional"*, ministrada pela Profa. Dra. Elina Bastos Caramão (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil) com duração de <u>6 horas</u>, durante o 15º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) realizada no dia 18 de Outubro de 2009.

"Qualidade dos alimentos – Aspectos químicos e nutricionais", com duração de <u>8</u> <u>horas</u>, realizada no Instituto de Tecnologia de Alimentos e promovido pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada e realizada no dia 11 de Setembro de 2007.

*"Descoberta de novos fármacos - Estratégias clássicas e racionais"*, com duração de <u>14 horas</u>, ministrado pela Profa. Dra. Dulce Madalena M. M. Pinto e Profa. Dra. Maria

S. J. Nascimento, durante a 26º Escola de Verão em Química Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira, realizada no período de 6 a 17 de Fevereiro de 2006 no DQ/UFSCar.

*"Macromoléculas como alvos para produção de fármacos - Obtenção e caracterização de proteínas"*, com duração de <u>14 horas</u>, ministrado pela Profa Dra Dulce H. F. Souza, durante a 26º Escola de Verão em Química Prof. Dr. José Tércio B. Ferreira, realizada no período de 6 a 17 de Fevereiro de 2006 no DQ/UFSCar.

*"Nano, supra, química"*, com duração de <u>10 horas</u>, ministrado durante a 6º Jornada Científica, realizada no período de 10 a 14 de Outubro de 2005 no DQ/UFSCar.

#### 5. Estágio Profissional

Centro de P&D de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada (Instituto de Tecnologia de Alimentos), sob orientação do pesquisador científico Dr. Marcelo A. Morgano, no período de Agosto/2007 a Janeiro/2008, com financiamento da FUNDEPAG.

### RESUMO

### ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR VISANDO A SÍNTESE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE FENITROTIONA EM TOMATE

Esse trabalho teve como objetivo principal sintetizar um polímero de impressão molecular (MIP) para ser empregado em processo de extração em fase sólida (SPE), visando a determinação de resíduos de fenitrotiona (FNT) em tomates. Os reagentes da síntese foram selecionados a partir de estudos de modelagem molecular, usando para tanto o programa computacional Gaussian 03. As energias eletrônicas de ligação para a interação entre o monômero funcional e a FNT, no vácuo e no solvente, foram calculadas através do método DFT, no nível B3LYP e conjunto de base 6-31G(d). Os reagentes de síntese foram: FNT (molde), ácido metacrílico (monômero funcional), etilenoglicol dimetacrilato (reagente de ligação cruzada), AIBN (iniciador radicalar) e tolueno (solvente porogênico). Também foi sintetizado um polímero não-impresso (NIP). Por meio de estudos de adsorção foi avaliado o meio de melhor reconhecimento molecular. Foram construídas as isotermas de adsorção para cada um dos polímeros impresso e não impresso e foi avaliada a seletividade do MIP frente a análogos da FNT. Os polímeros foram caracterizados por infravermelho com transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C, microscopia de varredura eletrônica e porosimetria de sorção de nitrogênio (BET). O MIP foi empregado como fase estacionária em SPE. Foi desenvolvido e validado um método para a determinação de FNT em tomates, usando a cromatografia líquida de alta eficiência. A eficiência de extração foi de 96%. A faixa linear foi de 130 a 2000 ng g<sup>-1</sup>, com uma linearidade superior a 0,99. A precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram inferiores a 7,0% e 8,1%, respectivamente (níveis de fortificação 250, 500 e 1000 ng g<sup>-1</sup>). A exatidão foi superior a 89% no nível de fortificação em torno do limite máximo de resíduo de 500 ng g<sup>-1</sup>.

## ABSTRACT

### STUDIES OF MOLECULAR MODELLING FOR THE SYNTHESIS OF A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR THE DETERMINATION OF FENITROTHION IN TOMATO

This work aimed the synthesis of a molecularly imprinted polymer (MIP) to be employed in process of solid phase extraction (SPE), for the determination of residues of fenitrothion (FNT) in tomatoes. The synthesis reagents were selected from molecular modeling, using the Gaussian 03 software. The electronic binding energies for the interaction between the functional monomer and the FNT, in vacuum and in solvent, were calculated by the DFT method in B3LYP level and 6-31G(d) basis set. The reagents of the synthesis were: FNT (template), methacrylic acid (functional monomer), ethyleneglycol dimethacrylate (cross-linker), AIBN (initiator) and toluene (porogenic solvent). Also, was synthesized a non-imprinted polymer. Through batch rebinding studies were evaluated the medium of the best molecular recognition. The adsorption isotherms for each imprinted and non-imprinted polymer were constructed and the selectivity of the MIP in relation to FNT analogues evaluated. The polymers were characterized by Fourier transform infrared, <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance, scanning electron microscopy and nitrogen sorption porosimetry (BET). The MIP was employed as stationary phase in SPE. A method for the determination of FNT in tomatoes was developed and validated, using high performance liquid chromatography. The extraction efficiency was 96%. The linear range was 130 to 2000 ng g<sup>-1</sup>, with a linearity greater than 0.99. The intra-day and inter-day precision were lower than 7.0% and 8.1%, respectively (fortification levels 250, 500 e 1000 ng g<sup>-1</sup>). The accuracy was higher than 89% for a concentration level around the maximum residue limit of 500 ng  $g^{-1}$ .

# ÍNDICE GERAL

Descrição	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	xxix
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b>	1
I.1 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR	2
I.2 MODELAGEM MOLECULAR	15
I.2.1 A QUÍMICA QUÂNTICA E OS MÉTODOS DE CÁLCULOS QUÂNTICOS	15
<b>I.2.2</b> TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE	18
I.2.3 MODELOS DE SOLVENTE	20
<b>I.2.4</b> APLICAÇÃO DA MODELAGEM MOLECULAR NA SÍNTESE DE POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR	
I.3 AGROTÓXICOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS	23
I.4 AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS	26
I.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	29
I.5.1 SELETIVIDADE	30
<b>I.5.2</b> CURVA ANALÍTICA, LINEARIDADE E SENSIBILIDADE	30
I.5.3 PRECISÃO	31

	I.5.4	Exatidão	32
	I.5.5	LIMITE DE DETECÇÃO	34
	I.5.6	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	34
		CAPÍTULO II - OBJETIVOS	37
		<u>Capítulo III – Parte Experimental</u>	41
III.1	REA	GENTES E SOLUÇÕES	43
III.2	Equ	IPAMENTOS	44
III.3	Pro	CEDIMENTOS	46
	III.3. <sup>-</sup>	1 MODELAGEM MOLECULAR	46
	III.3.	2 SÍNTESE DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR	50
MET	III.3.	3 DETERMINAÇÃO DA FENITROTIONA, PARATIONA, ATIONA E FENTIONA POR VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA	51
	III.3.4	4 ESTUDO DO MEIO DE ADSORÇÃO E ISOTERMA DE ADSORÇÃO	51
FRE	III.3.	5 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE DO MIP DA FENITROTIONA SEUS ANÁLOGOS ESTRUTURAIS	52
Líqi	<b>III.3.</b> JIDA DI	6 DETERMINAÇÃO DA FENITROTIONA POR CROMATOGRAFIA E ALTA EFICIÊNCIA	53
	III.3. <sup>-</sup>	7 PREPARO DE AMOSTRA DE TOMATE	54
DE F	III.3.	8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MISPE-HPLC PARA DETERMINAÇÃO OTIONA EM TOMATE	55
		<b>III.3.8.1</b> CURVA ANALÍTICA, LINEARIDADE E SENSIBILIDADE	56
		III.3.8.2 SELETIVIDADE	56

III.3.8.3	Precisão	56
III.3.8.4	Exatidão	57
III.3.8.5	LIMITE DE DETECÇÃO	57
III.3.8.6	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	57
<u>Capí</u>	TULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
IV.1 MODELAGEM MO	DLECULAR	61
IV.2 SÍNTESE DO POR	LÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR	67
IV.3 DETERMINAÇÃO QUADRADA	D DA FNT, PT, MPT E FT POR VOLTAMETRIA DE ONDA	69
IV.4 ESTUDOS DE AD	SORÇÃO E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	70
IV.4.1 ESTUDO	DO MEIO DE ADSORÇÃO E CONSTRUÇÃO DAS RÇÃO	70
IV.4.2 COMPAF POLÍMEROS SINTETIZA	RAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO ENTRE OS NDOS COM OS MONÔMEROS <b>MAA</b> E <b>APVB</b>	79
IV.4.3 AVALIAÇ FRENTE A SEUS ANÁLO	ÃO DA SELETIVIDADE DO MIP DA FENITROTIONA DGOS ESTRUTURAIS	80
IV.4.4 COMPAF POLÍMEROS SINTETIZA	RAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO ENTRE OS DOS COM <b>MAA</b> EM DIFERENTES SOLVENTES	83
IV.5 CARACTERIZAÇA	ÃO DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR	85
IV.5.1 INFRAVE	RMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	85
III.5.2 RESSON Polarização Cruza	ância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C com da e Ângulo Mágico de Rotação	88
III.5.3 MICROS	COPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	90

<b>III.5.4</b> ESTUDOS DE POROSIMETRIA USANDO ENSAIOS DE ADSORÇÃO	93
DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DO MÉTODO BET	
IV.6 DETERMINAÇÃO DA FENITROTIONA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	95
IV.7 CONDIÇÕES DO MISPE E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE FNT	97
<b>IV.8</b> VALIDAÇÃO DO MÉTODO MISPE-HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE FNT EM TOMATE	99
IV.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO MISPE-HPLC NA QUANTIFICAÇÃO DE FNT EM AMOSTRAS DE TOMATE	101
<b>CAPÍTULO V - CONCLUSÕES</b>	103

#### **CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 107

# LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

$\nabla$	Operador Laplaciano
α	FATOR DE SEPARAÇÃO
β	COEFICIENTE DE SELETIVIDADE RELATIVA
δ	DESLOCAMENTO DE SINAL
3	CONSTANTE DIELÉTRICA
$\Delta \mathbf{E_s}$	INCREMENTO DE VARREDURA
$\Delta n$	VARIAÇÃO DO NÚMERO DE MOL DA FASE GASOSA
μ	Momento de dipolo
ρ	DISTRIBUIÇÃO DE CARGA
Ø	POTENCIAL ELETROSTÁTICO
а	Amplitude
Α	MÉDIA DE AFINIDADE DE LIGAÇÃO
ACN	ACETONITRILA
AIBN	2,2'-AZO-BIS-ISO-BUTIRONITRILA
AM1	AUSTIN MODEL
В	CONCENTRAÇÃO DE ANALITO ADSORVIDO PELO POLÍMERO
BET	BRUNAUER-EMMET-TELLER
BJH	BARRET-JOYNER-HALENDA

BR	BRITTON-ROBINSON
CP-MAS	Polarização Cruzada e ângulo Mágico de Rotação, do inglês <i>Cross Polarization Magic Angle Spinning</i>
CV	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO
DAD	DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS
DCM	DICLOROMETANO
DFT	Teoria do Funcional da Densidade, do inglês <i>Density</i> <i>Functional Theory</i>
Е	ENERGIA EM HARTRESS
Eo	ENERGIA ELETRÔNICA CORRIGIDA CORRIGIDA PELA ENERGIA DO PONTO-ZERO, DO INGLÊS <i>ZERO-POINT ENERGY</i>
EGDMA	ETILENO GLICOL DIMETACRILATO
Ep	POTENCIAL DE PICO
E <sub>rot</sub>	ENERGIA ROTACIONAL
Ετ	ENERGIA TÉRMICA TOTAL
E <sub>Tcomplexo</sub>	ENERGIA INTERNA DO COMPLEXO MOLDE-MONÔMERO FUNCIONAL
E <sub>Tmolde</sub>	ENERGIA INTERNA DO MOLDE
E <sub>Tmonômero</sub>	ENERGIA INTERNA DO MONÔMERO FUNCIONAL
E <sub>transl</sub>	ENERGIA TRANSLACIONAL
E <sub>vib</sub>	ENERGIA VIBRACIONAL
f	Freqüência

F	CONCENTRAÇÃO LIVRE DO ANALITO EM EQUÍLIBIO
FNT	FENITROTIONA
FT	FENTIONA
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i>
G	ENERGIA LIVRE DE GIBBS
н	ENTALPIA
HF	HARTREE-FOCK
HMDE	Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio, do inglês Hanging Mercury Drop Electrode
HPLC-DAD	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS, DO INGLÊS <i>HIGH</i> <i>PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED</i> <i>PHOTODIODE ARRAY DETECTION</i>
I	CONCENTRAÇÃO INICIAL DA SOLUÇÃO CONTENDO O ANALITO
IDA	INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL
k	FATOR DE RETENÇÃO
LLE	Extração Líquido-Líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid</i> <i>Extraction</i>
LMR	LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO
LOD	LIMITE DE DETECÇÃO
LOQ	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
m	ÍNDICE DE HETEROGENEIDADE

MAA	ÁCIDO METACRÍLICO
МеОН	Metanol
MF	Monômero funcional
MIP	Polímero de Impressão Molecular, do inglês Molecularly Imprinted Polymer
MISPE	Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa, do inglês <i>Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction</i>
MSPD	Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês <i>Matrix</i> <i>Solid Phase Dispersion</i>
MPT	METILPARATIONA
n	NÚMERO DE REPLICATAS
Ν	NÚMERO DE PRATOS
NIP	Polímero Não-Impresso, do inglês <i>Non-Imprinted</i> <i>Polymer</i>
NMR	Ressonância Magnética Nuclear, do inglês <i>Nuclear</i> <i>Magnetic Ressonance</i>
Nt	NÚMERO TOTAL DE SÍTIOS DE LIGAÇÃO
рс	PESO CORPÓREO
РСМ	Método da Polarização Contínua, do inglês <i>Polarizable</i> <i>Continuum Model</i>
PM3	PARAMETRIC METHOD 3
РТ	Parationa
R	CAMPO DE REAÇÃO
RLC	REAGENTE DE LIGAÇÃO CRUZADA

Rs	Resolução
S <sub>elet</sub>	ENTROPIA ELETRÔNICA
SEM	Microscopia de Varredura Eletrônica, do inglês Scanning Electron Microscopy
SFE	Extração em Fluído Supercrítico, do inglês Supercritical Fluid Extraction
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid-Phase</i> <i>Extraction</i>
SPME	Microextração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase</i> <i>Microextraction</i>
S <sub>rot</sub>	ENTROPIA ROTACIONAL
ST	ENTROPIA TOTAL
S <sub>Tcomplexo</sub>	ENTROPIA DO COMPLEXO MOLDE-MONÔMERO FUNCIONAL
STmolde	ENTROPIA DO MOLDE
S <sub>T</sub> monômero	ENTROPIA DO MONÔMERO FUNCIONAL AVALIADO
Stransl	ENTROPIA TRANSLACIONAL
S <sub>vib</sub>	ENTROPIA VIBRACIONAL
SWV	Voltametria de Onda Quadrada, do inglês <i>Square Wave</i> <i>Voltammetry</i>
т	TEMPERATURA EM KELVIN
t <sub>R</sub>	TEMPO DE RETENÇÃO
U	ENERGIA INTERNA
UV	ULTRAVIOLETA

# LISTA DE TABELAS

N⁰	Descrição	Página
l.1	Classificação e propriedades químicas e físicas da FNT (INCHEM, 2010)	28
I.2	Exatidão mínima requerida para métodos quantitativos segundo a EC (EC, 2002)	33
III.1	Quantidade de reagentes empregados na síntese dos polímeros	50
III.2	Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros cromatográficos (SHABIR, 2003)	53
IV.1	Efeito do solvente na interação FNT-MAA	64
IV.2	Coeficientes de ajuste ao modelo Langmüir-Freundlich	78
IV.3	Bandas de absorção para os espectros de FT-IR do MIP e NIP (XU <i>et al.</i> , 2010)	87
IV.4	Ressonâncias apresentadas nos espectros do MIP e NIP (SPIVAK, 2005)	89
IV.5	Porosimetria dos polímeros sintetizados com MAA e ApVB, em tolueno	94
IV.6	Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos	97
IV.7	Soluções empregadas e eficiência de extração obtido na determinação de FNT em amostras branco de tomate fortificadas (Nível de fortificação: 1,0 µg g <sup>-1</sup> )	99
IV.8	Parâmetros de validação do método MISPE-HPLC-DAD para a determinação FNT em tomate	101

# LISTA DE FIGURAS

N⁰	Descrição	Página
l.1	Esquema representativo do processo de síntese do MIP (Adaptado de CORMACK & ELORZA, 2004)	3
1.2	Monômeros funcionais usados em interações não- covalentes. <u>Ácidos</u> : 1) ácido meta-acrílico (MAA), 2) ácido <i>p</i> -vinilbenzóico (ApVB), 3) ácido acrílico, 4) ácido itacônico, 5) ácido 2-(trifluorometil)-acrílico. <u>Básicos</u> : 6) 4- vinilpiridina, 7) 2-vinilpiridina, 8) 4-(5)-vinilimidazol, 9) 1- vinilimidazol, 10) alilamina. <u>Neutros</u> : 11) acrilamida, 12) metacrilamida, 13) 2-hidroxietil metacrilato, 14) ácido <i>T</i> -3- (3-piridila)-acrílico (Adaptado de CORMACK & ELORZA, 2004)	5
1.3	Reagentes de ligação cruzada usados para impressão molecular: 1) <i>p</i> -divinilbenzeno, 2) 1,3- diisopropenilbenzeno, 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 4) tetrametileno dimetacrilato, 5) N,O- bisacriloíla-L-fenilalaninol, 6) 2,6-bisacriloilamidopiridina, 7) 1,4-fenileno diacrilamida (Adaptado de CORMACK & ELORZA, 2004)	8
.4	Estruturas químicas de alguns iniciadores radicalares: 1) azobisisobutironitrila (AIBN), 2) azobisdimetilvaleronitrila, 3) dimetilacetil de benzila, 4) benzoilperoxido, 5) 4,4'-azo- (ácido 4-cianovalérico) (Adaptado de CORMACK & ELORZA, 2004)	10
I.5	Estrutura da FNT	28

III.1	Esquema geral da etapa de preparo de amostra para a extração da fenitrotiona em tomate	55
IV.1	Estruturas dos monômeros funcionais avaliados	61
IV.2	Valor médio de ∆G para a interação FNT-monômero funcional	62
IV.3	Estrutura otimizada da interação FNT-MAA, obtida através do programa computacional Gaussian03	63
IV.4	Estrutura dos solventes avaliados com as respectivas constantes dielétricas (ε) e índices de polaridade (k') (a 25 °C)	64
IV.5	Valor médio de ΔG para a interação FNT/análogo- monômero funcional (FNT: fenitrotiona; PT: parationa; MPT: metilparationa; FT: fentiona)	66
IV. 6	Voltamogramas de onda quadrada para FNT em diferentes concentrações. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L <sup>-1</sup> em pH 4,75, $f = 250 \text{ s}^{-1}$ , $a = 40 \text{ mV}$ , $\Delta \text{E}_{\text{s}} = 4 \text{ mV}$	70
IV.7	Esquema ilustrativo do procedimento de adsorção (Adaptado de GARCÍA-CALZÓN & DÍAZ-GARCÍA, 2007)	72
IV.8	Adsorção de FNT pelos polímeros MIP e NIP e valor do coeficiente de seletividade relativo nos meios estudados	73
IV.9	Gráfico log B vs log F para todos os polímeros.	76
IV.10	Isotermas de adsorção do MIP e NIP sintetizados com MAA ajustadas ao modelo de Langmüir-Freundlich	78
IV.11	Adsorção de FNT pelos polímeros MIP e NIP dos monômeros funcionais MAA e ApVB e seus valores de coeficiente de seletividade relativo	79

IV.12	Estrutura da fenitrotiona e de seus análogos estruturais	81
IV.13	Adsorção de FNT e análogos pelos polímeros MIP e NIP e seus valores de coeficiente de seletividade relativo	82
IV.14	Adsorção de FNT pelos polímeros MIP e NIP nos solventes avaliados e seus valores de coeficiente de seletividade relativo	84
IV.15	Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP utilizando o monômero funcional MAA	86
IV.16	Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP utilizando o monômero funcional ApVB	86
IV.17	<sup>13</sup> C CP-MAS NMR do MIP e do NIP utilizando o monômero funcional MAA	88
IV.18	<sup>13</sup> C CP-MAS NMR do MIP e do NIP utilizando o monômero funcional ApVB	89
IV.19	Imagem de MEV do MIP e NIP sintetizado com o MAA (aumento de 30000 vezes)	91
IV.20	Imagem de MEV do MIP e NIP sintetizado com o ApVB (aumento de 20000 vezes)	91
IV.21	Imagem de MEV do MIP e NIP sintetizado com o MAA (aumento de 50000 vezes)	92
IV.22	Isoterma de sorção de nitrogênio pela técnica BET para o MIP sintetizado com MAA	93
IV.23	Modelo da formação morfológica dos poros da rede polimérica dos polímeros de impressão molecular (Adaptado de SPIVAK, 2005)	95
IV.24	Cromatograma da amostra de tomate, após o MISPE. Fase estacionária: XTerra <sup>®</sup> C <sub>18</sub> , fase móvel: MeOH/H <sub>2</sub> O	96

xxxi

(84:16, v/v),  $\lambda$  = 270 nm, vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>: 1) Amostra branco; 2) Amostra branco fortificada com 1,00 µg g<sup>-1</sup> de FNT (tempo de retenção, t<sub>R</sub>, da FNT nas condições acima: 4,8 minutos)

**IV.25** Cromatograma de uma amostra de tomate da variedades 102 Debora (A) e orgânico (B), após o MISPE. Fase estacionária: XTerra<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, fase móvel: MeOH/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v),  $\lambda$  = 270 nm, vazão:1,0 mL min<sup>-1</sup>. Tempo de retenção, t<sub>R</sub>, da FNT nas condições acima: 4,8 minutos

# I. INTRODUÇÃO

#### I.1 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

Os polímeros de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) são materiais poliméricos rígidos que apresentam propriedades de reconhecimento molecular elevadas para uma molécula alvo, denominada molde. Os MIP são dotados de sítios específicos de ligação e apresentam tamanhos, formatos e grupos funcionais complementares ao molde (ANDERSSON, 2000; TARLEY *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2005; TÓTH *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2010). Esses sítios específicos de ligação são atribuídos às interações entre o molde e os grupos funcionais na rede polimérica, atuando de forma semelhante ao sistema antígeno-anticorpo (PUOCI *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2008; KIRK *et al.*, 2009; BRAVO *et al.*, 2009; TARLEY *et al.*, 2005. O processo geral de síntese de um MIP, bem como seu mecanismo de atuação são mostrados na **Figura I.1**.



