



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO
DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
MOLECULARMENTE IMPRESSA
(MISPE) PARA A DETERMINAÇÃO DE
FENITROTIONA EM TOMATE**

LEANDRO ALVES PEREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. SUSANNE RATH

CAMPINAS
FEVEREIRO DE 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

P414d Pereira, Leandro Alves.
Desenvolvimento de um método de extração em fase
sólida molecularmente impressa (MISPE) para a
determinação de fenitrothion em tomate / Leandro Alves
Pereira. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.

Orientadora: Susanne Rath.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Polímeros de impressão molecular. 2. SPE.
3. Fenitrothion. 4. Tomate, I. Rath, Susanne.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Development of a molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) method for determination of fenitrothion in tomato

Palavras-chaves em inglês: Molecularly imprinted polymers, SPE, Fenitrothion, Tomato

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Susanne Rath (orientadora), Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira (UNIFAL), Marco Aurélio Zezzi Arruda (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 22/02/2008

Aos meus pais, Jairo e Glória, aos quais
devo muito do que
sou hoje.
Amo vocês !!

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus por me conceder saúde, sustento e a oportunidade de estar no IQ/UNICAMP realizando meus estudos de pós-graduação.

A Profa. Susanne Rath, a qual admiro muito tanto como profissional e como pessoa, meus agradecimentos por me aceitar como seu aluno, pelo auxílio e tranquilidade nestes dois anos de convivência.

Aos professores que gentilmente atenderam ao convite para participar de minha banca de qualificação e de defesa: Marco Aurélio Zezzi Arruda, Carla Beatriz Crespan Bottoli, Maria Elisa Siqueira, Anne Hélène Fostier e Lúcia Codognoto de Oliveira.

A CAPES e a FAPESP pela concessão das respectivas bolsas de estudo e auxílio pesquisa, meios que possibilitaram a realização deste trabalho.

A CPG do IQ/UNICAMP, sempre atenta às necessidades dos alunos.

Aos funcionários do IQ/UNICAMP, sempre prestativos e prontos a ajudar no que for necessário.

A Marcela Sismotto e Lúcia Helena (FEA/UNICAMP) pelo auxílio nos momentos em que precisei.

Ao Prof. Félix Reyes (FEA/UNICAMP) pela cooperação e disponibilização de seu laboratório para a realização de algumas das etapas deste trabalho.

Ao Mendelssolm, Rodrigo, Daniel e Bárbara, amigos com os quais tive a oportunidade de morar neste último ano. Obrigado pela paciência, companheirismo e por tornar minha estada em Campinas mais feliz.

A todos do laboratório D-205 com os quais convivi nestes dois anos: Mônica, Larissa, Keity, Fran, Raquel, Jonas, Eduardo, Ricardo, Natália, Patrícia, Juliana, Gabriel, Socorro e Lúcia. Obrigado por fazerem parte da minha história de vida no IQ/UNICAMP e pelo auxílio quando necessitei.

A minha família, que tem me incentivado a continuar estudando.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica

Mestrado em Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Bacharel e licenciado em Química - Universidade Federal do Espírito Santo.

2. Produção científica

2.1. Iniciação científica

Estudos de rearranjo de esqueleto carbônico em derivados acilados de *trans*-epóxi-carveol.

Departamento de Química - Universidade Federal do Espírito Santo.

Período: agosto de 2004 a agosto de 2005.

2.2. Trabalho científico apresentado em congresso

Desenvolvimento de Polímeros de Impressão Molecular para Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (MISPE) e Aplicação na Determinação de Fenitrotona.

Leandro Alves Pereira, Susanne Rath.

14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa - PB

Apresentação na forma de comunicação oral e painel.

3. Outros

3.1. Estágios:

- Programa de Estágio Docente (PED) no período de março a julho de 2007 em Química Analítica Instrumental I – IQ/UNICAMP.
- Programa de Estágio Docente (PED) no período de agosto a dezembro de 2007 em Química Analítica Clássica – IQ/UNICAMP.

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA MOLECULARMENTE IMPRESSA (MISPE) PARA A DETERMINAÇÃO DE FENITROTIONA EM TOMATE.