**Figura I.1**. Esquema representativo do processo de síntese de MIP (Adaptado de MAHONY *et al.*, 2005).

A síntese do MIP envolve primeiramente a complexação em solução de um molde com monômeros funcionais (MF), através de interações covalentes ou nãocovalentes, seguidos pela polimerização desses monômeros ao redor do molde na presença de um reagente de ligação cruzada (RLC), de um iniciador radicalar e de um solvente apropriado (PICHON & CHAPUIS-HUGON, 2008; ÁVILA *et al.*, 2008; JING *et al.*, 2009). Depois da polimerização, o molde é extraído da rede polimérica por meio da clivagem das ligações entre o molde e o polímero (utilizando um solvente adequado), deixando a impressão do molde na estrutura polimérica (PUOCI *et al.*, 2008; TARLEY *et al.*, 2005).

Em todos os processos de impressão molecular, inicialmente é feita a avaliação da estrutura da molécula que, de modo geral, é o analito de interesse. Com base nesta avaliação, é direcionada a escolha do MF, visando a formação de um complexo estável molde-MF. No entanto, para uma variedade de reações, nem todos os moléculas moldes são diretamente favoráveis ao modelamento. Em termos de compatibilidade com a polimerização, os moldes devem preferencialmente ser quimicamente inertes sob as condições de polimerização. Assim, se a molécula molde apresentar reações radicalares ou reações instáveis sob as condições da polimerização, estratégias de impressão alternativas devem ser pesquisadas. No momento da escolha da molécula que servirá de molde no preparo do polímero de impressão, deve-se verificar: (1) se o molde possui algum grupo funcional polimerizável; (2) se o molde possui grupos funcionais que podem inibir ou retardar potencialmente a reação de polimerização e (3) se o molde é estável a temperaturas moderadamente elevadas (por exemplo, em torno de 60 °C, para o caso de utilizar a 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) como iniciador químico) ou à irradiação UV (CORMACK & ELORZA, 2004).

Os MF são responsáveis pelas interações das ligações químicas nos sítios impressos e, para processos baseados nas interações não-covalentes, são normalmente usados em excesso em relação à quantidade de molde para favorecer a formação do complexo entre o molde e o MF. Uma relação de 1:4 de molde e MF são comuns para interações não-covalentes. É importante que seja possível combinar os grupos funcionais do molde com os grupos funcionais do monômero em

uma forma complementar, a fim de favorecer a formação do complexo, como também a impressão resultante (CORMACK & ELORZA, 2004). Assim sendo, moléculas-molde que possuem grupos funcionais básicos, interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, e vice-versa (TARLEY *et al.*, 2005). A escolha cuidadosa do monômero funcional é de suma importância para fornecer interações complementares com o molde e substratos (SPIVAK, 2005).

Existem vários MF com estruturas químicas e polaridades diversas disponíveis comercialmente e muitos outros podem ser sintetizados. A **Figura I.2** apresenta as estruturas químicas de uma seleção de MF.





Basicamente, duas principais estratégias para impressão molecular são estabelecidas, tendo como base se o molde está associado com os MF através de interações covalentes ou interações não-covalentes. Às vezes, uma impressão molecular baseada em interações semi-covalentes também pode ser utilizada.

Os procedimentos de síntese baseados nas interações não-covalentes são amplamente utilizados, porque são relativamente simples em termos experimentais e a etapa de complexação durante a síntese é alcançada misturando o molde com o MF em um solvente porogênico adequado. Depois da síntese, o molde é removido da matriz polimérica através de simples procedimentos de lavagem com um solvente ou mistura de solventes. A etapa de re-ligação do molde pelo MIP é realizada por interações não-covalentes (ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, eletrostática, hidrofóbica ou de transferência de carga entre o molde e o monômero funcional) (CARO et al., 2006). Todas essas características oferecem várias vantagens sobre os procedimentos baseados nas interações covalentes, em que a formação de ligações covalentes entre o molde e o MF é necessária antes da polimerização. Além disso, para extrair o molde da matriz polimérica após a síntese via interação covalente, é necessário romper essas ligações, que são reversíveis e lábeis. Para este fim, o polímero é então refluxado em uma extração com Soxhlet ou tratado com reagentes em solução. A interação semi-covalente é um híbrido das duas interações anteriores. Assim, são estabelecidas ligações covalentes entre o molde e o MF antes da polimerização, enquanto que, uma vez que o molde foi removido da matriz polimérica, a subseqüente re-ligação do analito pelo MIP ocorre por interações nãocovalentes (CARO et al., 2006).

Dos dois tipos de estratégias apresentadas, as interações não-covalentes tem sido mais amplamente utilizadas (DIÑEIRO *et al., 2006;* LIU *et al., 2007;* ZHANG *et al.,* 2008; FIGUEIREDO *et al.,* 2009), por três razões (SELLERGREN & ALLENDER, 2005; TAMAYO *et al.,* 2007; SPIVAK, 2005; YAN *et al.,* 2006):

• A interação não-covalente é mais fácil porque não exige etapas sintéticas em direção ao complexo pré-polimérico; interações entre monômeros funcionais e molde são facilmente obtidas quando todos os componentes estão misturados em solução.

• A remoção do molde é geralmente muito mais fácil; usualmente realizado por extração contínua.

• Uma maior variedade de funcionalidades pode ser introduzida dentro dos sítios de ligação do MIP usando métodos não-covalentes.

Dessa forma, os polímeros sintetizados através de interações não-covalentes, que também são utilizadas no processo de reconhecimento molecular, são os mais encontrados na literatura, correspondendo a cerca de 90 % dos trabalhos publicados (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Finalmente, comparada com os métodos covalentes, o não-covalente utiliza interações que são similares aqueles vistos em processos naturais, o que faz com que este método tenha maior aplicabilidade (YAN & RAMSTRÖM, 2005; QIAO *et al.* 2006).

Em um polímero impresso, o RLC cumpre três funções majoritárias. Primeiramente, é importante no controle da morfologia da matriz polimérica, a qual pode ser do tipo gel, pó macroporoso ou microporoso. Em segundo lugar, serve para estabilizar o sítio de ligação impresso e, finalmente, ele fornece a estabilidade mecânica à matriz do polímero. Muito foi descrito sobre o efeito do RLC sobre o comportamento de reconhecimento molecular de polímeros impressos, mas do ponto de vista da polimerização, proporções elevadas de RLC são geralmente preferidas visando a formação de materiais porosos (macroporosos), e a capacidade de gerar materiais com estabilidade mecânica adequada (CORMACK & ELORZA, 2004). Polímeros com razões de RLC em excesso de 80% são freqüentemente normais (CORMACK & ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005).

Um vasto número de RLC compatíveis com impressão molecular são conhecidos, muito dos quais estão comercialmente disponíveis. As estruturas químicas de alguns RLC são apresentadas na **Figura I.3**.



**Figura I.3.** Reagentes de ligação cruzada usados para impressão molecular: 1) *p*divinilbenzeno, 2) 1,3-diisopropenilbenzeno, 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 4) tetrametileno dimetacrilato, 5) N,O-bisacriloíla-L-fenilalaninol, 6) 2,6bisacriloilamidopiridina, 7) 1,4-fenileno diacrilamida (Adaptado de CORMACK & ELORZA, 2004).

A polimerização por radical livre é atualmente o método sintético mais importante usado para promover a conversão dos monômeros em polímero e é amplamente explorado na indústria para a produção, em larga escala, de um número elevado de plásticos comercialmente importantes. Um grande número de monômeros vinílicos pode ser polimerizado de forma muito eficaz, com excelentes rendimentos, pelo método de polimerização por radical livre. A polimerização por radical livre pode ser realizada sob condições amenas de reação (por exemplo, temperatura ambiente e pressão atmosférica), em *bulk* ou em suspensão, onde os grupos funcionais dos MF mantêm-se preservados e, também, o processo não é afetado pela presença de possíveis impurezas no meio reacional. São por estas

razões, bem como pelo fato de que muitos monômeros vinílicos estão disponíveis comercialmente a baixo custo, que a polimerização por radical livre é geralmente o método de escolha para o preparo de MIP (CORMACK & ELORZA, 2004).

A síntese do polímero deve ocorrer na presença de iniciadores radicalares, os quais sofrem quebra homolítica em sua estrutura, por radiação UV ou aquecimento, para gerar radicais que iniciam o mecanismo da reação de polimerização. Dessa forma, o mecanismo de polimerização por radical livre é caracterizado por três estágios distintos: (1) iniciação, (2) propagação e (3) terminação. Em uma polimerização típica por radical livre, a taxa de propagação (crescimento da cadeia) é geralmente muito mais rápida do que a taxa de iniciação. A fonte de radicais livres (iniciador) é normalmente ativo durante todo o processo de polimerização. Muitos iniciadores químicos com propriedades químicas diferentes podem ser usados como fontes de radicais em uma polimerização por radical livre. Normalmente esses são usados em baixas proporções quando comparados aos monômeros. A taxa e o modo de decomposição de um iniciador para seus respectivos radicais podem ser controlados, entre outros, por: temperatura, luz e processos químicos/eletroquímicos. Por exemplo, o iniciador AIBN pode ser convertido em radicais por fotodecomposição (UV) ou termodecomposição. A escolha do iniciador deve ser feita baseada nas propriedades físico-químicas da molécula molde. Se a molécula molde for fotoquimicamente ou termoquimicamente instável, iniciadores que podem reagir fotoquimicamente e termoquimicamente, respectivamente, não devem ser selecionados. Nos processos que a complexação é conduzida por ligações de hidrogênio, a polimerização deve ser feita a baixas temperaturas. Neste caso, iniciadores ativos fotoquimicamente são preferidos, pois são eficientes mesmo a baixas temperaturas (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY et al., 2005). As estruturas guímicas de alguns iniciadores de polimerização são mostradas na Figura **I.4**.



**Figura I.4.** Estruturas químicas de alguns iniciadores radicalares. 1) 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN), 2) azobisdimetilvaleronitrila, 3) dimetilacetil benzila, 4) benzoilperoxido, 5) 4,4'-azo-(ácido 4-cianovalérico) (Adaptado de CORMACK & ELORZA, 2004).

Vários estudos têm mostrado que a polimerização dos MIP a baixas temperaturas forma polímeros com maior seletividade em relação a polímeros sintetizados a altas temperaturas. Para polimerizar em temperaturas mais baixas é necessário empregar a polimerização por processo fotoquímico (SPIVAK, 2005). Mosbach *et al.* (1991) apresentaram um estudo sobre a enantiosseletividade de polímeros impressos usando como molécula molde a L-fenilalanina anilida. Um polímero foi obtido a 60 °C (KEMPÉ & MOSBACH, 1991) e outro foi sintetizado por processo fotoquímico a 0 °C (O'SHANNESSY *et al.*, 1989). O último processo resultou em um polímero de maior seletividade.

O solvente tem como principal função solubilizar todos os reagentes do processo de síntese do polímero impresso, isto é, a molécula molde, o monômero

funcional, o RLC e o iniciador. No entanto, cabe destacar que ele não deve interferir na interação molde-monômero funcional (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY et al., 2005). Além desta função, o solvente também é responsável pela criação dos poros nos polímeros macroporosos. Por este motivo é completamente comum referirse ao solvente como "porogênico". Quando polímeros macroporosos estão sendo preparados, a natureza e o nível do porogênico podem controlar a morfologia e o volume total do poro (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY et al., 2005; SPIVAK, 2005). As propriedades morfológicas de porosidade e de superfície são determinadas, dessa forma, pelo tipo de solvente porogênico, utilizado na polimerização. A porosidade resulta da separação de fases do porogênio e do crescimento do polímero durante a polimerização. Porogênios com baixa solubilidade de fase separam precocemente e tendem a formar poros maiores e materiais com áreas de menor superfície. Inversamente, porogênios com maior solubilidade de fase separam tardiamente na polimerização originando materiais com menor distribuição de tamanho dos poros e maior área de superfície (SPIVAK, 2005). Quando é utilizado um solvente termodinamicamente favorável, a tendência é produzir polímeros com estrutura de poro bem desenvolvida e com alta área superficial específica: ao contrário, utilizando um solvente desfavorável termodinamicamente. um polímero pouco poroso e com pequena área superficial específica é obtido, os quais apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular, devido basicamente à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos. Conclui-se, portanto, que aumentando o volume de solvente (porogênico), aumenta-se o volume dos poros (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY et al., 2005).

Além de seu duplo papel, como solvente e como um agente de formação de poros, na polimerização impressa não-covalente, o solvente deve ser escolhido com critério, para que ele possa maximizar a probabilidade da formação do complexo molde-MF. Normalmente, isto implica que solventes apolares e não-próticos, como por exemplo, tolueno e clorofórmio, são preferidos como solventes para estabilizar as interações ocorridas por meio de forças eletrostáticas e por ligação hidrogênio (TARLEY *et al.*, 2005; CORMACK & ELORZA, 2004).

Nesse sentido, para que os MIP apresentem características desejáveis no tocante à seletividade, é fundamental que haja um estudo apurado do tipo e/ou diferentes composições de solventes durante a síntese. As considerações mencionadas acerca do uso dos solventes no meio reacional apontam que aqueles com características apolares e com baixa constante dielétrica são os mais indicados para a síntese. Entretanto, cabe ressaltar que, como regra geral, após o preparo do polímero e a extração do analito da cavidade seletiva, o MIP resultante terá elevada afinidade pelo analito quando o mesmo estiver em um meio similar àquele empregado na síntese. Desse modo, o reconhecimento molecular de um MIP ocorre preferencialmente no mesmo meio reacional no qual foi sintetizado (TARLEY *et al.*, 2005).

A seletividade do MIP é também influenciada pelo tamanho do molde. Normalmente, uma molécula que possui grupos estéricos distantes da função orgânica do analito que se liga ao monômero produz polímeros pouco seletivos (TARLEY *et al.*, 2005). Isto foi verificado no trabalho de Martín-Esteban *et al.* (2001), que avaliaram o reconhecimento de vários agrotóxicos utilizando dois MIP sintetizados com isoproturon ou fenuron. De acordo com os resultados obtidos, o polímero impresso com isoproturon reteve em sua cavidade, além do molde, outros agrotóxicos contendo o grupo isopropil ligado ao anel aromático. Por outro lado, o MIP sintetizado com o fenuron foi capaz de reconhecer seletivamente apenas o fenuron na presença de outros compostos análogos.

Os primeiros relatos de impressão datam do início da década de 30, quando o químico soviético Polyakov (1931) preparou uma série de géis de sílica e observou que, quando preparadas na presença de um aditivo de solvente, a sílica resultante demonstrou capacidade de ligação preferencial para esse solvente. Em 1972, um grande avanço foi alcançado quando o grupo de Guenter Wulff relatou êxito no preparo de um polímero orgânico molecularmente impresso. Wulff usou o que hoje é chamado de "interação covalente" para preparar um polímero orgânico molecularmente impresso do ácido glicérico (WULFF & SARHAN, 1972). Posteriormente, por todos os anos das décadas de 70 e 80, o grupo de Wullf publicou vários artigos usando esse tipo de

interação. Um outro grande avanço no que diz respeito aos polímeros orgânicos impressos ocorreu em 1981, quando Mosbach e Arshady reportaram a obtenção de um MIP orgânico usando interações não-covalentes (ARSHADY & MOSBACH, 1981). Foi esse tipo de interação, baseado em uma metodologia simples e aparentemente trivial, que permitiu a expansão da impressão molecular durante os anos 90. Até os dias de hoje, as interações covalentes *versus* não-covalentes continuam em debate. No entanto, é geralmente aceito que há prós e contras em ambos os processos. Em 1995, Whitcombe *et al.* relataram uma interação intermediária que surgiria para combinar as vantagens das duas interações. Esta abordagem baseia-se na interação covalente durante a fase de polimerização associada à interações não-covalentes durante a fase de re-ligação (SELLERGREN & ALLENDER, 2005; ÁVILA *et al.*, 2008).

As vantagens dos MIP em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) incluem a facilidade de síntese, o baixo custo dos reagentes, a estabilidade por longos períodos de tempo, a resistência a condições drásticas, tal como altas concentrações de solventes orgânicos, elevadas temperaturas e pressões e a capacidade de reutilização do material após a limpeza do mesmo (ALIZADEH et al., 2010; JIANG et al., 2009; YANG et al., 2008; TARLEY et al., 2005; ÁVILA et al., 2008). Os MIP têm sido aplicados para separação de isômeros e enantiomêros (WU et al., 2009; YIN et al., 2005), como sensores bioquímicos (HENRY et al., 2008; PRASAD et al., 2009), na tecnologia de separação de membranas (WANG et al., 2008) e para análise de drogas (SUN et al., 2008). A extração em fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) é a área de aplicação mais explorada dos MIP. Segundo Jing et al. (2009), o método mais comum de preparo dos MIP é a polimerização em bulk onde, após a reação, o polímero obtido é triturado, resultando em pequenas partículas com impressão molecular, usualmente, na escala de micrômetros. Além da polimerização em bulk, temos o preparo dos MIP por polimerização em suspensão (JANTARAT et al., 2008), por expansão em multietapas (HAGINAKA et al., 2007), por precipitação (PUOCI et al., 2009), em suporte (LI et al., 2009), eletroquímica in situ (COBOS-MURCIA et al., 2005) e por sol-gel (FARRINGTON & REGAN, 2009; PICHON & CHAPUIS-HUGON, 2008).

O preparo de amostras é indispensável para a determinação de analitos em matrizes complexas (HAGINAKA, 2005). Para tanto, a SPE tem sido amplamente utilizada, pois permite a separação e concentração dos analitos alvo, assim como a remoção de interferentes das amostras. Tem sido amplamente aplicada na análise de produtos farmacêutico (PUOCI *et al.*, 2009), clínico (BRAVO *et al.*, 2009; JAVANBAKHT *et al.*, 2009), ambiental (CACHO *et al.*, 2009) e alimentos (YANG *et al.*, 2009; HAGINAKA, 2005). XU *et al.* (2010) sintetizaram um polímero de impressão molecular seletivo para ser utilizado como fase estacionária em procedimento de SPE para a determinação de resíduos do agrotóxico diclorvos em amostras de pepino e alface por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos (*High Performance Liquid Chromatography coupled Photodiode Array Detection*, HPLC-DAD).

Uma das principais desvantagens dos sorventes clássicos aplicados em SPE (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> e outros) é a falta de seletividade. Neste sentido, os novos sorventes, tal como os MIP e materiais imunossorventes, são alternativas promissoras em procedimentos de SPE.

A extração em fase sólida molecularmente impressa (*Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*, MISPE) apresenta a seletividade e sensibilidade adequadas de um mecanismo de reconhecimento molecular e o poder de resolução elevado dos métodos de separação (YANG *et al.*, 2009).

Um procedimento de MISPE funciona tal qual um procedimento de extração em fase sólida convencional, consistindo basicamente em quatro etapas: condicionamento do sorvente, percolação da amostra no material sorvente, lavagem e eluição dos analitos (TARLEY *et al.*, 2005).
### I.2 MODELAGEM MOLECULAR

### I.2.1 A QUÍMICA QUÂNTICA E OS MÉTODOS DE CÁLCULOS QUÂNTICOS

O objetivo central da química quântica é a obtenção de soluções da equação de Schrödinger para a determinação precisa de propriedades de sistemas atômicos e moleculares. Neste trabalho o enfoque é na obtenção de soluções para estados estacionários, e como a solução exata em geral não é factível, torna-se necessária a utilização de modelos aproximados. Dentre os diversos métodos usados hoje em dia, o mais popular é o método de *Hartree-Fock* (HF) que, além de fornecer uma boa solução aproximada para o problema de muitos elétrons, tem a vantagem de servir como um ponto de partida para outros métodos (MORGON & COUTINHO, 2007).

A necessidade de representar a estrutura da matéria no nível molecular levou ao desenvolvimento de uma nova área dentro da física e da química, conhecida como modelagem molecular (BRITO, 2008).

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (CARVALHO *et al.*, 2003).

A modelagem compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais. É usada para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Os métodos abrangem estudos de minimização de energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, entre outros e são aplicáveis desde átomos isolados a biomacromoléculas (BRITO, 2008).

Um trabalho de modelagem envolve basicamente três estágios:

• Selecionar um modelo que descreva com determinada precisão interações inter e intramoleculares de um sistema;

Realizar os cálculos;

• Analisar os resultados, validando ou rejeitando o modelo previamente escolhido (BRITO, 2008).

A priori são suportados por três variáveis a serem analisadas:

• O tamanho do sistema a ser estudado (em termos de número de átomos);

• A precisão requerida dos resultados (varia de acordo com o método escolhido para calcular determinada propriedade);

• O *custo* computacional e as condições de *hardware* utilizadas para realizar tais cálculos.

Além de fornecer dados estruturais, os cálculos teóricos são usados também com interesse químico e farmacológico, como para avaliar calores de formação de moléculas, distâncias interatômicas, energias eletrônicas de HOMO e LUMO, energias de ionização, densidades eletrônicas atômicas, cargas atômicas líquidas, ordens de ligação, momentos dipolo, entre outros (BRITO, 2008).

O grande desenvolvimento da modelagem molecular foi decorrente, em grande parte, ao avanço dos recursos computacionais em termos de *hardware* e *software*. No passado, a utilização da modelagem era restrita a um seleto grupo de pessoas que desenvolviam seus próprios programas. Atualmente não é mais necessário a um modelista compor seu próprio programa em virtude deles serem comercializados através de grandes companhias e até mesmo de laboratórios acadêmicos (BRITO, 2008).

Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser utilizado em uma determinada abordagem da modelagem molecular, e todas elas derivam de quatro princípios (SCOTTI *et al.*, 2007):

- Mecânica Molecular;
- Semi-Empírico;

- Ab initio;
- Teoria do Funcional da Densidade (*Density Functional Theory*, DFT).

Esse métodos diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, no conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados (SCOTTI *et al.*, 2007; FORESMAN & FRISCH, 1993):

*Mecânica Molecular:* São métodos empíricos baseados em valores experimentais e estão incluídos em programas computacionais tais como MM3, HyperChem, Quanta, Spartan e SYBYL, incluindo os campos de força MMFF e CHARMM. Esses métodos são utilizados para moléculas com até 100.000 átomos. De todos os diferentes métodos, é o que demanda menos tempo computacional.

Semi-empíricos: Estes métodos também são derivados da mecânicaquântica, mas não são totalmente teóricos. Estão incluídos em diversos pacotes computacionais de modelagem molecular, como Gaussian, Spartan e MOPAC, e incluem os Hamiltonianos AM1(*Austin Model 1*), PM3 (*Parametric Method 3*), entre outros. São utilizados para moléculas com não mais do que 1000 átomos e são imprecisos para determinados tipos de abordagens, como análises conformacionais. Um dos maiores problemas em que os métodos semi-empíricos falham é na reprodução de geometrias e energias de estruturas que apresentam ligações hidrogênio.

**Ab Initio:** Estes métodos são derivados da mecânica-quântica e estão incluídos em diversos pacotes computacionais de modelagem molecular, como Gaussian e Gamess, e incluem os conjuntos de bases STO-3G, 6-31+G\*, 6-311++G\*\*, entre outras. Esse método é puramente teórico, sendo utilizado principalmente para moléculas com no máximo 100 átomos. A sua desvantagem é o custo computacional (tempo longo para obtenção dos dados).

**DFT:** São métodos quânticos utilizados para investigar a estrutura eletrônica de vários tipos de conjuntos de sistemas, aonde se leva em consideração os efeitos de correlação eletrônica em seu modelo. Estão incluídos em pacotes de modelagem molecular, como Gaussian e HyperChem.

É importante ressaltar que todos os métodos possuem limitações e que cada um trabalha de forma distinta. Não existe um único método que possa ser aplicado a todas as situações. Cada um tem sua aplicação dentro da modelagem molecular.

### **1.2.2** TEORIA DO FUNCIONAL DA DENSIDADE

De acordo com Morgon e Coutinho (2007), a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) tornou-se, nas últimas décadas, um importante método para o estudo de estrutura eletrônica de sólidos e moléculas. Problemas que. tradicionalmente, eram tratados por métodos ab initio Hartree-Fock e pós Hartree-Fock são, agora, tratados utilizando-se a DFT, o que possibilita, em alguns casos, melhores acordos com os dados experimentais disponíveis. Parte desse atrativo da DFT está no fato de que sistemas, de tamanho moderado a grande ( $N_{\text{átomos}} \ge 20$ ), podem ser estudados, com uma precisão guímica aceitável, a um custo computacional que, algumas vezes, corresponde a uma fração daquele obtido utilizando métodos correlacionados tradicionais, como teoria de perturbação e coupled cluster. O desenvolvimento de funcionais de troca-correlação mais precisos e de algoritmos eficientes de integração numérica tem impulsionado o desenvolvimento desse método. A implementação eficiente de DFT em vários pacotes de cálculos e estrutura eletrônica, principalmente os não comerciais -GAMESS, NWCHEM e outros, contribuiu, de forma significativa, para a popularização e expansão do uso da DFT no estudo de problemas de interesse químico.

O desenvolvimento da metodologia computacional para fazer cálculos DFT leva, invariavelmente, as equações matemáticas semelhantes às equações Hartree-Fock. Porém, apesar da semelhança, os resultados de cálculos DFT devem ser interpretados à luz da DFT. Diferentemente de outros métodos, como métodos semiempíricos, que tentam, tanto quanto possível, se aproximar do método HF, a DFT relaciona-se com a solução exata do problema de muitos elétrons (MORGON & COUTINHO, 2007).

A DFT, implementada na grande maioria dos pacotes computacionais, tem sido utilizada como uma ferramenta alternativa dos químicos teóricos para calcular propriedades moleculares. Suas extensões – como DFT dependente do tempo (TDDFT) e propriedades magnéticas (deslocamentos químicos, constantes de acoplamentos spin-spin, ressonância paramagnética de elétrons) – têm sido desenvolvidas e utilizadas com relativo sucesso. No entanto, alguns autores, ainda no início do desenvolvimento da DFT, comprovaram que a densidade eletrônica, é uma guantidade fundamental e que, a partir de um formalismo DFT, é possível fornecer definições precisas de conceitos químicos que são usados, rotineiramente, há anos. Conceitos como os de eletronegatividade, potencial guímico, dureza, maciez, dureza local, principio da equalização da eletronegatividade, principio "ácidos e bases duros e macios" são alguns dos que são definidos e estabelecidos formalmente, o que permite, então, seu cálculo. Essa área da DFT, conhecida como DFT conceitual, tem atraído a atenção cada vez de mais pesquisadores. Esse esforço tem permitido desenvolver técnicas computacionais para realização do cálculo dessas propriedades, caracterizando, assim, a DFT como uma ferramenta capaz de estabelecer a ligação entre os resultados do cálculo guântico de sistemas químicos e as propriedades e conceitos químicos, facilmente digeríveis pelos químicos experimentais, em seus laboratórios (MORGON & COUTINHO, 2007).

Um conjunto de base é uma representação matemática de orbitais moleculares de uma molécula. Esse conjunto de base pode ser interpretado como restringindo cada elétron a uma região particular do espaço. Os cálculos de otimização de geometria e freqüências vibracionais são realizados, na maioria das vezes, empregando-se o conjunto de base 6-31G(d), que indica que essa base opera com funções *d* adicionados aos átomos pesados. Este conjunto de base é muito comum para cálculos envolvendo também sistemas de tamanho médios (FORESMAN & FRISCH, 1993). O B3LYP é um método híbrido que combina cinco funcionais: Becke + Slater + HF + LYP + VWN5 (MORGON & COUTINHO, 2007).

### I.2.3 MODELOS DE SOLVENTE

O meio aquoso pode mudar drasticamente as propriedades das moléculas. Propriedades eletrônicas importantes como, por exemplo, a hiperpolarizabilidade de dipolo, que é uma quantidade chave para dispositivos ópticos e para a fotônica, pode variar de mais de uma ordem de grandeza apenas com a mudança do meio solvente. O solvente também influencia bastante as reações químicas. Atuando na barreira de ativação, ele pode acelerar a reação por um fator de até 10<sup>15</sup>. A estabilidade relativa entre reagentes e produtos (constante de equilíbrio) pode ser bastante afetada, bem como a estrutura do estado de transição (MORGON & COUTINHO, 2007).

Várias maneiras diferentes de tratar o solvente foram desenvolvidas até hoje. A maioria dos diferentes métodos pode ser agrupada em dois tipos: (1) métodos baseados na descrição contínua do solvente, ou simplesmente modelos contínuos; e (2) métodos baseados na descrição atomística do solvente, ou modelos discretos. O presente trabalho é focado no primeiro caso (métodos contínuos) (MORGON & COUTINHO, 2007).

Nos modelos contínuos, o solvente é tratado como um material dielétrico, caracterizado por parâmetros macroscópicos, principalmente a constante dielétrica ( $\epsilon$ ). Todos esses modelos são baseados na equação de Poisson, que relaciona a distribuição de carga ( $\rho$ ), o potencial eletrostático ( $\emptyset$ ) em função do raio de hidratação (r) e a constante dielétrica ( $\epsilon$ ) (**Equação I.1**), onde  $\nabla^2$  é o operador Laplaciano (MORGON & COUTINHO, 2007):

$$abla^2 \phi(\mathbf{r}) = -rac{4\pi 
ho(\mathbf{r})}{\epsilon}$$
(Equação I. 1)

Nesses modelos, o soluto é colocado em uma cavidade ( $\epsilon$ =1) circundada por um dielétrico de constante  $\epsilon$ . Portanto, há duas regiões distintas para as quais a

equação de Poisson deve ser resolvida, e as condições de contorno usuais na superfície da cavidade devem ser satisfeitas (MORGON & COUTINHO, 2007).

Onsager, em seu trabalho seminal (que é também o sexto mais citado do Journal of the American Chemical Society), introduziu a idéia de *campo de reação*. Um dielétrico com cavidade esférica de raio *a*, na qual se encontra uma molécula cuja distribuição de cargas é representada pelo momento de dipolo ( $\mu$ ), é polarizado pelo campo elétrico desse dipolo. A distribuição de cargas no dielétrico resultante dessa polarização dá origem ao campo de reação mostra na **Equação I.2** (MORGON & COUTINHO, 2007):

$$\mathbf{R} = \frac{2(\varepsilon - 1)}{2\varepsilon + 1} \frac{\mu}{a^3}$$
(Equação I.2)

Esse campo é sempre paralelo ao momento de dipolo e, portanto, atuará no soluto aumentando a assimetria na sua distribuição de cargas. Se a molécula for apolar, então não há campo de reação e o campo elétrico sentido pelo soluto deve ser bastante reduzido. Contudo, a **Equação I.2** é uma aproximação que considera apenas o primeiro momento da distribuição de cargas (MORGON & COUTINHO, 2007).

O ponto forte dos modelos contínuos é que eles permitem um tratamento puramente quântico da interação soluto-solvente, pois tratam do solvente sem aumentar o número de elétrons explícitos. Outro ponto favorável aos modelos contínuos é que a perturbação provocada pelo solvente, a longas distâncias, pode ser bem representada por uma distribuição contínua de cargas (MORGON & COUTINHO, 2007).

A forma da cavidade é um problema que acomete os modelos contínuos já que poucas moléculas têm uma forma que possa ser considerada esférica ou elipsoidal. Esse problema pode ser resolvido fazendo com que a capacidade seja formada pela união de esferas centradas nos átomos do soluto. Dessa forma, a cavidade tem necessariamente o formato do analito. Entretanto, o tamanho dessas

esferas deve ser ainda sujeito a algum tipo de ajuste. Uma escolha natural seria utilzar os raios de Van der Waals de cada átomo. Mas na prática os raios ótimos a serem utilizados diferem de um método para outro (MORGON & COUTINHO, 2007).

O método mais popular dentre aqueles que utilizam esse tipo de cavidade é sem dúvida o Modelo Contínuo Polarizável (*Polarizable Continuum Model*, PCM). Esse modelo tem sido bastante utilizado e com relativo sucesso, principalmente para analise de propriedades que dependam pouco de interações específicas entre soluto e solvente (DIÑEIRO *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2008).

# I.2.4APLICAÇÃO DA MODELAGEM MOLECULAR NA SÍNTESE DEPOLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

A modelagem molecular tem sido amplamente utilizada para otimizar a composição dos polímeros de impressão molecular (DONG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2003; DIÑEIRO *et al.*, 2005, DIÑEIRO *et al.*, 2006; FARRINGTON & REGAN, 2007; CHIANELLA *et al.*, 2006; OKUTUCU & TELEFONCU, 2008).

A formação de um complexo entre o molde e os MF através de ligações de hidrogênio é o primeiro passo na preparação do MIP. O monômero que pode interagir com o molde mais intensamente dará o complexo mais estável. Isto facilitará as subseqüentes preparações, incluindo polimerização e formação da cavidade de uma estrutura complementar desta molécula molde (DONG *et al.*, 2005). Dessa forma, a seleção do MF mais adequado é um fator crucial no estudo do MIP (YAO, 2008).

Cálculos de DFT têm sido usados para selecionar, entre um conjunto de reagentes tradicionalmente utilizados na formulação de um MIP não-covalente, o melhor MF e solvente porogênico que possibilite um reconhecimento molecular mais seletivo para uma determinada molécula molde (DONG *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2007; DIÑEIRO *et al.*, 2005; DIÑEIRO *et al.*, 2006; KOWALSKA *et al.*, 2009). Até

recentemente, a modelagem molecular tem sido usada para estudar a interação do molde com MF e sua influência no reconhecimento molecular pelos MIP. Encontramse na literatura poucas referências em que se considera o efeito do solvente. Desse efeito espera-se que o mesmo afete significativamente a interação entre o molde e o MF, o comportamento adsortivo dos MIP em termos de capacidade e seletividade. Dong et al. (2007) usaram modelagem molecular para avaliar o efeito do solvente na seletividade do MIP. A diferença de energia da molécula no vácuo e em solução foi empregada para caracterizar a interação entre a molécula e o solvente. Para a molécula molde, um maior valor da diferença de energia indica uma interação mais forte entre o solvente e a molécula, o que dificulta o acesso à molécula molde pelo monômero e, consequentemente, leva a uma menor seletividade de adsorção pelo MIP. Portanto, o solvente a ser empregado na síntese do polímero não deve interagir fortemente nem com o monômero funcional nem com a molécula molde. Ainda, segundo Dong et al. (2007), a modelagem molecular das interações entre o solvente, o monômero funcional e a molécula molde pode auxiliar na escolha de um solvente apropriado, como uma aproximação complementar à seleção experimental.

### I.3 AGROTÓXICOS E CONTAMINANTES EM ALIMENTOS

Segundo a ANVISA, os agrotóxicos são produtos e agentes de processos químicos, físicos e biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais, de ecossistemas, de ambientes urbanos híbricos e industriais, cuja finalidade é alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-los da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (ANVISA, 2009).

A política de uma globalização mundial tem afetado fortemente o cenário da produção em todo o planeta. A necessidade de se manterem ou de se tornarem competitivos no mercado tem exigido que os países evoluam nas tecnologias de produção. Os artifícios lançados para se atingir tais objetivos têm despertado grande atenção da opinião pública frente aos acontecimentos envolvendo a contaminação de alimentos, como foi o caso de benzeno na água e sucos de frutas, nitrofuranos em carne de frango, cloranfenicol no mel, entre outros (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A utilização desses produtos químicos para controlar pragas, doenças e ervas daninhas possibilitaram ao ser humano aumentar a produção de alimentos em quantidade e qualidade. Estes produtos foram por muito tempo utilizados de forma indiscriminada, até surgirem algumas preocupações com os impactos ambientais causados pelo seu uso inadequado (PENTEADO, 2004).

O grande problema associado ao uso destes produtos é que os mesmos podem deixar resíduos em alimentos e no meio ambiente. Isto ocorre quando o produtor não respeita o período de carência entre a aplicação do produto e o cultivo, quando o produto é aplicado em uma dose acima da recomendada ou quando é utilizado em uma cultura para o qual não foi prescrito. Ainda, como agravante, existe o fato de que nem todos os agrotóxicos são rapidamente degradados (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Assim, a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos é uma fonte de sérios riscos à saúde do homem, não somente por causa da ingestão de uma grande quantidade do contaminante, mas também pela contínua exposição a pequenas doses de produtos tóxicos que estão relacionados a algumas doenças crônicas, como câncer e sérias disfunções hormonais (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Preocupada com a questão da saúde pública a ANVISA criou através da resolução - RDC Nº 119, de 19 de maio de 2003, o PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS – PARA, o qual visa avaliar a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos, verificando o respeito aos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos, bem como o emprego de boas práticas agrícolas, fazendo com que a ingestão diária aceitável (IDA) do

agrotóxico esteja dentro do estabelecido pelo programa. O LMR é expresso em mg kg<sup>-1</sup> e a IDA em mg kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo (ANVISA, 2009).

Usualmente, os contaminantes presentes em alimentos estão em baixos níveis de concentração (ng g<sup>-1</sup> ou  $\mu$ g g<sup>-1</sup>) e dispersos em uma matriz considerada complexa. Indubitavelmente, o preparo da amostra é fundamental para o sucesso do método analítico, já que os componentes do alimento podem interferir nas diversas etapas do método de análise, impedindo a exata determinação do(s) contaminante(s) de interesse (BAGGIANI *et al.*, 2007).

O tomateiro é uma das plantas hortícolas mais cultivadas no mundo todo. Seu fruto, o tomate, é amplamente utilizado na culinária e pertence à mesma família das batatas, do tabaco, dos pimentões e das berinjelas. Os tipos mais consumidos no Brasil são: italiano, carmem, andrea e debora. O tomate é uma das culturas mais importantes do Brasil, com uma produção anual estimada em 3 milhões de toneladas. Considerando que no fruto maduro 95% da sua constituição é água, apenas a pequena quantidade da matéria sólida determina a sua qualidade. Porém, aproximadamente 8% dessa matéria seca são minerais, o restante consiste em vários compostos carbônicos, metade dos quais são açúcares como a glicose, frutose e um oitavo de ácidos orgânicos, que contribuem com o típico sabor ácido/doce do fruto (CARVALHO *et al.*, 2005).

O cultivo convencional de tomate exige grande quantidade e variedade de adubos químicos e defensivos agrícolas, sendo que este último representa 17% do custo da produção (PENTEADO, 2004). Conseqüentemente, o uso dos agrotóxicos no tomateiro pode provocar contaminações do solo, águas e dos próprios frutos.

A contaminação dos frutos de tomates se dá predominantemente por resíduos de agrotóxicos que podem persistir como camadas superficiais depositadas no fruto. Alguns agrotóxicos podem penetrar na superfície do fruto, dissolver-se e mover-se para o interior, incorporando à polpa (BAGGIANI *et al.*, 2007).

Em 2008, o PARA monitorou 17 culturas, dentre elas o tomate. Foram analisadas 104 amostras de tomate. Os resultados demonstraram que 18,27% destas amostras estavam insatisfatórias, tanto pela presença de resíduos de

agrotóxicos acima do LMR, quanto pela presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para esta cultura; em 2007, esse valor era de 44,72%, o maior dentre as culturas monitoradas. Os resultados insatisfatórios demonstram que ainda há necessidade de se combater a prática de utilização de agrotóxicos não autorizados para a cultura, pois a maioria das amostras foi considerada insatisfatória devido ao uso não autorizado (ANVISA, 2008).

O método convencional usado no preparo de amostras visando a determinação de agrotóxicos em frutas e vegetais é baseado na extração líquidolíquido (*Liquid-liquid Extraction*, LLE) (MOL et al., 2003), seguido por etapas de limpeza (*clean up*). Entretanto, novas técnicas de extração têm sido aplicadas com a mesma finalidade, como extração em fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE) (NYAM *et al.*, 2010), microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) (SÁNCHEZ *et al.*, 2008) e extração em fase sólida (XU *et al.*, 2010). Outra metodologia muito empregada em análise de matrizes complexas é a dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) (LLASERA & REYES-REYES, 2009), pois agrupa em uma única etapa a amostragem, extração, *clean up* e a pré-concentração dos extratos (PINHO *et al.*, 2009; LLASERA & REYES-REYES, 2009).

A quantificação dos agrotóxicos normalmente é realizada por métodos cromatográficos.

### I.4 AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS

Agrotóxicos organofosforados são uma classe de agrotóxicos que geralmente atuam como inibidores das enzimas colinesterases e são usados para o controle de uma ampla gama de pragas em algodão, arroz, tabaco, sorgo, cana de açúcar e produtos hortícolas. No entanto, os agrotóxicos organofosforados são tóxicos para animais e seres humanos. Os agrotóxicos organofosforados variam muitos nas

propriedades físico-químicas como solubilidade em água, pressão de vapor, massa molecular e estabilidade térmica (ZHU *et* al., 2005; MOL *et* al., 2003).