RESUMO

Palavras chave: Polímeros de Impressão Molecular, extração em fase sólida, agrotóxicos, fenitrotona, tomate.

Resíduos de agrotóxicos presentes em alimentos podem exceder os limites máximos de resíduos, quando as boas práticas agrícolas não são respeitadas. Conseqüentemente, a determinação dos resíduos de agrotóxicos é extremamente importante para avaliar o uso apropriado dessas substâncias e os riscos à saúde humana decorrentes da sua presença nos alimentos.

A determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos requer etapas de preparo de amostras que consistem, geralmente de etapas de extração, remoção de interferentes e concentração do analito anterior análise cromatográfica. Para tanto, tem sido largamente empregada a extração em fase sólida.

O objetivo do presente trabalho foi a síntese e caracterização de polímeros de impressão molecular (MIP) para uso em cartuchos de extração em fase sólida, visando a determinação de fenitrotona (FNT) em tomates. O polímero foi sintetizado a partir do ácido metacrílico (monômero funcional), etileno glicoldimetilacrilato (reagente de ligação cruzada), 2,2-azobis(isobutyronitrila) (iniciador radicalar) em diclorometano (solvente porogênico), usando a FNT como molécula molde. Também foi sintetizado um polímero de controle (NIP). O MIP foi caracterizado por técnicas de infravermelho de transformada de Fourier, ressonância magnética nuclear do estado sólido, microscopia de varredura eletrônica e porosimetria de sorção de nitrogênio. O modelo de Langmuir-Freundlich foi o que apresentou o melhor ajuste para descrever a adsorção da FNT no polímero. O MIP foi empregado em cartuchos de extração em fase sólida e as etapas de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição otimizadas.

A extração em fase sólida molecularmente impressa foi aplicada na determinação de FNT em amostras de tomates, usando a cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detetor de arranjo de diodos. A eficiência de extração, para amostras branco de tomates fortificadas com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, foi de 65 %. Nenhum interferente foi observado nos cromatogramas no tempo de retenção da FNT, indicando a seletividade do polímero.

DEVELOPMENT OF A MOLECULARLY IMPRINTED SOLID-PHASE EXTRACTION (MISPE) METHOD FOR DETERMINATION OF FENITROTHION IN TOMATO.

ABSTRACT

Keywords: Molecularly Imprinted Polymers, solid-phase extraction pesticides, fenitrothion, tomato.

Pesticide residues present in food can exceed maximum residue level when good agricultural practices are not followed. Consequently, the determination of pesticide residues is extremely important to evaluate the appropriate use of these substances and risks to human health due to their presence in food.

The determination of pesticide residues in food requires sample preparation steps that consist mainly of extraction, clean-up, and concentration of the analyte prior to chromatographic quantitation. For this purpose, solid-phase extraction has been widely employed.

The aims of this work were the synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer (MIP) to be employed as a sorbent in solid phase extraction cartridges for the determination of fenitrothion (FNT) in tomatoes. The polymer was synthesized using FNT as the template molecule, methacrylic acid as the functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linking monomer, and 2,2-azobis-isobutyronitrile as the initiator. Dichloromethane was used as the porogenic solvent. Also, a non-imprinted polymer was synthesized.

The MIP was characterized using the following techniques: FT-IR, NMR, electronic microscopy and BET. The adsorption of FNT on the polymer was fitted to the Langmuir-Freundlich model. The polymer was used in the solid-phase extraction cartridges and the conditioning, sample loading, clean-up and elution steps were optimized. The molecularly imprinted solid phase extraction was used for the determination of FNT in tomatoes, using high performance liquid chromatography with a diode array detector. The extraction efficiency, for a fortified blank tomato sample ($5 \mu\text{g g}^{-1}$ FNT), was 65 %. No interferences were observed in the chromatograms at the retention time of FNT, indicating the selectivity of the polymer.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	xvii
Lista de tabelas.....	xix
Lista de figuras.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A contaminação de alimentos.....	3
1.2 Polímeros de Impressão Molecular.....	5
1.3 Aplicação dos Polímeros de Impressão Molecular em SPE.....	15
1.4 Fenitrotiona.....	19
2. OBJETIVOS.....	23
3. EXPERIMENTAL.....	27
3.1 Reagentes e soluções.....	29
3.2 Equipamentos.....	30
3.3 Procedimentos.....	32
3.3.1 Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular.....	32
3.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico da fenitrotiona sobre o eletrodo de mercúrio (HMDE).....	33
3.3.2.1 Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada.	33
3.3.2.1.1 Determinação de fenitrotiona por Voltametria de Onda Quadrada.....	34
3.3.3 Estudos de adsorção.....	34
3.3.4 Otimização do procedimento de MISPE.....	35
3.3.4.1 Enchimento dos cartuchos.....	35
3.3.4.2 Condicionamento e carregamento.....	36
3.3.4.3 Lavagem do MISPE.....	36
3.3.4.4 Variação do conteúdo de água nos cartuchos.....	37
3.3.4.5 pH.....	37
3.3.4.6 Eluição.....	38
3.3.5 Extração em meio aquoso.....	38