Para Midio e Martins (2000), a grande desvantagem do emprego dos organofosforados consiste no alto risco de intoxicações a que estão expostos animais e seres humanos, exigindo, assim, medidas de proteção adequadas para seu uso, que nem sempre são tomadas.

A determinação dos agrotóxicos organofosforados em diversas amostras biológicas e de alimentos é normalmente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência ou gasosa acoplada a espectrometria de massas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos é, às vezes, utilizada como uma alternativa principal de análise (LLASERA & REYES-REYES, 2009). São exemplos de agrotóxicos organofosforados a fenitrotiona, parationa, metilparationa e fentiona.

A fenitrotiona (**Figura I.5**) é um agrotóxico organofosforado de caráter neutro amplamente utilizado na agricultura para controle de insetos mastigadores e sugadores de arroz, cereais, frutas, vegetais, grãos armazenados e algodão (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2005; UYGUN *et al.*, 2007). Sua persistência em ecossistemas florestais não é bem conhecida devido à dependência de vários fatores, tais como: a dose aplicada e a formulação, os parâmetros de aplicação, número de aplicações, as condições climáticas e as características da floresta (SÁNCHEZ *et al.*, 2008). A FNT é degradada no ambiente, principalmente através da hidrólise e reações fotoquímicas produzindo, como principais metabólitos o 3-metil-4-nitrofenol e fenitrooxon (SÁNCHEZ *et al.*, 2008). A FNT e/ou alguns metabólitos foram determinados usando técnicas como a cromatografia em fase gasosa (SÁNCHEZ *et al.*, 2008) e cromatografia líquida de alta eficiência (PEREIRA & RATH, 2009), onde a mesma apresenta propriedades tanto ácidas como básicas (anfótera).

O Comitê de Peritos da FAO/WHO sobre aditivos e contaminantes em alimentos (JECFA), estabeleceu um LMR para a FNT em tomate de 0,5  $\mu$ g g<sup>-1</sup> e uma IDA de 0,005 mg/kg p.c. (FAO, 2007).



Figura I.5. Estrutura da FNT.

Algumas propriedades químicas e físicas da FNT estão apresentadas na Tabela I.1.

 Tabela I.1. Classificação e propriedades químicas e físicas da FNT (INCHEM, 2010).

Nome Usual	O,O-dimetil O-(4-nitro-m-toluil) fosforotioato		
Nomes Comerciais	Sumition, Metatiom, Novatiom		
Classe	Inseticida e formicida		
Classificação Toxicológica	Classe II		
Massa Molecular	277,25 g mol <sup>-1</sup>		
Estado físico (25 ºC)	Líquido		
Ponto de fusão	0,3 °C		
Ponto de ebulição	145 ºC (1 mmHg)		
Densidade	1,33 g cm⁻³		
Estabilidade	Decomposto por calor em 145 °C		
	Água: 14 mg L <sup>-1</sup>		
Solubilidado	Álcoois, cetonas e hidrocarbonetos aromáticos: solúvel		
Solubilidade	Diclorometano: 1330 mg L <sup>-1</sup>		
	Hexano: 28 mg L <sup>-1</sup>		

### I.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O desenvolvimento de um método analítico ou a adaptação ou implementação de método conhecido, envolvem processos de avaliação que estime a sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação (BRITO *et al.*, 2003).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004).

No que diz respeito às determinações de contaminantes em alimentos, as técnicas cromatográficas de separação se destacam no âmbito analítico pela reconhecida capacidade de possibilitarem análises qualitativas e quantitativas. Métodos analíticos para resíduos de contaminantes tóxicos em alimentos requerem considerações técnicas especiais quando comparados a métodos delineados para outros fins. Os LMR para cada analito alvo devem ser levados em consideração no estabelecimento de um protocolo para validação da metodologia analítica a ser empregada na determinação desses resíduos nos alimentos (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos comumente utilizados são: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e exatidão (PASCHOAL *et al.*, 2008).

### I.5.1 SELETIVIDADE

A seletividade é a capacidade de um método quantificar com exatidão o analito na presença de interferentes presentes na amostra (THOMPSON, 2002). Esses interferentes podem ser substâncias quimicamente relacionadas com o analito, entre elas isômeros, metabólitos, substâncias endógenas, produtos de degradação, impurezas e outros.

A seletividade é um parâmetro que deve ser demonstrado e que depende do método analítico empregado. Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra. Para tanto, é conveniente a utilização de testes de pureza de pico com auxilio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas (PASCHOAL *et al.*, 2008).

### I.5.2 CURVA ANALÍTICA, LINEARIDADE E SENSIBILIDADE

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito, no qual o método pode ser aplicado. Segundo a ANVISA, a curva analítica representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (ANVISA, 2009). Alguns autores utilizam o termo curva de calibração; porém, uma vez que o termo calibração é mais pertinente para instrumentos de medição e padrões, o termo curva analítica será empregado para expressar a relação sinal (resposta) em função da concentração do analito (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A EC recomenda que no mínimo cinco níveis de concentração (incluindo a amostra zero) sejam empregados na construção da curva analítica na amostra. Ainda, estabelece que sejam descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e a regressão linear da curva (EC, 2002).

A linearidade é determinada pela habilidade do método em fornecer resultados que são diretamente proporcionais às concentrações do analito dentro da faixa linear da curva analítica. A linearidade da curva analítica deve ser maior do que 0,99 (EC, 2002; ANVISA, 2009).

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica. Visto que usualmente a resposta do sinal envolve unidades arbitrárias, a sensibilidade não é considerada um parâmetro de validação nas diretrizes oficiais da EC, FDA e ANVISA. No entanto, a sensibilidade é representada de forma indireta pela descrição da equação obtida através da regressão linear da curva analítica (EC, 2002).

### I.5.3 PRECISÃO

Segundo a IUPAC (THOMSON, 2002), a precisão corresponde ao grau de concordância de resultados de testes independentes obtidos sob condições estabelecidas. Para a validação de métodos em um único laboratório ("single-laboratory validation"), duas etapas são relevantes para esse parâmetro:

• Precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante uma única corrida analítica;

• Precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes corridas analíticas.

O resultado é dado em forma do coeficiente de variação (CV), expresso em porcentagem (**Equação I.3**) quando um número significativo de repetições é realizado (THOMSON, 2002).

$$CV(\%) = \frac{\text{estimativa do desvio padrão}}{\text{média das replicatas}} \times 100$$
(Equação I. 3)

A FDA e a ANVISA recomendam que os resultados não excedam 15% de CV (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20% do CV) (ANVISA, 2009; FDA, 2001).

Segundo a EC, a precisão é avaliada através de: repetibilidade; reprodutibilidade intra-laboratorial e da reprodutibilidade (EC, 2002).

Como critérios de aceitação a EC estabelece que o CV obtido para os ensaios inter-laboratoriais (reprodutibilidade) envolvendo repetidas análises com o material de referência ou amostra branco fortificada, não deve exceder o nível calculado pela Equação de Horwitz (**Equação I.4**) (EC, 2002):

$$CV = 2^{(1-0.5 \log C)}$$
 (Equação I. 4)

onde C é a concentração do analito expressa por unidade de massa.

A EC salienta ainda que a Equação de Horwitz não deve ser usada para estabelecer um parâmetro de CV para concentrações inferiores a 100 μg kg<sup>-1</sup>, uma vez que os valores seriam extremamente elevados, e que nesses casos, o CV deve ser tão baixo quanto possível (PASCHOAL *et al.*, 2008).

### I.5.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON, 2002). A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência ou bias).

Para os métodos destinados à análise de alimentos quanto à presença de resíduos de agrotóxicos, a exatidão tem sido avaliada costumeiramente mediante o teste de recuperação.

A porcentagem de recuperação é definida como a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada na fortificação, expressa através da equação **Equação I.5**:

 $\begin{aligned} Recupera \Tilde{ao}(\%) = \frac{Concentra \Tilde{ao} encontrada na amostra fortificada (\mu g g^{-1})}{Concentra \Tilde{ao} ao (\mu g g^{-1})} \times 100 \ (Equa \Tilde{ao} I.5) \end{aligned}$ 

A EC apresenta requerimentos mínimos para os valores de exatidão dos métodos quantitativos de análise de resíduos em alimentos, que variam conforme a concentração de interesse da substância alvo (**Tabela I.2**) (EC, 2002).

**Tabela I.2.** Exatidão mínima requerida para métodos quantitativos segundo a EC (EC, 2002).

Concentração do Analito	Variação na Exatidão
≤ 0,001 µg g⁻¹	- 50 a + 20 %
0,001 μg g <sup>-1</sup> até 0,01 μg g <sup>-1</sup>	- 30 a + 10 %
≥ 0,01 µg g⁻¹	- 20 a + 10 %

A FDA e a ANVISA recomendam que a exatidão seja determinada utilizandose três níveis de concentração, contemplando a faixa linear da curva analítica, realizando-se no mínimo cinco determinações por concentração. O desvio não deve exceder 15% exceto para o LOQ para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%. A ANVISA ainda recomenda que a exatidão seja determinada em uma mesma corrida (exatidão intra-corrida) e em corridas diferentes (exatidão inter-corridas) (FDA, 2001; ANVISA, 2009).

### I.5.5 LIMITE DE DETECÇÃO

Em termos gerais o limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser diferenciada, de forma confiável, do zero (THOMPSON, 2002) ou do ruído de fundo (ANVISA, 2009). De modo geral, o LOD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

Existem diferentes procedimentos para estimar o LOD, entre esses o método visual, razão sinal-ruído e a partir da curva analítica (PASCHOAL *et al.*, 2008). A ANVISA sugere apenas que o LOD deve ser estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, recomendando que o LOD seja 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base, no entanto, não fazendo referência se o estudo deve ser realizado com a matriz e o número de replicatas que devem ser realizadas (ANVISA, 2009).

A IUPAC recomenda que se estime o LOD a partir de pelo menos seis determinações independentes do analito na amostra branco ou em uma amostra contendo o analito em uma concentração baixa, no entanto, distinguível de zero ou resultado negativo, sendo o valor de LOD estabelecido pelo cálculo de três vezes a estimativa do desvio padrão das medidas (THOMPSON, 2002).

#### I.5.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

A definição segundo a IUPAC para o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Assim como ocorre para o LOD, existem diversas formas de se estabelecer o LOQ (THOMPSON, 2002).

Como na prática o LOQ deve corresponder ao primeiro nível de concentração da curva analítica, algumas agências reguladoras, ANVISA e FDA, têm substituído o termo LOQ por limite inferior de quantificação (LIQ ou *Lower Limit of Quantification*, LLOQ). É importante ressaltar para que o método seja aceitável para a determinação de resíduo de agrotóxicos em alimentos, o LOQ deve ser menor do que o LMR estabelecido para o analito (contaminante) em questão (PASCHOAL *et al.*, 2008).

# II. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi realizar estudos de modelagem molecular visando a otimização dos componentes de síntese de um polímero de impressão molecular altamente seletivo e com grande capacidade de reconhecimento molecular para ser empregado na extração em fase sólida, visando a determinação de fenitrotiona em tomate por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

### Os objetivos específicos compreenderam:

• Realizar estudos de modelagem molecular para selecionar o monômero funcional e o solvente porogênico que possibilite uma ligação mais forte e estável com a molécula molde.

• Sintetizar polímeros de impressão molecular através da técnica de polimerização em solução convencional (*bulk*), utilizando como molde a molécula da fenitrotiona, e o solvente e o monômero funcional indicados através dos estudos de modelagem molecular.

• Caracterizar os matérias sintetizados.

• Validar, através de estudos de adsorção, os resultados obtidos através dos cálculos de modelagem molecular.

• Verificar, através de estudos de adsorção e determinação eletroquímica da fenitrotiona, o meio de síntese e de reconhecimento molecular no qual as interações entre o agrotóxico e a cavidade seletiva do polímero são preferencialmente formadas.

• Ajustar as isotermas de adsorção ao modelo mais adequado para cada polímero.

 Avaliar a seletividade do polímero impresso da fenitrotiona frente a seus análogos estruturais através de cálculos de modelagem molecular e estudos de adsorção.

• Avaliar o polímero impresso como fase estacionária em cartuchos de extração de fase sólida.

• Avaliar a eficiência de extração de fenitrotiona em tomate.

• Validar um método para a determinação de fenitrotiona em tomate, usando a extração em fase sólida molecularmente impressa no preparo de amostras e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos.

# III. EXPERIMENTAL

### III.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

A síntese de MIP foi feita utilizando padrão de FNT (99%) ChemService (EUA), ácido metacrílico (MAA) ou ácido *p*-vinilbenzóico (ApVB) e etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) adquiridos da Fluka (EUA). O 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) foi gentilmente cedido pelos Professores Marco Aurélio Zezzi Arruda e Lauro Tatsuo Kubota do IQ-UNICAMP. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

As soluções da FNT foram preparadas sempre que necessário a partir de soluções estoque de 0,010 mol L<sup>-1</sup> preparadas em acetonitrila (ACN) grau HPLC, J. T. Baker (EUA), e/ou em tolueno grau PA, Synth, armazenadas em freezer (-18 °C) e protegidas de luminosidade.

As soluções tampão foram preparadas com reagentes de grau PA, utilizando água purificada por sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As correções de pH foram realizadas com soluções de NaOH e HCI. O ácido acético foi adquirido da Nuclear (Brasil). O monoidrogenofosfato de sódio foi adquirido da F Maia (Brasil), o ácido bórico da Merck (Alemanha) e o ácido acético da Nuclear (Brasil).

O tampão Britton-Robinson (BR), na faixa de pH entre 5 a 8, foi preparado pela dissolução de 1,15 mL de ácido acético, 1,23 g de ácido bórico, 1,15 mL de ácido fosfórico em 500 mL de água Milli-Q. O ajuste do pH foi realizado com solução de NaOH 0,02 mol L<sup>-1</sup>.

Para o estudo de seletividade do MIP, foram utilizadas soluções de metilparationa (MTP), parationa (PT) e fentiona (FT), todos de pureza 99% da marca ChemService (EUA), preparadas em ACN grau HPLC, J.T.Baker (EUA), e/ou em tolueno grau PA, Synth (Brasil). As soluções foram armazenadas em freezer (-18 °C) e protegidas de luminosidade.

A fase móvel utilizada para a determinação cromatográfica da FNT empregou metanol (MeOH) grau HPLC, Tedia (EUA) e água purificada em sistema Milli-Q da Milipore (EUA).

Para avaliação da eficiência de extração, foram utilizados os solventes diclorometano e *n*-hexano grau HPLC, Tedia (Brasil), acetona e éter de petróleo grau PA, Synth (Brasil). O cloreto de sódio utilizado foi da marca Merck (Alemanha).

### III.2 EQUIPAMENTOS

Os cálculos da modelagem molecular foram executados usando o programa computacional Gaussian03<sup>®</sup> em um computador Intel<sup>®</sup> Dual Core<sup>™</sup> Quad. As energias eletrônicas de ligação foram calculadas através do método DFT, usando o híbrido funcional B3LYP e o conjunto de base 6-31G(d). O efeito do solvente (energia de solvatação de cada espécie) foi estimado pelo Modelo Contínuo Polarizável (*Polarizabel Continuum Method*, PCM). As otimizações geométricas foram realizadas no nível B3LYP/6-31G(d).

As medidas eletroquímicas foram realizadas através de um potenciostato/galvanostato AUTOLAB<sup>®</sup> PGSTAT 30 (ECO CHEMIE, Holanda) utilizando o programa computacional GPES 4.0 para aquisição de dados. As determinações eletroquímicas da FNT foram feitas em uma cela convencional utilizando como eletrodo de trabalho o eletrodo de gota pendente de mercúrio (*Hanging Mercury Drop Electrode*, HMDE) (área 0,52 mm<sup>2</sup>), um eletrodo de referência de Ag/AgCI, KCI 3 mol L<sup>-1</sup> e um fio de platina como contra eletrodo.

O aquecimento do meio reacional para a síntese dos MIP foi realizado em uma chapa de aquecimento Fisatom (Brasil).

O ajuste do pH das soluções foi realizado em um pH-metro Digimed<sup>®</sup> DM-20 (Brasil).

A secagem do polímero foi feita em uma estufa Fanem<sup>®</sup> (Brasil), modelo 145.

A agitação das misturas da FNT e dos polímeros foi realizada em um agitador horizontal Fanem<sup>®</sup> (Brasil), modelo 315E.

As medidas de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C utilizando o Ângulo Mágico de Rotação e a Polarização Cruzada (*Cross Polarization Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Ressonance*, <sup>13</sup>C CP-MAS NMR) foram feitas em um equipamento Bruker Avance II<sup>®</sup> (Alemanha) de 300 MHz com tempo de contato de 4 ms, intervalo de repetição de 3 s e tempo de aquisição dos sinais de 50 ms.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FT-IR) foram feitos em pastilhas de KBr 1% no espectrofotômetro FT-IR Bomem<sup>®</sup> MB Series, (Canadá) modelo B100, em resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) as amostras foram depositadas em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um porta amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro até a espessura de 12 nm utilizando-se um metalizador MED 020<sup>®</sup> da Bal-Tec. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o Jeol LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV.

As medidas de área superficial dos polímeros foram executadas usando ensaios de adsorção de nitrogênio em temperaturas criogênicas, empregando o método BET (Brunauer, Emmet e Teller) e BJH (Barret, Joyner e Halenda) em um equipamento Quantachrome Analysis<sup>®</sup>. Este método consistiu na exposição de uma massa fixa dos polímeros impressos e não-impressos sintetizados tanto com os MAA como com o ApVB, a diferentes pressões de nitrogênio. Em seguida, a quantidade de gás adsorvido foi medida em função da pressão do mesmo. Foram então construídas isotermas de adsorção e dessorção que forneceram informações a respeito da área superficial, volume e diâmetro médio dos poros dos polímeros.

O procedimento de extração em fase sólida foi realizado com auxílio de uma câmara de vácuo com capacidade para 12 cartuchos, Altech<sup>®</sup> (EUA) acoplada a uma bomba de vácuo Fanem (Brasil). Foram utilizados cartuchos de SPE vazios J.T.Baker<sup>®</sup> (EUA) e frits de polietileno da Supelco<sup>®</sup> (EUA) para o empacotamento do polímero.

A homogeneização das amostras de tomate foi realizada em um homogeneizador Ultra-Turrax Ika<sup>®</sup> modelo T18 Basic (Alemanha).

A evaporação de solvente, quando necessário, foi feita em um rotaevaporador Büchi<sup>®</sup> (Suiça) a 45°C.

As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga Hettich<sup>®</sup> (Alemanha) modelo Rodofix 32A.

As determinações cromatográficas foram realizadas em um equipamento Waters<sup>®</sup> (EUA), constituído de um sistema de bombas binárias (modelo 1525), detector de arranjo de diodos Waters<sup>®</sup> 2996, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> (modelo 7725) e alça de amostragem de 50  $\mu$ L. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional Millenium<sup>32®</sup> 4.0 (Waters, EUA). A coluna cromatográfica empregada foi XTerra<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 200 x 3,9 mm com partículas de 5  $\mu$ m (Waters, EUA) e uma coluna de guarda de mesma fase estacionária. Todas as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,22  $\mu$ m da Millipore<sup>®</sup> (Brasil) antes das análises cromatográficas.

### III.3 PROCEDIMENTOS

### III.3.1 MODELAGEM MOLECULAR

A avaliação quantitativa da interação entre a molécula molde e cada MF, no vácuo e no solvente, pode ser realizada através dos valores de energia de ligação, bem como através dos valores de energia livre de Gibbs,  $\Delta$ G. Aqui, os resultados foram avaliados considerando-se os valores de  $\Delta$ G, uma vez que são mais abrangentes, pois envolvem os valores de entalpia ( $\Delta$ H), entropia ( $\Delta$ S) e temperatura (T).

A intensidade da interação molécula molde-MF foi estimada em termos de energia de Gibbs. Para obter o valor de energia de Gibbs, inicialmente foi feita a otimização da geometria de cada espécie, isto é, do molde, de cada MF e do complexo molde-MF (para cada monômero avaliado). O valor de energia obtido é a energia da espécie (E), que é obtido em Hartress e, para transformar em kcal mol<sup>-1</sup>, esse valor é multiplicado por um fator de 627,51. Depois de feita a otimização da estrutura de cada espécie foram realizados os cálculos de freqüências vibracionais de cada uma das mesmas espécies, onde foram obtidos os valores das energias térmicas e entropias eletrônicas, vibracionais, rotacionais e translacionais.

A energia térmica total (E<sub>T</sub>) de cada espécie é obtida através da Equação III.1:

$$\mathbf{E}_{\mathrm{T}} = \mathbf{E}_{0} + \mathbf{E}_{\mathrm{vib}} + \mathbf{E}_{\mathrm{rot}} + \mathbf{E}_{\mathrm{transl}} + (\mathbf{E} \times 627, 51) / \mathrm{kcal \ mol^{-1}} \qquad (\mathrm{Equa} \mathrm{c} \mathrm{\tilde{a}o} \ \mathrm{III.1})$$

onde:

E<sub>T</sub> é a energia térmica total da espécie (molde, monômero ou complexo);

**E**<sub>0</sub> é a energia eletrônica corrigida pela energia do ponto-zero (*Zero-Point Energy*, ZPE);

Evib é a energia térmica vibracional da espécie;

Erot é a energia térmica rotacional da espécie;

Etransl é a energia térmica translacional da espécie;

E é a energia da espécie otimizada.