3.3.6 Aplicação do MIP no preparo de amostra visando à determinação de FNT em tomate.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular.....	43
4.2. Caracterização dos polímeros.....	48
4.2.1 Infravermelho com Transformada de Fourier.....	48
4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com Polarização Cruzada e Ângulo Mágico de Rotação.....	50
4.2.3 Microscopia de Varredura Eletrônica e Porosimetria de Sorção de Nitrogênio.....	51
4.3 Estudo do comportamento eletroquímico da fenitrotona sobre o eletrodo de mercúrio.....	56
4.4 Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada para a fenitrotona.....	61
4.5 Estudos de adsorção.....	67
4.6 Otimização do procedimento de MISPE.....	76
4.6.1 Enchimento dos cartuchos.....	76
4.6.2 Condicionamento e carregamento.....	77
4.6.3 Lavagem do MISPE.....	81
4.6.4 Variação do conteúdo de água nos cartuchos.....	84
4.6.5 pH.....	86
4.6.6 Eluição.....	88
4.6.7 Extração em meio aquoso.....	90
4.6.8 Aplicação do MIP no preparo de amostra visando à determinação de FNT em tomate.....	92
5. CONCLUSÕES.....	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

- α : Coeficiente angular da reta
 ΔE_s : Incremento de varredura
 a : Amplitude
 A : Média de afinidade de ligação
ACN: Acetonitrila
 Ad : Concentração de fenitrotona adsorvido pelo polímero
AIBN: 2'2 azo-bis-iso-butironitrila
BET: Brunauer-Emmet-Teller
BR: Britton-Robinson
 C_{FNT} : Concentração de fenitrotona
CP-MAS: Polarização Cruzada e Ângulo Mágico de Rotação, do inglês *Cross Polarization Magic Angle Spinning*
DAD: Detector de arranjo de diodos
DCM: Diclorometano
DP: Desvio padrão da curva
 E : Potencial
EGDMA: Etileno glicol-dimetacrilato
 E_p : Potencial de pico
 f : Frequência
 F : Concentração de analito livre
FNT: Fenitrotona
FT-IR: Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared*
HAc: Ácido acético
HMDE: Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
 I : Concentração inicial da solução