A entropia total (S<sub>T</sub>) de cada espécie é obtida pela Equação III.2:

$$S_{T} = S_{elet} + S_{vib} + S_{rot} + S_{transl} / cal mol^{-1} K^{-1}$$
(Equação III.2)

onde:

**S**<sub>T</sub> é a entropia total da espécie (molde, monômero ou complexo);

Selet é a entropia da espécie;

Svib é a entropia vibracional da espécie;

Srot é a entropia rotacional da espécie;

**S**<sub>transl</sub> é a entropia translacional da espécie;

A energia térmica de cada espécie é uma forma de expressar a energia interna ( $\Delta U$ ). A energia interna da interação entre o molde e o monômero funcional é obtida pela **Equação III.3**:

$$\Delta \mathbf{U} = \mathbf{E}_{\mathrm{T_{complexo}}} - \mathbf{E}_{\mathrm{T_{molde}}} - \mathbf{E}_{\mathrm{T_{monômero}}} / \mathrm{kcal \ mol^{-1}}$$
(Equação III. 3)

onde:

 $\Delta \mathbf{U}$  é a energia interna da interação entre o molde e o monômero funcional avaliado;

 $\mathbf{E}_{T_{complexe}}$  é a energia interna do complexo molde-monômero funcional;

 $\mathbf{E}_{T_{molde}}$  é a energia interna do molde (FNT);

 $\mathbf{E}_{T_{monômero}}$  é a energia interna do monômero funcional avaliado.

O valor da entalpia ( $\Delta$ H) é obtido através da **Equação III.4**:

$$\Delta \mathbf{H} = \Delta \mathbf{U} + (\Delta \mathbf{n} \times \mathbf{R} \times \mathbf{T}) / \text{kcal mol}^{-1}$$
 (Equação III.4)

onde:

 $\Delta \mathbf{H}$  é a entalpia da interação entre o molde e o monômero funcional avaliado;

 $\Delta \mathbf{U}$  é a interação entre o molde e o monômero funcional avaliado;

 $\Delta \mathbf{n}$  é a variação do número de mols na interação;

N é a constante dos gases ideais;

T é a temperatura em Kelvin;

A entropia da interação entre o molde e o monômero funcional ( $\Delta S$ ) é obtida pela **Equação III.5**:

$$\Delta S = S_{T_{complexo}} - S_{T_{molde}} - S_{T_{monomero}} / cal mol^{-1} K^{-1}$$
(Equação III. 5)

onde:

 $\Delta S$  é a interação entre o molde e o monômero funcional avaliado;

 $S_{T_{complexe}}$  é a entropia complexo molde-monômero funcional;

 $S_{T_{molde}}$  é a entropia do molde (FNT);

 $\boldsymbol{S}_{T_{mon \hat{o}mero}}$  é a entropia do monômero funcional avaliado.

Finalmente, a intensidade da interação molde-monômero funcional é estimada através da **Equação III.6**:

$$\Delta \mathbf{G} = \Delta \mathbf{H} - \left(\frac{\mathbf{T} \times \Delta \mathbf{S}}{1000}\right) / \mathbf{kcal \ mol^{-1}}$$
(Equação III. 6)

### III.3.2 SÍNTESE DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

Para a síntese dos polímeros MIP e NIP foram utilizados os reagentes relacionados na **Tabela III.1**.

Polímero	Fenitrotiona (mmol)	Tolueno (mL)	Monômero * (mmol)	EGDMA (mmol)	AIBN (mmol)
MIP	0,5	3,0	2,0	8,0	1,2
NIP	-	3,0	2,0	8,0	1,2

 Tabela III.1.
 Quantidade de reagentes empregados na síntese dos polímeros.

\* ácido metacrílico ou ácido *p*-vinilbenzóico

Para a síntese do MIP foi empregada uma ampola de vidro (cilíndrica) com seção transversal circular de diâmetro igual 30 mm e altura de 200 mm. Em uma das extremidades o diâmetro da seção circular diminui para aproximadamente 5 mm com o objetivo de facilitar a vedação no momento da síntese. Nessa ampola foram adicionados 3 mL de tolueno, 2,0 mmol de monômero funcional e 0,5 mmol de FNT. A solução foi então homogeneizada. Posteriormente, foram adicionados 8,0 mmol de EGDMA e 1,2 mmol de AIBN. A solução foi purgada com nitrogênio por 10 min e o frasco foi selado e colocado em um banho-maria a 60 °C, por um período de 24 h. Após a completa polimerização, a ampola de síntese foi quebrada e o monólito retirado e triturado mecanicamente, empregando um almofariz. O sólido foi peneirado, usando uma peneira de malha de 0,075 mm. A remoção da FNT, bem como dos reagentes remanescentes da síntese foi feita mediante lavagem do monolito triturado com solvente. Para tanto, 500 mg de MIP foram inseridos em um cartucho de polipropileno com frits e várias porções do solvente (5 mL de MeOH: ácido acético, 9:1, v/v) foram percolados pela fase estacionária com auxílio de uma câmara de vácuo. O eluato foi monitorado por voltametria de onda guadrada (SWV) como descrito no item III.3.3 até não mais ser observado sinal analítico

inerente a presença de FNT. Por fim, o polímero foi mantido a 60 ºC em uma estufa por 12 h e estocado a temperatura ambiente em um dessecador sob sílica gel.

O polímero não-impresso (*non-imprinted polymer*, NIP) foi também sintetizado para ser empregado como controle, objetivando verificar a seletividade do MIP. A síntese deste polímero seguiu o mesmo procedimento da síntese do MIP, com exceção da adição da molécula molde ao meio reacional.

### III.3.3 DETERMINAÇÃO DA FENITROTIONA, PARATIONA, METILPARATIONA E FENTIONA POR VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

A determinação eletroquímica da FNT ou de seus análogos foi realizada por meio de um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada.

Além do eletrodo de trabalho de gota pendente de mercúrio, foram utilizados um eletrodo de referência de Ag/AgCl, KCl 3 mol L<sup>-1</sup> e um contra eletrodo de platina. Como eletrólito suporte foi empregado 10 mL de tampão acetato 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,75). As condições voltamétricas de determinação dos analitos foram:  $E_{inicial} = 0$  mV,  $E_{final} = -700$  mV,  $\Delta E_s = 4$  mV, a = 40 mV, f = 250 s<sup>-1</sup>, e v = 200 mV s<sup>-1</sup> (PEREIRA & RATH, 2009).

A quantificação da FNT e de seus análogos foi realizada mediante curva externa no intervalo de 0,5 a 3  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram desaeradas com N<sub>2</sub>, por cinco minutos, antes das análises.

### III.3.4 ESTUDO DO MEIO DE ADSORÇÃO E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A fim de escolher o meio que favorecesse a melhor adsorção da FNT pelo MIP, foram preparadas soluções da FNT 2,5 mmol  $L^{-1}$  em tolueno/ACN nas proporções 20:80, 50:50, 65:35, 80:20, 85:15, 90:10 e 95:5 (v/v).

O MIP e NIP previamente pesados (50 mg) foram transferidos para frascos com tampa e foram adicionados 3 mL da solução de FNT, preparada em cada mistura de solvente. Os frascos foram lacrados e agitados durante 24 horas em um agitador horizontal. Ao término deste período, alíquotas de 2 mL do sobrenadante foram coletadas, evaporadas, ressuspendidas em 2 mL de ACN e analisadas por Voltametria de Onda Quadrada (*Square Wave Voltammetry*, SWV), conforme descrito no *item III.3.3*.

Por fim, os polímeros utilizados durante o estudo foram lavados, com a mistura MeOH/ácido ácetico (90:10, v/v), secos e armazenados em um dessecador.

Para a construção das isotermas de adsorção, amostras de 50 mg dos MIP e/ou NIP foram agitados por 24 h com 3 mL da solução de FNT em tolueno:ACN (80:20, v/v) em dez níveis de concentração, variando na faixa de 0,5 a 7,5 mmol L<sup>-1</sup>. As alíquotas do sobrenadante foram analisadas por SWV, conforme descrito no *item III.3.3*. O ajuste dos modelos de adsorção foi realizado com auxílio do software Origin 8.

### III.3.5 Avaliação da Seletividade do MIP da Fenitrotiona Frente a seus Análogos Estruturais

A avaliação da seletividade foi feita mediante estudo de adsorção. Foram preparadas soluções de FNT, PT, MPT ou FT 2,5 mmol L<sup>-1</sup> em tolueno:ACN (80:20, v/v). Os estudos foram realizados usando o MIP e o NIP sintetizados com MAA e todas as análises realizadas em duplicatas. Para tanto, 50 mg do MIP ou do NIP foram adicionados de 3 mL de uma das soluções contendo FNT ou um de deus análogos. Os frascos foram lacrados e agitados durante 24 h em um agitador horizontal. Ao término deste período, alíquotas de 2 mL do sobrenadante foram coletadas, evaporadas, ressuspendidas em 2 mL de ACN e posteriormente analisadas por SWV, como descrito no *item III.3.3*.

## III.3.6 DETERMINAÇÃO DE FENITROTIONA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A determinação cromatográfica da FNT foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) associada ao detector de arranjo de diodos (DAD), empregando como fase estacionária uma coluna XTerra<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (200 x 3,9 mm, 5  $\mu$ m) e fase móvel de MeOH/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v). A quantificação foi realizada por padronização externa em 270 nm. A vazão foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 50  $\mu$ L.

As condições de separação cromatográfica foram avaliadas a partir dos parâmetros de conformidade do sistema, preconizando como sendo adequados ao objetivo do método as faixas de valores apresentadas na **Tabela III.2**.

**Tabela III.2**. Faixa de valores preconizados como adequados para os parâmetros cromatográficos (SHABIR, 2003).

Parâmetros	Valores Preconizados
Fator de Retenção (k)	1 < k < 10
Fator de Separação (α)	α > 1,1
Resolução (R <sub>s</sub> )	R <sub>s</sub> > 1,25
Número de Pratos (N)	N > 2000

Os valores dos parâmetros cromatográficos k e N da **Tabela III.2** foram baseados nas recomendações de SHABIR (2003). Com relação ao valor de  $\alpha$ , optouse por estabelecer apenas um valor mínimo para esse parâmetro, sem definir um limite superior como apontado por SHABIR (2003) (1,1 <  $\alpha$  < 1,4). Para o parâmetro R<sub>s</sub>, tomou-se como base que o valor superior a 1,25 é suficiente para fins quantitativos, conforme descrito por Ribani *et al.* (2004).
#### III.3.7 PREPARO DE AMOSTRA DE TOMATE

A uma guantidade de 5 g de amostra de tomate orgânico ou tomate orgânico fortificado, adquirido no Parque Ecológico de Campinas, SP, foi adicionada uma solução de extração contendo 1,5 g de cloreto de sódio + 10 mL de acetona + 10 mL DCM. A mistura foi triturada e homogeneizada em um sistema Ultra Turrax. Depois de sonicada, a mistura foi centrifugada (6400 g) por 20 min. A fase orgânica foi separada da fase aguosa e o solvente orgânico foi evaporado a um volume de aproximadamente 1 mL em um rotaevaporador a 45 °C e então concentrado à secura a 40 °C com auxílio de nitrogênio gasoso. O resíduo foi ressuspendido em 3 mL de solução tampão Britton Robinson (BR), pH 7,75/ACN (60:40, v/v) e a solução foi aplicada a um cartucho MISPE previamente condicionado (200 mg). Conforme otimizado por Pereira e Rath (2009), o MISPE foi condicionado sucessivamente com 10 mL de H<sub>2</sub>O/ácido acético (90:10 v/v), 10 mL de ACN, seco sob 10 min de vácuo (20 mmHg), 10 mL de *n*-hexano e seco por mais 10 min. Após o carregamento da amostra, foram aplicados 10 min de vácuo (20 mmHg). Em seguida, foi feita a lavagem do cartucho com 1 mL de tampão BR, pH 7,75/ACN (60:40, v/v). A eluição foi realizada com 3 mL de ACN/ácido acético (90:10, v/v). Os extratos obtidos foram concentrados à secura a 40 °C sob fluxo de nitrogênio e o resíduo foi ressuspendido em 1 mL de fase móvel. Depois de filtrado por um filtro de membrana de 0,22 µm, um volume de 50 µL foi injetado no sistema HPLC. Os cartuchos contendo o MIP como fase estacionária foram re-utilizados durante todos os estudos, onde o polímero, após o uso, era lavado com uma solução contendo MeOH/ácido acético (90:10, v/v) e depois com MeOH. Dessa forma, os polímeros não apresentaram efeito memória.

A quantificação da FNT foi realizada como descrito no *item III.3.6*. Um esquema geral, com apontamentos das principais etapas envolvidas no preparo de amostra é ilustrado pela **Figura III.1**.



**Figura III.1**. Esquema geral da etapa de preparo de amostra para a extração da fenitrotiona em tomate.

# III.3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO MISPE-HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE FENITROTIONA EM TOMATE

Para a validação do método MISPE-HPLC para a determinação de FNT em tomates foram avaliadas os seguintes parâmetros: *seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD)* e *limite de quantificação (LOQ),* baseada na Instrução Normativa nº 24 de 14 de Julho

de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, na ANVISA (2009) e na EC (2002).

## III.3.8.1 <u>CURVA ANALÍTICA, LINEARIDADE E SENSIBILIDADE</u>

A curva analítica foi obtida fortificando amostras branco de tomate em cinco níveis de concentração: 0,125; 0,250; 0,500; 1,000 e 2,000  $\mu$ g g<sup>-1</sup>.

A linearidade (coeficiente de correlação linear, r) e a sensibilidade (coeficiente angular) do método para a determinação de FNT foram obtidas através da curva analítica, bem como a faixa linear de trabalho.

#### III.3.8.2 <u>Seletividade</u>

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos na análise de amostras branco e para amostra branco fortificada com FNT (1,0  $\mu$ g g<sup>-1</sup>), com o objetivo de avaliar a eventual presença de interferentes da matriz que pudessem comprometer a determinação do agrotóxico.

#### III.3.8.3 <u>Precisão</u>

A precisão intra-ensaio foi obtida para três níveis de fortificação (0,250, 0,500 e 1,000  $\mu$ g g<sup>-1</sup>), mediante a fortificação de amostras branco de tomate, analisadas em quintuplicata (n=5), em um mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressas como o coeficiente de variação (CV).

A precisão inter-ensaios foi obtida para três níveis de concentração (0,250, 0,500 e 1,000  $\mu$ g g<sup>-1</sup>), mediante a fortificação de amostras branco, analisadas em

quintuplicata (n=5), em três dias diferentes (n=3), pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, e expressas como o coeficiente de variação (CV).

## III.3.8.4 <u>Exatidão</u>

A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação. Para tanto, amostras branco de tomate foram fortificadas com o analito em concentrações correspondentes aos níveis de concentração: 0,250, 0,500 e 1,000  $\mu$ g g<sup>-1</sup>, analisadas em triplicatas (n=3), e os resultados transformados em porcentagem da quantidade recuperada do analito.

## III.3.8.5 <u>LIMITE DE DETECÇÃO</u>

O limite de detecção do método para a determinação de FNT em tomate foi determinada a partir da razão sinal/ruído igual a 3, no seu tempo de retenção. Para tanto, foram fortificadas amostras branco de tomate com concentrações decrescentes de FNT.

#### III.3.8.6 <u>LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO</u>

O limite de quantificação para a FNT foi determinada a partir da razão sinal/ruído igual a 10. Para tanto, foram fortificadas amostras branco de tomate com concentrações decrescentes de FNT.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## IV.1 MODELAGEM MOLECULAR

O desafio de projetar e sintetizar um MIP pode ser uma tarefa complexa, especialmente por causa do grande número de variáveis experimentais envolvidas, como por exemplo: estrutura química do molde, propriedades físico-quimicas dos MF, tipos de reagentes e solventes, concentração dos reagentes, método de síntese, tempo de polimerização, entre outros.

A fim de entender as propriedades do MIP em nível molecular, o modelo dos complexos FNT-MF foram otimizados (YAO, 2008). Em um primeiro momento, foram realizados os cálculos de modelagem molecular para a molécula da FNT e para cada monômero funcional avaliado, sem levar em consideração o solvente na síntese, isto é, os cálculos foram executados no vácuo, a fim de verificar qual deles têm uma interação mais forte com a molécula da FNT, prevendo, assim, qual seria o monômero funcional mais apropriado para complexar-se com o molde no processo de síntese do MIP.

As estruturas dos monômeros avaliados estão apresentados na Figura IV.1.



Figura IV.1. Estruturas dos monômeros funcionais avaliados.

A estrutura da FNT revela dois sítios de ligações possíveis para a complexação com o monômero funcional: o *grupo NO*<sub>2</sub> (grupo nitro) e o *grupo* 

*fosforotioato*. Sendo assim, a interação nesses dois sítios foi considerado nos cálculos. O valor médio da interação FNT-MF está mostrado na **Figura IV.2**.



Figura IV.2. Valor médio de ∆G para a interação FNT-MF.

A energia mais favorável para a formação do complexo FNT-MF foi obtida para o ácido metacrílico (MAA). Isso se deve à presença do grupo carboxílico estericamente e eletronicamente mais favorável, formando ligações hidrogênio mais estáveis com o molde. Dessa forma, como observado também por Yao *et al.* (2008), o MAA é o monômero mais adequado para ser usado no preparo do MIP. A energia menos favorável para a formação do mesmo complexo foi obtida para o ácido *p*vinilbenzóico (ApVB). O ApVB apresenta maior impedimento estérico em relação ao MAA devido ao seu grupo benzil (mais volumoso) ligado ao grupo funcional carboxila.

A estrutura otimizada da interação FNT-MAA nos dois sítios de ligação da FNT é mostrada na **Figura IV.3**.



**Figura IV.3.** Estrutura otimizada da interação FNT-MAA, obtida através do programa computacional Gaussian03.

Uma vez selecionado o monômero funcional que interage mais fortemente com o molde, foi realizado um estudo de modelagem molecular com a finalidade de avaliar o efeito do solvente na interação entre o molde e o monômero funcional durante a complexação. De acordo com Dong *et al.* (2007), o solvente pode afetar significativamente na interação entre o molde e o MF.

As estruturas dos solventes avaliados e seus respectivos valores de constante dielétrica (ε) e de índice de polaridade (k') estão apresentados na **Figura IV.4.** 



**Figura IV.4.** Estrutura dos solventes avaliados com as respectivas constantes dielétricas ( $\epsilon$ ) e índices de polaridade (k') (a 25 °C).

A **Tabela IV.1** mostra os valores da energia de Gibbs da interação entre a FNT e o MAA no vácuo e considerando o solvente:

Tabela IV.1. Efeito do solvente na interação FNT-MAA.

Ambiente	G / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta \mathbf{G} / \mathbf{kJ} \mathbf{mol}^{-1}$
Vácuo	-2464,8	-
Tolueno	-2447,3	17,5
Diclorometano	-2433,6	31,2
Água	-2410,7	54,1

Uma modelagem mais realística dos sistemas de impressão molecular não deve incluir os efeitos do solvente. No entanto, a maioria das reações ocorre no solvente, o que leva a ter resultados diferentes dos previstos. O modelo de solvatação baseado no PCM mostrou-se flexível e preciso, em particular, pelo fato do

analito ser acomodado em uma cavidade molecular de forma realística (YAO *et al.*, 2008).

O procedimento de cálculo para se obter o valor de energia de Gibbs considerando o efeito do solvente é o mesmo que o descrito anteriormente (DFT). Entretanto, o método PCM leva em consideração a energia livre de Gibbs em solução como a soma de três termos: contribuições eletrostáticas e repulsãodispersão e energia de cavitação. Todos esses três termos são calculados através de uma cavidade definida pelas interligações esferas-van der Waals centradas nas posições atômicas (MORGON & COUTINHO, 2007).

A diferença de energia de Gibbs da interação FNT-MAA no vácuo e em solução ( $\Delta$ ) é empregada para caracterizar a interação entre a molécula e o solvente.

A magnitude de ∆G da interação FNT-MAA nos diferentes solventes, conforme apresentado na **Tabela IV.1**, mostra a seguinte ordem:

 $|\Delta G (Agua)| > |\Delta G (Diclorometano)| > |\Delta G (Tolueno)|$ 

Para o complexo molde-MF, um valor mais negativo de G indica um processo de complexação mais termodinamicamente favorável, onde o solvente interfere menos na interação entre o molde e o MF. Quanto maior for a magnitude mostrada na relação acima, maior é a interferência do solvente na formação da ligação hidrogênio que ocorre quando da interação do molde com o MF. Um solvente aceitável não deve interagir fortemente nem com o MF nem com o molde. Com isso, vemos que solventes próticos interferem na formação do complexo e, dessa forma, quanto menor for a constante dielétrica do mesmo, mais adequado ele é pra ser utilizado como porogênico na síntese de um polímero de impressão molecular. Segundo Dong *et al.* (2007), a modelagem molecular da interação molde-MF levando em consideração o efeito do solvente pode ajudar na escolha de um solvente apropriado, como uma aproximação complementar à seleção experimental.

Finalizando os estudos de modelagem molecular, foram realizados os cálculos para estimar a energia de interação da parationa, metilparationa e fentiona (análogos estruturais da FNT) com o MAA, que foi o mesmo MF utilizado na síntese do MIP da FNT. Este estudo serviu como suporte para o estudo de seletividade da FNT frente a esses análogos estruturais, que será tratado mais adiante.

A **Figura IV.5** mostra os valores de energia de Gibbs para a interação da FNT e análogos com o MAA no vácuo.





Da **Figura IV.5**, podemos inferir que a interação mais forte ocorre para o complexo formado entre a MPT e o MAA. Também, verificamos que as energias livres de Gibbs para os analitos avaliados são bem distintos um dos outros, com exceção da FT, onde a diferença em relação à FNT não é tão elevada como a dos demais análogos.

#### IV.2 SÍNTESE DO POLÍMERO DE IMPRESSÃO MOLECULAR

Segundo Chianella *et al.* (2002), o conceito básico de impressão envolve três estágios: (1) seleção dos componentes (molde, monômeros funcionais, reagente de ligação cruzada, iniciador radicalar e solvente); (2) formação do complexo molde-monômero funcional em solução e (3) processo de polimerização

A formação de um complexo entre o molde e o monômero funcional em um solvente porogênico é o primeiro passo no processo de impressão (DINEIRO et al., 2006). A natureza do molde e monômeros e a reação de polimerização determinam a qualidade e o desempenho do produto polimérico. Além disso, a quantidade e a qualidade dos sítios de reconhecimentos do MIP é uma função direta do mecanismo e extensão das interações molde-monômero funcional presente na pré-polimerização (OKUTUCU & TELEFONCU, 2008). O elemento crucial para o sucesso do procedimento de impressão molecular é a criação de um forte complexo entre o molde e o monômero funcional, cujo complexo deve ser preservado durante a etapa de polimerização. No entanto, devido à natureza exotérmica da reação de polimerização e às mudanças conformacionais dos monômeros e molde, é inevitável que alguma porcentagem do complexo pré-formado seja destruída e/ou modificado no polímero resultante. Desde que essas mudanças possam ser suficientemente minimizadas guando uma interação forte entre o molde e os MF é alcançada, a escolha do MF é de extrema importância (CHIANELLA et al., 2002). De acordo com Zhang et al. (2008), a força da interação entre o molde e o MF determina a precisão das cavidades de ligação e a seletividade no processo de reconhecimento molecular.

Os polímeros de impressão molecular foram sintetizados de acordo com as energias de interações previamente calculadas (*item IV.1*) para o complexo molde-MF obtidas através dos estudos de modelagem molecular. A energia mais favorável para a formação do complexo FNT-MF foi obtida para o MAA e, a menos favorável, foi obtida para o ApVB.

O MIP foi sintetizado por meio de interações não-covalentes, usando FNT como molde, MAA ou ApVB como monômero funcional, EGDMA como reagente de

ligação cruzada e tolueno como solvente porogênico. O mesmo procedeu-se para o NIP, com exceção da adição do molde na síntese. Tanto o MAA como o ApVB apresentam a possibilidade de interações por meio de ligações de hidrogênio entre o monômero e o molde a ser impresso.

Para uma impressão molecular não-covalente, as reações intermoleculares complementares entre o molde e o MF são um fator essencial na afinidade e seletividade subseqüente dos polímeros impressos. Polímeros preparados a partir de interações não-covalentes, freqüentemente apresentam diâmetro de partículas e sítios seletivos menos uniformes. No entanto, estas interações são mais facilmente formadas (TARLEY *et al.*, 2005).

As interações, no caso não-covalentes, são responsáveis pela formação do complexo molde-MF durante a síntese do MIP. Este complexo obedece ao princípio de Le Chatelier. Assim, quantidades superiores do monômero em relação ao analito (geralmente 4:1), devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, a fim de formar uma maior quantidade de complexos (CORMACK & ELORZA, 2004, TARLEY *et al.*, 2005; SPIVAK, 2005). A partir do mecanismo geral de formação dos sítios de ligação do MIP, a formação de cada "sítio de ligação" individual é atribuído a uma molécula molde individual que é rodeado pelos MF no complexo pré-polimérico.

A síntese dos polímeros foi realizada empregando-se uma relação FNT:MF na proporção de 1:4 de modo que todos os sítios disponíveis do molde participassem da interação com o monômero funcional, favorecendo a formação de sítios com alta afinidade e especificidade. A formação do complexo pré-polimérico pode ser favorecida aumentando a quantidade do MF ou a quantidade do molde, ou ambos. Entretanto, o incremento da concentração de MF resulta em uma igual diminuição da concentração de RLC. Por outro lado, o complexo pré-polimérico pode ser também favorecido pelo aumento da concentração do molde. Esta é uma perspectiva interessante porque a concentração do molde pode, em teoria, ser aumentada sem qualquer alteração na composição dos monômeros funcionais incorporados no polímero final. Isto ocorre porque o molde não é covalentemente incorporado dentro do polímero final e é removido no final do processo de impressão. Uma estratégia

então, para maximizar o complexo molde-MF é aumentar a concentração do molde o suficiente para conduzir o equilíbrio em direção ao complexo, mantendo a proporção entre o molde e o reagente de ligação cruzada em um valor ótimo de 4 (SPIVAK, 2005).

O processo de polimerização deve ser conduzido em atmosfera inerte pois o oxigênio dissolvido retarda a polimerização por radicais livres. A remoção do oxigênio dissolvido foi realizada por pelo uso de ultra-som e purga com gás nitrogênio antes do início da polimerização.

## IV.3 <u>DETERMINAÇÃO DA FNT, PT, MPT E FT POR VOLTAMETRIA DE ONDA</u> QUADRADA (SWV)

A determinação eletroquímica da FNT ou de seus análogos foi realizada por meio de um eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada.

A quantificação da FNT e de seus análogos foi realizada mediante curva externa no intervalo de 0,5 a 3  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram desaeradas com N<sub>2</sub>, por cinco minutos, antes das análises.

Voltamogramas típicos de onda quadrada referentes às concentrações de FNT são mostrados na **Figura IV.6**. Os voltamogramas para as os análogos apresentam o mesmo comportamento. Observa-se que a corrente de pico aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração e que ocorre um deslocamento do potencial de pico indicando a característica adsortiva do processo. A redução do grupo NO<sub>2</sub> à hidroxilamina da FNT e de seus análogos PT e MPT é irreversível nas condições avaliadas.

 $R - NO_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow R - NHOH + H_2O$ 



**Figura IV.6.** Voltamogramas de onda quadrada para FNT em diferentes concentrações. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol  $L^{-1}$  em pH 4,75,  $f = 250 \text{ s}^{-1}$ , a = 40 mV,  $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ .

#### IV.4 ESTUDOS DE ADSORÇÃO E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

## IV.4.1 ESTUDO DO MEIO DE ADSORÇÃO E CONSTRUÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Este estudo de adsorção foi realizado com o objetivo de estabelecer o meio em que ocorrerá a maior adsorção da FNT pelo MIP, avaliando assim a sua capacidade de reconhecimento molecular. Com isso, a adsorção do analito foi estudada em sete meios de polaridade diferentes, usando uma mistura de solventes tolueno:ACN em diferentes proporções.

A FNT nas soluções amostra foi determinada por voltametria de onda quadrada.

A quantidade de FNT adsorvida pelo polímero foi estimada através da **Equação IV.1**.

$$\mathbf{B} = \mathbf{I} - \mathbf{F}$$
 (Equação IV. 1)

onde:

**B** é a concentração de FNT adsorvida pelo polímero (mmol L<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>);

I é a concentração inicial da solução;

**F** é a concentração de analito livre (mmol L<sup>-1</sup>).

A porcentagem de FNT adsorvida foi calculada através da Equação IV.2.

$$FNT(\%) = \frac{B}{I} \times 100 \qquad (Equação IV. 2)$$

A Figura IV.7 Ilustra como ocorre o processo de adsorção. O polímero e o analito, presentes no mesmo frasco, são incubados e permanecem sob agitação por 24 h. No final, tem-se que uma quantidade de analito permaneceu livre em solução, em equilíbrio (**F**). Subtraindo da quantidade inicial do analito na solução, **I**, obtemos a quantidade de analito que foi adsorvido pelo polímero, **B** (concentração de analito adsorvido/g de polímero).



Figura IV.7. Esquema ilustrativo do procedimento de adsorção (Adaptado de GARCÍA-CALZÓN & DÍAZ-GARCÍA, 2007).

A **Figura IV.8** mostra a quantidade de FNT adsorvido pelos polímeros impresso e não-impresso nas diferentes porcentagens de tolueno da solução contendo ACN, bem como o coeficiente de seletividade relativo, β, que é calculado através da razão entre a quantidade de analito adsorvida pelo MIP e pelo NIP.



**Figura IV. 8.** Adsorção de FNT pelos polímeros MIP e NIP e valor do coeficiente de seletividade relativo nos meios estudados.

Como pode ser observada na Figura IV.8, entre 25 e 65% de tolueno em ACN, a adsorção de FNT no MIP não foi superior a 20%. Ainda, não houve uma diferença significativa entre a adsorção da FNT no MIP e NIP nestas condições. O MIP apresenta cavidades específicas, criadas pela polimerização em torno do complexo molde-monômero funcional e sítios não específicos de ligação, formados por grupos funcionais de moléculas do monômero funcional ou do reagente de ligação cruzada. Como estes sítios não específicos também estão presentes no NIP, o material reteve a FNT devido à capacidade de formação de ligações de hidrogênio com o mesmo. A presença dos sítios não específicos é justificada pelo excesso do monômero funcional empregado durante а síntese dos polímeros. Conseqüentemente, o excesso de monômeros livres, como ocorreu no caso da FNT, teve a desvantagem de possibilitar a formação de sítios não específicos de ligação, acarretando desta forma no surgimento de interacões não específicas em ambos os

polímeros, impresso e de controle (TAMAYO *et al.*, 2003; CARO *et al.*, 2006; CAI & GUPTA, 2004).

Diminuindo-se a polaridade do meio (80 a 90 % de tolueno) pôde-se verificar melhor seletividade na adsorção da FNT. No caso do MIP, a retenção do analito foi de 50%; em contrapartida, no polímero não-impresso, a retenção foi de apenas 10%. Esta diferença na adsorção da molécula pode ser explicada pelo efeito de memória do solvente. Segundo esta teoria, a adsorção de uma molécula é favorecida quando o ambiente de síntese é reproduzido (CAI & GUPTA, 2004). Como o MIP foi sintetizado em meio apolar, o reconhecimento molecular só foi possível quando a polaridade da solução tornou-se mais parecida com a condição de síntese do material.

Diminuindo ainda mais a polaridade do meio, percebe-se que a porcentagem de adsorção do MIP diminui. Embora o tolueno seja um solvente aprótico e, portanto, com baixa capacidade de formação de ligações de hidrogênio, a grande solubilidade da FNT neste meio pode ter sido responsável pela queda da adsorção do analito, chegando a um valor muito reduzido (aproximadamente 10%) quando em tolueno/ACN (95:5, v/v).

As isotermas de adsorção foram construídas para os polímeros sintetizados com o MAA e com o ApVB. Para tanto, a adsorção de FNT pelos polímeros foi estudada em dez diferentes concentrações, na faixa de 0,5 a 7,5 mmol L<sup>-1</sup>. As alíquotas do sobrenadante foram analisadas por SWV, conforme descrito no *item III.3.3*. O ajuste dos modelos de adsorção foi realizado com auxílio do software Origin 8.

A quantidade de FNT adsorvida pelos polímeros sintetizados com MAA e ApVB em função da concentração livre de FNT após o tempo de adsorção (24 h) estão mostradas na **Figura IV.9**, onde

$$B = \frac{\text{Concentração de FNT adsorvida}}{\text{Massa de polímero}} \times 1000$$
(Equação IV.3)

Um modelo de adsorção especifico, que apresenta uma relação matemática particular entre a concentração de FNT adsorvida pelo polímero (B) e a concentração de FNT livre na solução (F), pode ser usado para ajustar os dados experimentais ao modelo mais adequado. Essa relação matemática tem sua base nas suposições à cerca da composição física do sistema, especificamente o número de diferentes tipos de sítios de ligação no polímero e suas relativas populações (YAN & RAMSTRÖM, 2005).

A seleção do modelo de adsorção é primariamente baseado na sua habilidade em reproduzir precisamente a isoterma construída a partir de dados experimentais, onde este deve refletir a distribuição dos sítios ligados no sistema medido a fim de gerar parâmetros de adsorção reais. Em geral, as isotermas de adsorção podem ser classificadas em dois tipos: homogêneas e heterogêneas. Modelos homogêneos (modelos discretos) assumem que existe somente um tipo de sítio de ligação, considerando-os bem separados e caracterizados pela estequiometria 1:1, características que coincidem com o modelo de adsorção de Langmüir. O modelo de adsorção de Langmüir propõe um mecanismo de adsorção homogênea, assumindo a uniformidade da superfície do polímero e os sítios de ligação energeticamente idênticos. O segundo tipo são modelos heterogêneos (modelos contínuos) que assumem que o sistema tem dois ou mais diferentes tipos de sítios de ligação no polímero, onde os analitos podem ser adsorvidos pelos polímeros com estequiometrias diferentes de 1:1. Os modelos heterogêneos apresentam energia de distribuição para a adsorção dos sítios de ligação variando de forma exponencial, indicando que a adsorção das espécies em solução aumenta com o aumento da sua concentração, em sistemas suficientemente diluídos (UMPLEBY II et al., 2004).

Os modelos heterogêneos têm sido amplamente utilizados para caracterizar os polímeros de impressão. Apresentam características heterogêneas os modelos de Bi-Langmüir, Freundlich e Langmüir-Freundlich (UMPLEBY II *et al.*, 2004, YAN & RAMSTRÖM, 2005).

Para que pudesse ser feita uma avaliação de qual modelo de adsorção seria mais adequado para explicar os dados experimentais, foram plotados os gráficos log B *vs* log F para todos os polímeros (**Figura IV.9**):



Figura IV.9. Gráfico de log B vs log F para todos os polímeros.

Como pode ser verificado na **Figura IV.9**, as curvas plotadas apresentam duas regiões de comportamentos distintos. Para todos os polímeros, do primeiro ao oitavo ponto, ocorre uma adsorção crescente de FNT a baixas concentrações (região de sub-saturação), sendo uma região ajustada pelo modelo de Freundlich. A partir do oitavo ponto, observa-se uma saturação dos sítios de ligação (região de saturação), sendo uma região ajustada pelo modelo de RAMSTRÖM, 2005).

Como nenhum dos dois modelos pode, isoladamente, ajustar os dados experimentais de maneira adequada, as isotermas experimentais foram ajustadas pelo modelo de Langmüir-Freundlich (LF). Esse modelo tem a vantagem de modelar regiões de saturação e sub-saturação das curvas. Por esta razão o mesmo pode ser aplicado a qualquer tipo de polímero impresso que contenha sítios de ligação homogêneos e heterogêneos. Desta forma, este é o modelo universal para descrever o comportamento de adsorção nos polímeros impressos (RUSHTON *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2003)

O ajuste dos pontos de cada isoterma ao modelo LF foi feito através da **Equação IV.4**:

$$B = \frac{N_t A F^m}{1 + A F^m}$$
(Equação IV. 4)

onde:

Nt é o número total de sítios de ligação;

A é a média de afinidade de ligação;

**m** é o índice de heterogeneidade;

F é a concentração de analito livre.

A **Figura IV.10** mostra o ajuste da isoterma experimental obtida pelo MIP sintetizado com MAA pelo modelo de Langmüir-Freundlich e a **Tabela IV.2** apresenta os coeficientes de ajuste obtidos.



**Figura IV.10.** Isotermas de adsorção do MIP e NIP sintetizados com MAA ajustadas ao modelo de Langmüir-Freundlich.

Tabela IV.2. Coeficientes de ajuste ao modelo de Langmüir-Freundlich.

Polímero	N <sub>t</sub> / μmol g <sup>-1</sup>	A / mmol <sup>-1</sup>	m	R
MIP-MAA	103,35	0,354	0,68	0,999
NIP-MAA	19,502	0,353	0,548	0,995
MIP-ApVB	53,773	0,144	0,375	0,990
NIP-ApVB	17,828	0,161	0,300	0,999

Os resultados apresentados na **Tabela IV.2** mostram a grande diferença no valor do numero total de sítios de ligação entre os MIP e os NIP. De acordo com o valor de m, o MIP e o NIP sintetizados com MAA tem um apreciável caráter

homogêneo em relação aos sintetizados com ApVB. Quando m=1, o polímero é considerado homogêneo e quando m=0, o polímero é considerado heterogêneo (TAMAYO *et al.*, 2003).

## IV.4.2 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO ENTRE OS POLÍMEROS SINTETIZADOS COM OS MONÔMEROS MAA E APVB

Para fazer uma avaliação dos resultados teóricos obtidos pelos estudos de modelagem molecular da interação FNT-MF, foram realizados estudos de adsorção para o melhor monômero funcional (MAA) e para o pior monômero funcional (ApVB), evidenciados a partir dos cálculos de modelagem molecular (*item IV.1*) (**Figura IV.11**).



**Figura IV.11.** Adsorção de FNT pelos polímeros MIP e NIP dos monômeros funcionais MAA e ApVB e seus valores de coeficiente de seletividade relativos.

A **Figura IV.11** nos mostra a comparação entre a % de adsorção de FNT pelo polímero sintetizado com MAA e pelo polímero sintetizado com ApVB. O valor de β para o polímero sintetizado com MAA é de aproximadamente *8,4*, enquanto para o polímero sintetizado com ApVB é de aproximadamente *1,9*. Desta forma, os resultados teóricos são comprovados experimentalmente e, assim, podemos concluir que o polímero impresso utilizando o MAA como monômero funcional apresenta maior especificidade dos sítios seletivos no processo de reconhecimento molecular.

## IV.4.3 Avaliação da Seletividade do MIP da Fenitrotiona Frente a seus Análogos

A alta seletividade do MIP é atribuída à sua estrutura tridimensional e à adequada distribuição dos monômeros funcionais em posições estratégicas ao redor da molécula molde. Assim, torna-se necessário efetuar estudos que avaliem a retenção (no MIP) de moléculas estruturalmente semelhantes ao molde, com o objetivo de assegurar a efetiva seletividade do sítio específico de reconhecimento.

O sucesso da impressão molecular não pode ser avaliado exclusivamente pela habilidade do MIP de adsorver o molde, mas também na sua capacidade de discriminação entre moléculas análogas (KIRK *et al.*, 2009). Desse modo, o MIP deve apresentar uma alta adsorção do molde em relação ao NIP, bem como uma baixa afinidade pelos análogos.

A avaliação da seletividade do MIP frente à FNT foi realizada através de um estudo de adsorção, conforme realizado por Liu *et al.* (2007). No estudo de adsorção, foram avaliados os análogos estruturais parationa, metilparationa e fentiona, além do analito de estudo (FNT), conforme descrito no *item III.3.5.* O solvente empregado foi uma mistura de tolueno:ACN (80:20, v/v).

Para o estudo, foram avaliados três compostos análogos, que apresentam estrutura química semelhante à FNT, como mostrado na **Figura IV.12**.



Figura IV.12. Estrutura da fenitrotiona e de seus análogos estruturais.

A curva analítica utilizada no estudo da seletividade do MIP, obtida por SWV, foi linear no intervalo de 0,5 a  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, apresentando uma sensibilidade de 0,09229 A L mol<sup>-1</sup> e linearidade (r) 0,999. Todos os compostos avaliados sofrem redução no mesmo potencial e, apresentam a mesma resposta no eletrodo de mercúrio.

A porcentagem de FNT, PT, MTP e FT foi calculada conforme descrito anteriormente no *item IV.5.1*, empregando as **Equações IV.1** e **IV.2**.

Os resultados do estudo de adsorção para a seletividade são mostrados na Figura IV.13.



**Figura IV.13**. Adsorção de FNT e análogos pelos polímeros MIP e NIP e seus respectivos valores de coeficiente de seletividade relativo.

O polímero impresso MIP apresentou maior afinidade pela molécula da FNT do que pelas substâncias análogas, o que confirma seletividade ao material mediante estudo de adsorção.

A interação da FNT é significativamente maior com o MIP do que com o NIP, evidenciando a interação da FNT com sítios específicos do material sintetizado com a molécula molde.

A interação da molécula dos análogos com os polímeros impresso e nãoimpresso ocorre preferencialmente através de sítios não-específicos, uma vez que não há diferença significativa entre a quantidade adsorvida de FNT pelo MIP e NIP.

O NIP apresenta sítios de ligações não-específicos formados por grupos funcionais de moléculas do MF ou do RLC que foram empregados em excesso na síntese. Além do material reter a FNT devido à capacidade de formação de ligações de hidrogênio com o mesmo, reteve também os compostos análogos. O excesso de

monômeros livres teve a desvantagem de possibilitar a formação de sítios nãoespecíficos de ligação, acarretando desta forma no surgimento de interações nãoespecíficas, justificando assim a retenção dos análogos pelo NIP.