IDA: Ingestão Diária aceitável
Ip: Corrente de pico
LF: Langmuir-Freundlich
LMR: Limites máximos de resíduos
 m : Índice de heterogeneidade
MAA: Ácido metacrílico
MeOH: Metanol
MIP: Polímero de Impressão molecular, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*
MIP-A: Polímero de Impressão Molecular sintetizado em acetonitrila
MIP-D: Polímero de Impressão Molecular sintetizado em diclorometano
MIP-M: Polímero de Impressão molecular sintetizado em metanol
MISPE: Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa, do inglês *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction*
NIP: Polímero Não Impresso, do inglês *Non Imprinted Polymer*
NIP-A: Polímero Não Impresso sintetizado em acetonitrila
Nip-D: Polímero Não Impresso sintetizado em diclorometano
NISPE: Extração em Fase Sólida Não Impressa, do inglês *Non Imprinted Solid-Phase Extraction*
 N_t : Número total de sítios de ligação
pc: Peso corpóreo
R: Coeficiente de correlação
RLC: Reagente de ligação cruzada
SEM: Microscopia de Varredura Eletrônica, do inglês *Scanning Electron Microscopy*
SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Extraction*
SWV: Voltametria de Onda Quadrada, do inglês *Square Wave Voltametry*
tr: Tempo de retenção
UV: Ultravioleta
v: Velocidade de varredura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de reagentes empregados na síntese dos polímeros.....	32
Tabela 2: Porosimetria dos polímeros impresso e de controle.....	55
Tabela 3: Porcentagem de FNT adsorvida.....	68
Tabela 4: Coeficientes de ajuste ao modelo LF.....	76
Tabela 5: Procedimento otimizado do MISPE para remoção de FNT em meio aquoso.....	90
Tabela 6: Eficiência de extração de FNT durante o MISPE	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de síntese e atuação do MIP (adaptado de MAHONY <i>et al</i> , 2005).....	5
Figura 2: Exemplos de reagentes de ligação cruzada tipicamente utilizados em impressão molecular. 1) <i>p</i> -divinilbenzeno (DVB), 2) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP), 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 4) tetrametileno dimetacrilato (TDMA), 5) <i>N,O</i> -bisacrilóil- <i>L</i> -fenilalaninol, 6) 2,6 bisacrilóilaminopiridina, 7) 1,4-fenileno diacrilamida, 8) <i>N,N'</i> -1,3-fenilenebis(2-metil-2-propenamida) (PDBMP), 9) 3,5 ácido benzóico bisacrilamido.....	12
Figura 3: Exemplos de iniciadores radiculares empregados em impressão molecular. 1) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), 2) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV), 3) dimetilacetal de benzila, 4) peróxido de benzoíla (BPO), 5) ácido 4,4' azo-bis-(4-ciano pentaenóico).....	13
Figura 4: Estrutura da FNT.....	20
Figura 5: Estrutura do ácido metacrílico (MAA).....	43
Figura 6: Estrutura da FNT e possíveis pontos de interação da FNT com o MAA (em vermelho).....	43
Figura 7: Representação esquemática de complexos molde-monômero funcional (adaptado de SPIVAK, 2005).....	44
Figura 8: Estrutura do etileno glicoldimetacrilato (EGDMA).....	45
Figura 9: Reação de homólise do AIBN.....	46
Figura 10: Espectros de FT-IR (KBr) do MIP-D e NIP-D.....	49
Figura 11: ¹³ C CP-MAS NMR do MIP-D.....	50
Figura 12: ¹³ C CP-MAS NMR do NIP-D.....	51
Figura 13: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do MIP-D (aumento de 330 vezes).....	52
Figura 14: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do NIP-D (aumento de 650 vezes).....	52
Figura 15: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do MIP-D (aumento de 1800 vezes).....	53

Figura 16: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do NIP-D (aumento de 2000 vezes).....	53
Figura 17: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do MIP-D (aumento de 20000 vezes).....	54
Figura 18: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do NIP-D (aumento de 20000 vezes).....	54
Figura 19: Morfologia dos Polímeros de Impressão Molecular (adaptado de SPIVAK, 2005).....	56
Figura 20: Voltamogramas cíclicos para a redução da FNT sobre o eletrodo de mercúrio (HMDE) em tampão Britton-Robinson 0,10 mol L ⁻¹ de pH 3 a 12. $\nu = 100$ mV s ⁻¹	57
Figura 21: Relação entre I_p e o pH.....	58
Figura 22: Relação entre E_p e o pH.....	59
Figura 23: Influência da variação da velocidade de varredura no voltamograma da FNT em tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ , pH 4,75.....	60
Figura 24: (A) Dependência de I_p com a velocidade de varredura (B) dependência de I_p com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	60
Figura 25: Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura da FNT.....	61
Figura 26: Influência da variação da frequência de onda quadrada no perfil dos voltamogramas da FNT. Condições experimentais: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ em pH 4,75, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.....	62
Figura 27: Dependência da corrente de pico com a frequência de onda quadrada para a FNT.....	63
Figura 28: Influência da variação da amplitude da onda quadrada no perfil dos voltamogramas da FNT. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ em pH 4,75, $f = 100$ s ⁻¹ , $\Delta E_s = 2$ mV.....	63
Figura 29: Dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de onda quadrada.....	64