Os estudos de modelagem molecular da interação entre o analito (FNT, PT, MPT ou FT) e o ácido metacrílico podem ser utilizados para justificar a maior afinidade do polímero impresso pela molécula da FNT em relação aos seus análogos estruturais. A grande diferença no valor da energia de Gibbs, não sendo relevante a grandeza, indica que a retenção do analito nos sítios específicos é favorecida por substâncias que apresentam o mesmo valor de energia do analito utilizado como molde na síntese do polímero impresso, devido ao fato que fatores como tamanho da molécula, afinidade pelo monômero e geometria molecular estão envolvidos (WU *et al.*, 2005).

## IV.4.4 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO ENTRE OS POLÍMEROS SINTETIZADOS COM MAA EM DIFERENTES SOLVENTES

Uma vez selecionado o melhor monômero funcional (MAA), foram realizados estudos de modelagem com a finalidade de avaliar o efeito do solvente na interação FNT-MAA. Para fazer uma avaliação dos resultados teóricos obtidos pelos estudos de modelagem, o polímero sintetizado no presente trabalho utilizando como solvente porogênico o tolueno, foi comparado com os polímeros sintetizados por Pereira e Rath (2009), utizando os mesmos procedimentos de síntese, com exceção da utilização de DCM e ACN como solventes porogênicos. Dessa forma, uma comparação entre as percentagens de FNT adsorvidos pelos respectivos polímeros sintetizados em cada um dos solventes foi realizada através de estudos de adsorção, avaliando em qual solvente ocorre uma retenção mais seletiva da FNT (**Figura IV.14**):



**Figura IV.14.** Adsorção de FNT pelos polímeros MIP e NIP nos solventes avaliados e seus valores de coeficiente de seletividade relativo.

A interação entre o molde e o MF foi influenciada pelos porogênios com diferentes constantes dielétricas e capacidades de ligação hidrogênio, levando a diferentes afinidades e seletividades dos polímeros resultantes.

A **Figura IV.14** nos mostra a comparação entre a % de adsorção de FNT pelo polímero sintetizado com MAA nos diferentes solventes avaliados, sendo que dois deles foram avaliados pelos estudos de modelagem molecular. Como já era esperado pelos cálculos obtidos pela modelagem molecular, o tolueno ( $\epsilon$  = 2,38) apresentou um valor de  $\beta$  de 8,4, o diclorometando ( $\epsilon$  = 28,93) apresentou um valor de  $\beta$  de 4,1 e a acetonitrila ( $\epsilon$  = 36,48) apresentou um valor de  $\beta$  de 2,4.

De acordo com Kyzas *et al.* (2009), os MIP de modo geral demonstram um melhor desempenho em solventes orgânicos hidrofóbicos, como clorofórmio ou tolueno. Isto pode ser explicado pelo fato de que solventes apolares eliminam as interações hidrofóbicas não-específicas e criam um melhor ambiente para interações eletrostáticas as quais desempenham um importante papel no reconhecimento molecular. Conforme pode ser verificado na **Figura IV.4**, o solvente que apresenta

menor valor de ε e conseqüentemente apresenta maior caráter orgânico é o tolueno, o que condiz com os resultados acima explicitados (**Figura IV.14**).

## IV.5 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

Os materiais impressos altamente reticulados formados durante o processo de impressão molecular são parte de uma classe de materiais conhecidos como polímeros macroporosos. MIP são sólidos e, portanto, não podem ser caracterizados por métodos comumente empregados para caracterização de polímeros em solução, como por exemplo, cromatografia de permeação em gel e técnicas de RMN em solução. Além disso, devido ao fato dos MIP serem amorfos, métodos de microscopia ou de cristalografia não podem ser usados para determinar a estrutura dos sítios de ligação dos MIP, embora a microscopia tenha sido empregada na compreensão da morfologia macroscópica dos mesmos (SPIVAK, 2005). Portanto, há somente um número limitado de métodos de caracterização física direta para polímeros impressos. Estes incluem área superficial e medidas de porosidade, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear do estado solido e estudos de adsorção (CORMACK & ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005; KYZAS *et al.*, 2009).

## IV.5.1 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os espectros de FT-IR, obtidos em pastilhas de KBr, para o MIP e NIP utilizando o MAA como monômero funcional são mostrados na **Figura IV.15** e os espectros para o MIP e NIP utilizando o ApVB como monômero funcional são mostrados na **Figura IV.16**.



**Figura IV.15.** Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP utilizando o monômero funcional MAA.



**Figura IV.16.** Espectros de FT-IR (KBr) do MIP e NIP utilizando o monômero funcional ApVB.

As bandas dos espectros para o MIP e NIP estão descritas na Tabela IV.3:

**Tabela IV.3.** Bandas de absorção para os espectros de FT-IR do MIP e NIP (XU *et al.*, 2010).

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Banda
3580	Estiramento do grupo COOH monomérico
2986	Estiramento C-H
1733	Estiramento C=O do grupo éster e COOH
1639	Estiramento C=C (grupos vinila não-reagidos)
1400	Deformação angular C-O do grupo éster

Conforme demonstrado nas **Figuras IV.15** e **IV.16**, não são observadas diferenças em relação à composição química dos polímeros MIP e NIP. Isso ocorre porque ambos os materiais foram sintetizados da mesma forma, exceto pela adição do molde ao polímero não-impresso. Esse fato indica que a remoção da FNT da rede polimérica foi realizada com êxito e, desse modo, não houve incorporação da molécula à cavidade. A presença de bandas de estiramento do grupo O-H em 3580 cm<sup>-1</sup> indica a existência de grupos carboxílicos no polímero, atribuindo ao polímero a capacidade de poder formar ligações hidrogênio com o molde (DONG *et al.*, 2005).

O grupo NO<sub>2</sub> apresenta bandas de absorção intensas ente 1553 e 1347 referentes às deformações axial assimétrica e simétrica de grupo NO<sub>2</sub> ligado ao anel aromático da FNT.

## IV.5.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE <sup>13</sup>C COM POLARIZAÇÃO CRUZADA E ÂNGULO MÁGICO DE ROTAÇÃO

Uma medida quantitativa do total de ligações duplas que não reagiram em diferentes materiais impressos pode ser obtida diretamente por ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C. Todos os outros grupos funcionais de interesse que são à base de carbono, também podem ser quantificados usando esta técnica.

Para obter informações dos diferentes tipos de carbono encontrados nos polímeros impresso e não-impresso, foi utilizada a ressonância magnética nuclear do estado sólido, empregando a técnica de polarização cruzada com ângulo mágico de rotação (CP-MAS).

Os espectros para o MIP e NIP utilizando o ácido metacrílico como monômero funcional são mostrados na **Figura IV.17**:



**Figura IV.17.** <sup>13</sup>C CP-MAS NMR do MIP e do NIP utilizando o monômero funcional MAA.

Os espectros para o MIP e NIP utilizando o ApVB como monômero funcional são mostrados na **Figura IV.18**:



**Figura IV.18.** <sup>13</sup>C CP-MAS NMR do MIP e do NIP utilizando o monômero funcional ApVB.

A **Tabela IV.4** ilustra as ressonâncias apresentadas conforme mostrada pelas **Figuras IV.17-IV.18**.

**Tabela IV.4.** Ressonâncias apresentadas nos espectros do MIP e NIP (SPIVAK, 2005).

Deslocamento (ppm)	Ressonância
20-80	Grupos metila e metileno do EGDMA e MAA
100-130	Ligações duplas não reagidas do EGDMA
160-180	Grupos C=O no EGDMA e MAA

De acordo com o exposto acima e com os espectros do MIP e do NIP, podese reafirmar que os dois materiais, do ponto de vista de duplas ligações que não reagiram, são iguais.

## IV.5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As estruturas das partículas dos polímeros sintetizados com MAA e com ApVB foram estudadas por MEV.

Analisando as micrografias dos polímeros (**Figuras IV.19-IV.20**), nota-se a existência de apreciáveis diferenças na morfologia dos MIP e dos NIP. Para fins comparativos entre as morfologias dos mesmos, serão comparados apenas aqueles sintetizados usando como MF o MAA, pois o uso do ApVB como monômero na síntese gera polímeros com morfologias altamente irregulares. Então, analisando as micrografias da **Figura IV.19**, pode ser visto que a superfície do MIP apresenta uma estrutura mais regular que a do NIP.

A estrutura irregular do NIP pode ser justificada pelo fato de que sítios não específicos de ligação foram criados na matriz polimérica. A maior homogeneidade dos polímeros impressos pode ser justificada pela criação dos sítios seletivos de ligação, o que pode vir também a explicar a alta capacidade de adsorção seletiva dos MIP (YAO *et al.*, 2008)



Figura IV.19. Imagem de MEV do MIP (A) e NIP (B) sintetizado com o MAA (aumento de 30000 vezes).



**Figura IV.20.** Imagem de MEV do MIP (A) e NIP (B) sintetizado com o ApVB (aumento de 20000 vezes).
Analisando a **Figura IV.20**, vemos que o MIP apresenta-se como um material mais homogêneo em relação ao NIP. Mesmo sendo sintetizados com os mesmos componentes, exceto pela adição do molde, os polímeros impresso e não-impresso apresentam morfologias diferentes.

A diferença na porosidade dos materiais foi nítida. Conforme mostra a **Figura IV.21**, o MIP apresentou-se com um aspectos mais poroso do que o polímero nãoimpresso. De acordo com Farrington e Regan (2007), por causa desta característica os polímeros impressos possuem maiores áreas superficiais e volume de poros do que os polímeros não-impressos. A confirmação dessa hipótese está demonstrada no *item IV.5.4*.



Figura IV.21. Imagem de MEV do MIP (A) e NIP (B) sintetizado com o MAA (aumento de 50000 vezes).

#### IV.5.4 ESTUDOS DE POROSIMETRIA USANDO ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DO MÉTODO BET

A confirmação da diferença na porosidade dos materiais foi obtida através de ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio, empregando o método BET e BJH.

Uma isoterma de adsorção de nitrogênio típica está apresentada na **Figura IV.22**. As isotermas para todos os polímeros obtiveram um coeficiente de correlação superior a 0,999 e são caracterizadas como sendo do tipo II.



**Figura IV.22.** Isoterma de adsorção de nitrogênio pela técnica de BET para o MIP sintetizado com MAA.

Os valores de área superficial obtidos pela técnica BET e os valores de volume e tamanho médio dos poros obtidos pela técnica BJH para os polímeros sintetizados em MAA e em ApVB, no porogênico tolueno, estão apresentados na **Tabela IV.5**:

Polímero	Área Superficial m²/g	Volume do poro cm <sup>3</sup> /g	Diâmetro do poro nm
MIP-MAA	308,0	0,4	5,4
NIP-MAA	267,5	0,3	4,6
MIP-ApVB	96,7	0,1	4,5
NIP-ApVB	86,6	0,09	4,4

Tabela IV.5. Porosimetria dos polímeros sintetizados com MAA e ApVB, em tolueno.

Como pode ser verificado, o tamanho dos poros é maior no MIP do que no NIP, certamente devido à presença da molécula de FNT quando da síntese do mesmo (FARRINGTON & REGAN, 2007). Também, não foi observado grande variação no volume e diâmetros médios entre os MIP e NIP para cada MF, pois todos foram sintetizados com a mesma quantidade de um mesmo solvente porogênico, o tolueno.

A morfologia dos MIP, mostrado na **Figura IV.23**, é caracterizado, de modo geral, a partir de núcleos que se formam em torno do iniciador que cresce entre 10 e 30 nm de diâmetro e, em seguida, se agrega a outros núcleos para formar microesferas com diâmetros entre 100 e 200 nm. Essas microesferas agregam-se a grupos maiores (clusters), formando o corpo do polímero. A porosidade e área superficial resultantes nos MIP são originados a partir de vazios irregulares localizados entre os clusters das microesferas (macroporos, que apresentam diâmetro superior a 50 nm), ou a partir do espaço intersticial de um determinado cluster de microesferas (mesoporos, que apresentam diâmetro entre 2 e 50 nm), ou mesmo dentro das próprias microesferas (microporos, com diâmetros inferiores a 2

nm). Os valores típicos para a área superficial de polímeros impressos estão na faixa de 100 a 400 m<sup>2</sup>/g. Para a distribuição de tamanho dos poros, há tanto macroporos e mesoporos na faixa de 2 a 100 nm, e microporos de 0,6 a 2 nm de diâmetro (FARRINGTON *et al.*, 2006).

De acordo com os dados experimentalmente obtidos, todos os polímeros podem ser considerados como mesoporosos, uma vez que apresentam uma área superficial entre 10 e 500 m<sup>2</sup>/g e poros com diâmetro médio de 2 e 50 nm.



**Figura IV.23.** Modelo da formação morfológica dos poros da rede polimérica dos polímeros de impressão molecular (Adaptado de SPIVAK, 2005).

#### IV.6 DETERMINAÇÃO DE FNT POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

No intuito de avaliar o MIP no processo de preparo de amostra de uma matriz complexa, o MIP-MAA foi empregado na determinação de resíduos de FNT em tomate. A determinação cromatográfica da FNT foi realizada por HPLC empregando como fase estacionária uma coluna XTerra<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (200 x 3,9 mm, 5  $\mu$ m) e fase móvel de MeOH/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v). A quantificação foi realizada em 270 nm (detector DAD). Nessas condições, a FNT apresentou um tempo de retenção (t<sub>R</sub>) de 4,8 minutos.

Um cromatograma característico de uma amostra branco (tomate sem FNT) e de uma amostra fortificada com 1,0  $\mu$ g g<sup>-1</sup> de FNT, após extração usando MISPE (usando o polímero MIP) são mostrados na **Figuras IV.24 A** e **B**, respectivamente.



**Figura IV.24.** Cromatograma da amostra de tomate, após o MISPE. Fase estacionária: XTerra<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, fase móvel: MeOH/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v),  $\lambda$  = 270 nm, vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>: A) Amostra branco; B) Amostra branco fortificada com 1,00 µg g<sup>-1</sup> de FNT (tempo de retenção, t<sub>R</sub>, da FNT nas condições acima: 4,8 minutos).

Conforme pode ser visto nos cromatogramas da **Figura IV.24** não existem compostos interferentes eluídos no tempo de retenção ( $t_R$ ) da FNT.

A **Tabela IV.6** discrimina os parâmetros de conformidade do sistema obtidos para as condições selecionadas.

Parâmetros	Valores Obtidos	
Fator de Retenção (k)	1,40	
Fator de Separação (α)	1,20	
Resolução (R <sub>s</sub> )	1,80	
Número de Pratos (N)	3815	

 Tabela IV.6.
 Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico obtidos.

Os valores para os parâmetros cromatográficos apresentados na **Tabela IV.6** foram obtidos através do programa *System Suitability* (software Millennium 3.2, Waters, EUA), e os resultados indicam que as condições estabelecidas são consideradas adequadas para os objetivos a que se propõe o método conforme previamente descrito no *item III.6*. Os valores de  $\alpha$  e R<sub>s</sub> foram calculados para a FNT e o pico adjacente de menor tempo de retenção.

#### IV.7 CONDIÇÕES DO MISPE E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DE FNT

O MIP sintetizado em MAA e tolueno foi introduzido em cartuchos de extração em fase sólida e o MISPE resultante foi avaliado no preparo de amostras de tomates (etapa de *clean-up*), objetivando a determinação de FNT por HPLC. A fim de otimizar as condições experimentais da extração da FNT no tomate antes do método MISPE, cinco diferentes soluções de extração (**Tabela IV.5**) foram previamente testadas e avaliadas, baseadas no fato da FNT apresentar elevada solubilidade em solventes

orgânicos quando comparada a meio aquoso. Para tanto, foram usadas amostras branco de tomate fortificadas com FNT ao nível de 1,00  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. O procedimento de preparo de amostras empregado foi aquele descrito no *item III.3.7*, onde as etapas de condicionamento, de lavagem e de eluição foram adaptadas do trabalho realizado por Pereira & Rath (2009).

O procedimento de MISPE consistiu na percolação da amostra no material sorvente disposto em cartuchos, onde o analito de interesse ficou retido nas cavidades seletivas do MIP. Em seguida, ao se empregar amostras de tomate, fez-se necessário efetuar uma etapa de limpeza com uma solução adeguada, no intuito de remover as espécies interferentes ligadas ao polímero por interações nãoespecíficas. Nesta etapa, a espécie de interesse não deve ser co-eluída. As interações não-específicas formadas durante a síntese, responsáveis pela retenção das espécies interferentes no MIP são originadas devido ao excesso de monômeros no meio reacional. Sendo assim, na extração em fase sólida normalmente é realizada uma etapa de limpeza também conhecida como etapa de lavagem, a fim de extrair os interferentes retidos nos sítios não específicos. A etapa final foi efetuada mediante a eluição do analito na ausência dos interferentes matriciais. Nestes procedimentos, etapas de *clean up* e de pré-concentração foram executadas simultaneamente, o que confere também aos MIP características de materiais concentradores. Depois do processo MISPE, os polímeros foram lavados com metanol.

Os valores da eficiência de extração foram calculados a partir de uma curva analítica externa obtida para cinco níveis de concentração de FNT em solvente. A curva analítica apresentou uma faixa linear de 1-100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, linearidade de 0,999 e sensibilidade de 99888 uA mL  $\mu$ g<sup>-1</sup>.

A eficiência de extração, expressa através da percentagem de recuperação nos cinco meios de extração, estão apresentados na **Tabela IV.7**.

98

**Tabela IV.7**. Soluções empregadas e eficiência de extração obtido na determinação de FNT em amostras branco de tomate fortificadas (nível de fortificação: 1,0 μg g<sup>-1</sup>).

	Soluções	Recuperação (%)
1	6 mL Acetona + 20 mL DCM/éter (1:1, v/v)	35
2	1,5 g NaCl + 10 mL acetona + 10 mL DCM	96
3	2 mL Acetona + 23 mL n-hexano	61
4	20 mL Acetato de etila + 5 mL DCM	41
5	10 mL Tampão BR pH 7,75/ACN (60:40, v/v) + 5 mL ACN	71

A maior eficiência de extração foi àquela em que a solução de extração continha o sal cloreto de sódio (solução 2). A FNT é completamente solúvel em acetona e parcialmente solúvel em DCM. A FNT apresenta um coeficiente de distribuição baixo entre um solvente orgânico e água (proveniente da matriz). A adição do sal cloreto de sódio fez com que a FNT se distribuísse majoritamente no solvente orgânico (efeito *salting out*), justificando, assim, a elevada percentagem de recuperação na solução em questão, quando comparada com as demais soluções.

### IV.8 <u>VALIDAÇÃO DO MÉTODO MISPE-HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE FNT</u> <u>EM TOMATE</u>

Uma vez otimizado o procedimento de preparo de amostras, usando o MIP, o método (MISPE-HPLC-DAD) foi validado para a determinação de resíduos de FNT em tomate. O procedimento envolvido no presente trabalho teve como foco a validação do método analítico para um laboratório (*single-laboratory validation*). O procedimento empregado está detalhado no *item III.3.8* e foi baseado na Instrução

Normativa nº 24 de 14 de Julho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

Os parâmetros analíticos de validação usados para avaliar o método foram: seletividade, faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão (intra- e inter-dias), exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Os resultados estão apresentados na Tabela IV.8.

A faixa linear foi entre 0,13 a 2,0 µg g<sup>-1</sup> com uma linearidade de 0,9989. A seletividade do método foi avaliada no presente estudo pela comparação dos cromatogramas obtidos para amostras branco de tomate e amostras branco fortificadas com FNT, conforme **Figuras IV.24 A** e **B**, através das quais pôde-se evidenciar que não co-eluem compostos endógenos do tomate próximos ao tempo de retenção da FNT.

A precisão intra- e inter- dias foram avaliadas usando amostras branco de tomate fortificadas em um e três níveis de fortificação, respectivamente. Os níveis de fortificação representam meio, uma e duas vezes o LMR. Os resultados expressos como coeficiente de variação (CV) estão mostrados na **Tabela IV.8** e são todos menores ou iguais a 8,1%. Esses valores são adequados ao objetivo que o método se propõe, uma vez que são menores do que 15%.

A exatidão do método foi avaliada mediante testes de recuperação, com amostras branco de tomate fortificadas com FNT a 0,250; 0,500 e 1,000  $\mu$ g g<sup>-1</sup>, analisadas em triplicatas (n=3). Os valores da exatidão ficaram entre 89 e 98 % e estão dentro da faixa considerada adequada.

O limite de detecção e quantificação foram 0,05  $\mu$ g g<sup>-1</sup> e 0,13  $\mu$ g g<sup>-1</sup>, respectivamente, estabelecido a partir da razão sinal/ruído igual a 3 e 10, no tempo de retenção da FNT.

O limite de quantificação está em concordância daquele proposto pelo método, isto é, menor que o LMR (0,5  $\mu$ g g<sup>-1</sup>).

A **Tabela IV.8** mostra os valores dos parâmetros de validação do método MISPE-HPLC:

100

Parâmetros de Validação	Resultado			
Faixa linear (μg g <sup>-1</sup> )	0,13 - 2,00			
Linearidade	0,9989			
Sensibilidade (uA g μg <sup>-1</sup> )	403930,5			
Precisão Intra-ensaio (CV, %)				
0,250 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=5)</i></b>	2,9			
0,500 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=5)</i></b>	7,0			
1,000 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=5)</i></b>	4,0			
Precisão Inter-ensaio (CV, %)				
0,250 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=3)</i></b>	7,1			
0,500 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=3)</i></b>	8,1			
1,000 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=3)</i></b>	3,7			
Limite de Detecção (µg g <sup>-1</sup> )	0,050			
Limite de Quantificação (µg g <sup>-1</sup> )	0,13			
Exatidão (% Recuperação)				
0,250 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=3)</i></b>	89-95			
0,500 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=3)</i></b>	94-98			
1,000 <b>µg g<sup>-1</sup> <i>(n=3)</i></b>	95-97			

**Tabela IV.8.** Parâmetros de validação do método MISPE-HPLC-DAD para a determinação FNT em tomate.

uA: unidade de absorbância

#### IV.9 <u>APLICAÇÃO DO MÉTODO MISPE-HPLC NA QUANTIFICAÇÃO DE FNT EM</u> <u>AMOSTRAS DE TOMATE</u>

O método validado foi aplicado para a análise de duas amostras de tomate adquiridas no comércio local de Campinas, SP. A variedade da primeira amostra de

tomate foi debora e a segunda amostra foi comercializado como orgânico. Ambas as amostras foram analisadas em quintuplicata (n=5) e continham FNT (tomate Debora,  $0,21\pm0,02 \ \mu g \ g^{-1}$  e tomate orgânico,  $0,17\pm0,02 \ \mu g \ g^{-1}$ ) (P=0,05).

A pureza dos picos foi confirmada pelo espectro da FNT. No entanto, para confirmar a identidade é necessário realizar a análise usando a cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas em tandem. Os cromatogramas estão apresentados nas **Figuras IV.25** e **IV.26**, respectivamente.



**Figura IV.26**. Cromatograma de uma amostra de tomate da variedades Debora (A) e orgânico (B), após o MISPE. Fase estacionária: XTerra<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, fase móvel: MeOH/H<sub>2</sub>O (84:16, v/v),  $\lambda$  = 270 nm, vazão:1,0 mL min<sup>-1</sup>. Tempo de retenção, t<sub>R</sub>, da FNT nas condições acima: 4,8 minutos.

## V. CONCLUSÕES

De maneira geral, a realização deste trabalho de dissertação levou às seguintes conclusões:

• Cálculos teóricos prevendo a energia livre, obtidos a partir de procedimentos de modelagem molecular, permitem selecionar de forma racional o monômero que irá formar um complexo mais estável com a molécula molde e, assim sintetizar um polímero de impressão molecular com sítios de ligação mais seletivos.

• Entre os monômeros avaliados: ácido metacrílico, ácido *p*-vinilbenzóico, acrilamida e alilamina, o ácido metacrílico mostrou formar um complexo mais estável com a fenitrotiona (menor energia livre).

• Para avaliar a seletividade dos sítios de ligação específicos gerados no material polimérico é importante que em uma primeira etapa sejam realizados estudos de adsorção usando o polímero impresso e não impresso.

• O polímero de impressão molecular, sintetizado a partir de ácido metacrílico, etileno glicol dimetacrilato, 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, fenitrotiona como molécula molde e <u>tolueno</u> como solvente porogênico apresentou maior afinidade pela FNT quando este esteve solubilizado em solvente apolar de baixa constante dielétrica e de preferência no mesmo solvente de síntese.

 O polímero sintetizado em tolueno apresentou maior eficiência de extração quando comparado com um polímero sintetizado com os mesmos reagentes em diclorometano.

• A voltametria de onda quadrada mostrou ser uma técnica adequada para monitorar a concentração de fenitrotiona e de seus análogos parationa, metilparationa e fentiona nos estudos de adsorção. A técnica é rápida e apresenta faixa linear adequada para esta finalidade.

• O polímero não impresso também apresentou sítios de ligação, porém considerados não específicos, que permitiram a adsorção de fenitrotiona em pequenas extensões.

• O polímero impresso foi usado em procedimento de extração em fase sólida e empregado no preparo de amostras de tomate, visando a determinação de resíduos

105

de fenitrotiona. O polímero apresentou seletividade adequada, com a vantagem de poder ser re-utilizado durante outros estudos, evidenciando a ausência de efeito de memória após sua regeneração.

• O método analítico, usando o MISPE (polímero sintetizado em tolueno como fase estacionária) e a cromatografia líquida de alta eficiência, é adequado para a determinação de resíduos de FNT em tomates.

# VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIZADEH, T.; ZARE, M.; GANJALI, M.R.; NOROUZI, P.; TAVANA, B., A new molecularly imprinted polymer (MIP)-based electrochemical sensor for monitoring 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in natural waters and soil samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25, 1166-1172.

ANDERSSON, L.I., Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B*, 2000, 745, 3-13.

**ANVISA, 2009**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, RE n° 889, de 29/05/2003: http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word, acessado em Julho de 2009.

**ANVISA, 2010**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=306, acessado em Janeiro de 2010.

ANVISA, 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, 15/04/2009 : www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias/2009/pdf/150409\_para.pdf, acessado em Fevereiro de 2010.

ARSHADY, R.; MOSBACH, M., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 1981, 182, 687-692.

ÁVILA, M.; ZOUGAGH, M.; RÍOS, Á., **Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules**, *Trends in Analytical Chemistry*, **2008**, 27, 1, 54-65.

BAGGIANI, C.; ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C., Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 591, 29-39.

BRAVO, J.C.; GARCINUÑO, R.M.; FERNÁNDEZ, P.; DURAND, J.S., Selective solid-phase extraction of ethynylestradiol from river water by molecularly imprinted polymer microcolumns, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393, 1763-1768.

BRITO, M.A. **QSAR-3D de Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa do HIV-1: Estudos Independente e Dependente da Enzima**. **2008**. 230 f. *Tese (Doutorado em Química Orgânica)* - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L., Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão, Pesticidas, *R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, **2003**, 13, 129-146.

CACHO, C.; TURIEL, E.; PÉREZ-CONDE, C., Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples, *Talanta*, **2009**, 78, 1029-1035.

CAI, W.; GUPTA. R.B., **Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding**, *Separation and Purification Technology*, **2004**, 35, 215-221.

CARO, E.; MARCÉ, R.M.; BORRUL, F.; CORNACK, P.A.G.; SHERRINGTON, D.C., Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples, *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, 25, 143-153.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C., Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de Química Farmacêutica, *Química Nova*, 2003, 26, 3, 428-438.

CARVALHO, L. A.; NETO, J. T.; ARRUDA, M. C.; JACOMINO, A. P.; MELO, P. C. T., Caracterização físico-química híbridos de tomate de crescimento indeterminado em função do espaçamento e número de ramos por planta, *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, **2005**, 11, 3, 295-298.

CHIANELLA, I.; KARIM, K.; PILETSKA, E. V.; PRESTON, C.; PILETSKY, S. A., Computational design and synthesis of molecularly imprinted polymers with high binding capacity for pharmaceutical applications-model case: Adsorbent for abacavir, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 559, 73-78.

CHIANELLA I.; LOTIERZO, M.; PILETSKY, S.A.; TOTHILL I.E.; CHEN, B.; KARIM, K.; TURNER, A.P.F., **Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach**, *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 1288-1293.

COBOS-MURCIA, J.A.; GALICIA, L.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; RAMÍREZ-SILVA, M.T.; ÁLVAREZ-BUSTAMANTE, R.; ROMERO-ROMO, M.; ROSQUETE-PINA, G.; PALOMAR-PARDAVÉ, M., Eletrochemical polymerisation of 5-amino-1,10-phenanthroline onto different substrates. Experimental and theorical study, *Polymer*, 2005, 46, 9053-9063.

CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z.; Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *Journal of Chromatography B*, 2004, 804, 173-182.

DIÑEIRO, Y.; MENÉNDEZ, M. I.; BLANCO-LÓPEZ, M. C.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; TUÑÓN-BLANCO, P., **Computational approach to the rational design of molecularly imprinted polymers for voltammetric sensing of homovanillic acid**, *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 6741-6746.

DIÑEIRO, Y.; MENÉNDEZ, M. I.; BLANCO-LÓPEZ, M. C.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; TUÑÓN-BLANCO, P., Computational predictions and experimental affinity distributions for a homovanillic acid molecularly imprinted polymer, *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, 22, 364-371

DONG, W.; YAN, M.; LIU, Z.; GUOSHI, W.; LI, Y., Effects of solvents on the adsorption selectivity of molecularly imprinted polymers: Molecular simulation and experimental validation, *Separation and Purification Technology*, 2007, 53, 183-188.

DONG, W.; YAN, M.; ZHANG, M.; LIU, Z.; LI, Y. A computational and experimental investigation of the interaction between the template molecule and the functional monomer used in the molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 542, 186-192.

EC, European Comission; Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36.

**FAO**, **2009**. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*: http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2003\_eva/fenitrothion%2 02003.pdf, acessado em janeiro de 2009.

FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F., Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: Selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 566, 60-68.

FARRINGTON, K.; REGAN, F., Investigation of the nature of MIP recognition: The development and characterisation of a MIP for Ibuprofen, *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, 22, 1138-1146.

FARRINGTON, K.; REGAN, F., Molecularly imprinted sol gel for ibuprofen: An analytical study of the factors influencing selectivity, *Talanta*, 2009, 78, 653-659.

FIGUEIREDO, E.C.; OLIVEIRA, D.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ARRUDA, M.A.Z., **Online molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers**, Analytica *Chimica Acta*, **2009**, 635, 102-107. FORESMAN, J.B.; FRISCH, E., **Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods**, Second Edition, Gaussian, Pittsburgh, PA, USA, **1993**, 302 p.

GARCÍA-CALZÓN, J.A.; DÍAZ-GARCÍA, M.E., **Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers**, *Sensors and Actuators B*, **2007**, 123, 1180-1194.

HAGINAKA, J., Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes, *Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, 24, 5, 407-415.

HAGINAKA, J.; TABO, H.; ICHITANI, M.; TAKIHARA, T.; SUGIMOTO, A.; SAMBE, H., Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for (-)-epigallocatechin gallate, -epicatechin gallate and –gallocatechin gallate by multi-step swelling and polymerization method, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1156, 45-50.

HENRY, O.Y.F.; PILETSKY, S.A.; CULLEN, D.C., Fabrication of molecularly imprinted polymer microarray on a chip by mid-infrared laser pulse initiated polymerisation, *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23, 1769-1775.

**INCHEM, 2010**. International Programme on Chemical Safety: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc133.htm, acessado em Fevereiro de 2010.

JANTARAT, C.; TAHGTHONG, N.; SONGKRO, S.; MARTIN, G.; SUEDEE, R., **S**-**Propanolol imprinted polymer nanoparticle-on-microsphere composite porous cellulose membrane for the enantioselectively controlled delivery of racemic propanolol**, *International Journal of Pharmaceutics*, **2008**, 349, 212-225.

JAVANBAKHT, M.; SHAABANI, N.; AKBARI-ADERGANI, B., **Novel molecularly** imprinted polymers for the selective extraction and determination of metoclopramide in human serum and urine samples, *Journal of Chromatography B*, **2009**, 877, 2537-2544.

JIANG, T.; ZHAO, L.; CHU B.; FENG, Q.; YAN, W.; LIN, J.M., **Molecularly imprinted** solid-phase extraction for the selective determination of 17β-estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography, *Talanta*, 2009, 78, 442-447.

JING, T.; GAO, X.D.; WANG, P.; WANG, Y.; LIN, Y.F.; HU, X.Z.; HAO, Q.L.; ZHOU, Y.K.; MEI, S.R., **Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 393, 2009-2018.

KEMPE, M; MOSBACH K., **Binding studies on substrate- and enantio-selective molecularly imprinted polymers**, *Analytical Letters*, **1991**, 24, 1137-1145.

KIRK, C.; JENSEN, M.; KJAER, C.N.; SMEDSKJAER, M.M.; LARSEN, K.L.; WIMMER, R.; YU, D., Aqueous batch rebinding and selectivity studies on sucrose imprinted polymers, *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 25, 623-628.

KOWALSKA A.; STOBIECKA, A.; WYSOCKI, S., **A** computational investigation of the interactions between harmane and the functional monomers commonly used in molecular imprinting, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **2009**, 901, 88-95.

KYZAS, G.Z.; BIKIARIS, D.N.; LAZARIDIS, N.K., Selective separation of basic and reactive dyes by molecularly imprinted polymers (MIPs), *Chemical Engineering Journal*, 2009, 149, 263-272.

LI, Y.; ZHOU, W.H.; YANG, H.H.; WANG, X.R., Grafting of molecularly imprinted polymers from the surface of silica gel particles via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization: A selective sorbent for theophylline, *Talanta*, **2009**, 79, 141-145.

LIU, Y.; WANG, F.; TAN, T.;LEI, M., Study of the properties of molecularly imprinted polymers by computational and conformational analysis, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 581, 137-146.

LLASERA, M.P.G.; REYES-REYES, M.L., **A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples**, *Food Chemistry*, **2009**, 114, 1510-1516.

MAHONY, J.O.; NOLAN, K.; SMYTH, M.R.; MIZAIKOFF, B., **Molecularly imprinted polymers - potential and challenges in analytical chemistry**, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 534, 31-39.

MARTÍN-ESTEBAN, A.; TURIEL, E.; STEVENSON, D., Effect of template size on the selectivity of molecularly imprinted polymers for phenylurea herbicides, *Chromatographia*, **2001**, 53, 434-437.

MIDIO, A.F.; MARTINS, D.I., **Toxicologia de alimentos**. São Paulo, Varela, **2000**, 295 p.

MOL, H.G.J.; VAM, R.C.J.; STEIJGER, O.M., Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent, *Journal of Chromatography A*, 2003, 1015, 119-127.

MORGON, N.H.; COUTINHO, K., **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, Livraria da Física, São Paulo, **2007**.

NYAM, K.L.; TAN, C.P.; KARIM, R.; LAI, O.M.; LONG, K.; MAN, Y.B.C., Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO<sub>2</sub>), *Food Chemistry*, **2010**, 119, 1278-1283.

OKUTUCU, B.; TELEFONCU, A., **Optimization of serotonin imprinted polymers** and recognition study from platelet rich plasma, *Talanta*, **2008**, 76, 1153-1158.

O'SHANNESSY, D.J.; EKBERG, B.; MOSBACH, K., Molecular imprinting of amino acid derivatives at low temperature (0 °C) using photolytic homolysis of azobisnitriles, *Analytical Biochemistry*, **1989**, 177, 144-149.

PAP, T.; HORVAI, G., Characterization of the selectivity of a phenytoin imprinted polymer, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1034, 99-107.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R., Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, *Química Nova*, 2008, 31, 1190-1198.

PENTEADO, S. R., Cultivo orgânico de tomate, Viçosa, *Ed. Aprenda Fácil*, 210, 2004.

PEREIRA, L.A.; RATHS, S., Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, 393, 1063-1072.

PERÉZ-MORAL, N.; MAYES, A.G., Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 504, 15-21.

PICHON, V.; CHAPUIS-HUGON, F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants - A review, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 622, 48-61.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E., Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa, *Química Nova*, 2009, 32, 92-98.

POLYAKOV, M.V., Adsorption properties and structure of silica gel, *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, **1931**, 2, 799-805.

PRASAD, B.B.; SRIVASTAVA, S.; TIWARI, K.; SHARMA, P.S., **Trace-level sensing** of dopamine in real samples using molecularly imprinted polymer-sensor, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 44, 232-239.

PUOCI, F.; CURCIO, M.; CIRILLO, G.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G.; PICCI, N. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products, *Food Chemistry*, **2008**, 106, 836-842.

PUOCI, F.; IEMMA, F.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; PARISI, O.I.; SPIZZIRRI, U.G.; PICCI, N., New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media, *European Polymer Journal*, 2009, 45, 1634-1640.

QIAO, F.; SUN, H.; YAN, H.; ROW, K.H., Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction, *Chromatographia*, **2006**, 64, 625-634.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C., Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova*, **2004**, 27, 771-780.

SÁNCHES-ORTEGA, A.; SAMPEDRO, M.C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R. J., Solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1094, 70-76.

SANCHÉZ, A.; MILLÁN, S.; SAMPEDRO, M.C.; UNCETA, N.; RODRÍGUEZ, E.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J., Quantification of fenitrothion and its metabolites in poplar leaves by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry coupled with solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A*, 2008, 1177, 170-174.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I., **Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético**, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **2007**, 43, 2.

SELLERGREN, B.; ALLENDER, C.J., Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1733-1741.

SHABIR, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities

between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *Journal of Chromatography A*, **2003**, 987, 57–66.

SPIVAK, D.A., **Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers,** *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1779-1794.

SUN, Z.; SCHÜSSLER, W.; SENGL, M.; NIESSNER, R.; KNOPP, D., Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid-phase extraction with a new molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 2008, 620, 73-81.

TAMAYO, F.G.; CASILLAS, J.L.; MARTÍN-ESTEBAN, A., Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecularly imprinted polymers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2005**, 391, 1234-1240.

TAMAYO, F.G.; CASILLAS, J.L.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; Highly selective fenuronimprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation and its application to the fenuron in plant samples, *Analytica Chimica Acta*, 2003, 482, 165-173.

TAMAYO, F.G.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A., Molecularly imprinted polymers for solid phase microextraction: Recent developments and future trends, *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1152, 32-40.

TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T., Polímeros Biominéticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em Técnicas de Extração e Separação, *Química Nova,* 2005, 28, 1076-1086.

Thompson, M.; Stephen, L. R.; Wood, R., Pure Appl. Chem., 2002, 74, 835-855.

TÓTH, B.; PAP, T.; HORVATH, V.; HORVAI, G., Which molecularly imprinted polymer is better?, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 591, 17-21.

UMPLEBY II, R.J.; BAXTER, S.C.; RAMPEY, A.M.; RUSHTON, G.T.; CHENA, Y.; SHIMIZU, K.D., Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 2004, 804, 141-149.

United States Food and Drug Administration (**US-FDA**), Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human, *Services, Guidance for Industry, Bioananalytical Method Validation*, **May 2001**.

UYGUN, U.; ÖZKARA, R.; ÖSBEY, A.; KOKSEL, H., **Residue levels of malathion** and fenitrothion and their metabolites in postharvest treated barley during storage and malting, *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1165-1169.

Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes – PNCRC Animal da Instrução Normativa nº 24 de 14 de Julho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

WANG, X.J.; XU, Z.L.; FENG, J.L.; BING, N.C.; YANG. Z.G., Molecularly imprinted membranes for the recognition of lovastatin acid in aqueous medium by a template analogue imprinting strategy, *Journal of Membrane Science*, 2008, 313, 97-105.

WHITCOMBE, M.J.; RODRIGUEZ M.E.; VILLAR, P.; VULFSON, E.N., A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 7105-7111.

WU, L.; SUN, B.; Li, Y.; CHANG, W., Study properties of molecular imprinting polymer using a computational approach, *Analyst*, 2003, 128, 944-949.

WU, H.; ZHAO, Y.; NIE, M.; JIANG, Z., Molecularly imprinted organic-inorganic hybrid membranes for selective separation of phenylalanine isomers and its analogue, *Separation and Purification Technology*, **2009**, 68, 97-104.

WU, L.; ZHU, K.; ZHAO, M.; LI, Y., Theoretical and experimental study of nicotinamide molecularly imprinted polymers with different porogens, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 549, 39-44.

WULFF, G.; SARHAN, A., Über die Anwendung von enzymanalog gebauten polymeren zur racemattrennung, *Angewandte Chemie*, **1972**, 84, 364.

XU, Z.; FANG, G.; WANG, S., Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables, *Food Chemistry*, 119, **2010**, 845-850.

YAN, H.; ROW, K.H., Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, **2006**, 7, 155-178.

YAN, M.; RAMSTRÖM, O., **Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology**, Marcel Dekker, New York, 2005, EUA.

YANG, H.H.; ZHOU, W.H.; GUO, X.C; CHEN, F.R.; ZHAO, H.Q.; LIN, L.M.; WANG, X.R., Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products, *Talanta*, 2009, 821-825.

YANG, T.; LI, Y.H.; WEI, S.; LI, Y.; DENG, A. Development of a selective molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction for indomethacin from water samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391, 2905-2914.

YAO, J.; LI, X.; QIN, W., Computational design and synthesis of molecular imprinted polymers with high selectivity for removal of aniline from contaminated water, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 610, 282-288.

YIN, J.; YANG, G.; CHEN, Y., **Rapid and efficient chiral separation of nateglinide** and its L-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1090, 68-75.

ZHANG, H.; SONG, T.; ZONG, F.; CHEN, T.; PAN, C., Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for phenoxyacetic acids, *International Journal of Molecular Sciences*, **2008**, 9, 98-106.

ZHU, X.; YANG, J.; SU, Q.; CAI, J.; GAO, Y., Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092, 161-169.