Figura 30: Voltamogramas de onda quadrada para a FNT. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ e pH 4,75, $a = 50$ mV e $f = 100$ s ⁻¹	65
Figura 31: Curva analítica para a FNT utilizando SWV e HMDE. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ em pH 4,75, $f = 250$ s ⁻¹ , $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV	66
Figura 32: Voltamogramas de onda quadrada para a FNT em diferentes concentrações. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L ⁻¹ em pH 4,75, $f = 250$ s ⁻¹ , $a = 60$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV	67
Figura 33: Isoterma de adsorção do MIP-D	70
Figura 34: Isoterma de adsorção do NIP-D	71
Figura 35: Gráfico log B vs log F para o MIP-D	73
Figura 36: Gráfico log B vs log F para o NIP-D	73
Figura 37: Isoterma de adsorção do MIP-D ajustada aos modelos de Langmuir-Freundlich, Langmuir e Freundlich	75
Figura 38: Isoterma de adsorção do NIP-D ajustada aos modelos de Langmuir-Freundlich, Langmuir e Freundlich	75
Figura 39: Perda de FNT em função do solvente de lavagem	82
Figura 40: Perda de FNT (durante a lavagem) em função da porcentagem de água empregada no carregamento do MIP-D	85
Figura 41: Perda de FNT (durante a lavagem) em função da porcentagem de água empregada no carregamento do NIP-D	85
Figura 42: Perda média de FNT (durante a lavagem) em função do pH da solução de carregamento do MIP-D/NIP-D	87
Figura 43: Variação da porcentagem de FNT removida, durante a lavagem, em função do tampão utilizado no carregamento	88
Figura 44: Porcentagem total de FNT recuperada após a etapa de lavagem e eluição dos cartuchos	89

Figura 45: Cromatograma de amostra branco após o MISPE Fase estacionária: XTerra C ₁₈ , fase móvel: ACN/H ₂ O (70:30, v/v), $\lambda = 270$ nm, vazão: 1,0 mL min ⁻¹	92
Figura 46: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após o MISPE. Fase estacionária: XTerra C ₁₈ , fase móvel: ACN/H ₂ O (70:30, v/v), $\lambda = 270$ nm, vazão: 1,0 mL min ⁻¹	93
Figura 47: Curva analítica para a FNT por cromatografia líquida de alta eficiência ..	93
Figura 48: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após o MISPE (excluindo-se a lavagem com tolueno). Fase estacionária: XTerra C ₁₈ , fase móvel: ACN/H ₂ O (70:30, v/v), $\lambda = 270$ nm, vazão: 1,0 mL min ⁻¹	95
Figura 49: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após o NISPE*. Fase estacionária: XTerra C ₁₈ , fase móvel: ACN/H ₂ O (70:30, v/v), $\lambda = 270$ nm, vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . * Non Imprinted Solid Phase Extraction.....	95
Figura 50: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após extração utilizando o cartucho C ₁₈ . Fase estacionária: XTerra C ₁₈ , fase móvel: ACN/H ₂ O (70:30, v/v), $\lambda = 270$ nm, vazão: 1,0 mL min ⁻¹	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 A contaminação de alimentos

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 (WHO, 2007).

Segundo a ANVISA (2007) 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 híbridos 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.

Dados estatísticos de 2007 apontam o Brasil como o quarto maior consumidor de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2007). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Química o consumo destes produtos dobrou no período entre 2003 à 2006, tendo sido movimentada no país, somente no ano de 2006, a quantia de 4 bilhões de dólares com a venda de agrotóxicos (ANVISA, 2007). 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 (RODRIGUES, 2006).

Assim, a presença de resíduos de agrotóxicos e drogas veterinárias 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 (BAGGIANI *et al.*, 2007a).

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 visava 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.

Usualmente, os contaminantes presentes em alimentos estão em baixos níveis de concentração (ng g^{-1}) e dispersos em uma matriz altamente complexa que dificulta a determinação destes resíduos. 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 correta determinação do(s) contaminante(s) de interesse (BAGGIANI *et al.*, 2007a).

No caso da determinação de agrotóxicos em alimentos as etapas de preparo de amostras visam basicamente a extração dos analitos da matriz, remoção de interferentes do extrato (limpeza ou *clean-up*) e concentração do analito de interesse. Para tal, são empregadas as técnicas de extração líquido-líquido, extração em fase sólida (SPE) e/ou extração por fluido supercrítico (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2006). No entanto, muitos destes procedimentos são demorados, não removem satisfatoriamente os interferentes da matriz, requerem o uso de grandes volumes de solventes orgânicos e acabam por não atenderem a seletividade e a sensibilidade requerida para a validação do método.

Uma forma de se aumentar a seletividade da SPE seria através do emprego de imunossorventes em procedimentos de extração em fase sólida. Contudo, a necessidade do emprego de anticorpos, a instabilidade dos mesmos em determinadas condições e o alto custo deste tipo de sorvente têm restringido o uso destes materiais (TARLEY *et al.*, 2005a; BAGGIANI *et al.*, 2007b). Neste sentido, os

Polímeros de Impressão Molecular (MIP) surgem como alternativa bastante interessante uma vez que, neste caso, não existe a necessidade de emprego de material biológico, já que o reconhecimento molecular do analito ocorre através de sítios artificiais de ligação (TAMAYO *et al.*, 2007).

1.2 Polímeros de Impressão Molecular

Os MIP são materiais plásticos e sintéticos, formados ao redor de uma molécula tomada como molde e que atuam de forma semelhante ao sistema antígeno-anticorpo no processo de reconhecimento molecular da substância escolhida como molde e/ou de seus análogos estruturais (TARLEY *et al.*, 2005a; TAMAYO *et al.*, 2003). O processo geral de síntese de um MIP, bem como seu mecanismo de atuação são mostrados na **Figura 1**.

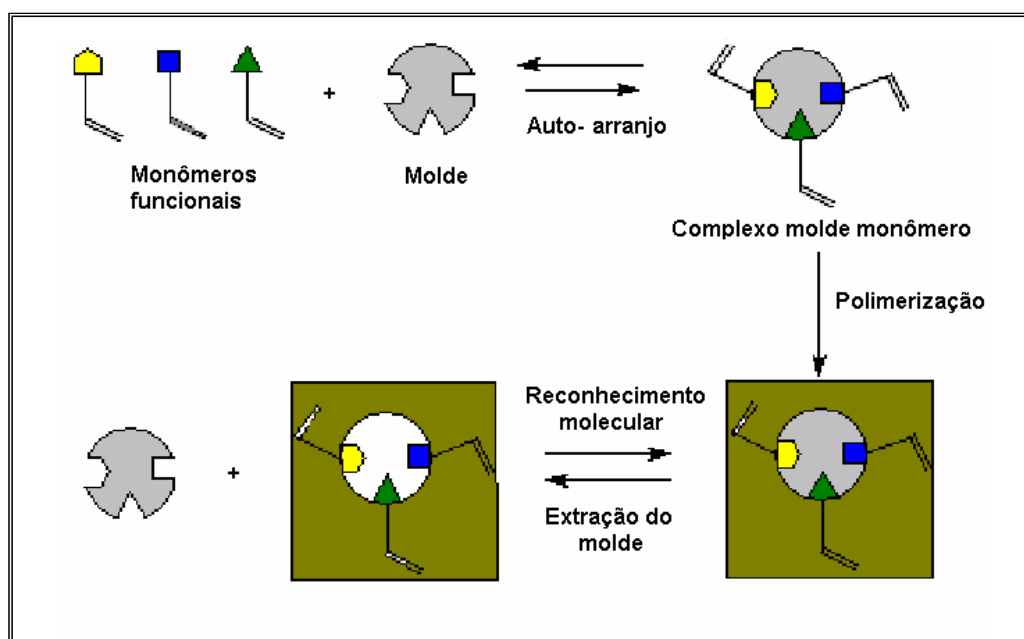


Figura 1: Esquema geral de síntese e atuação do MIP (adaptado de MAHONY *et al.*, 2005).

Conforme é mostrado na **Figura 1** a síntese dos MIP consiste, inicialmente, na interação de uma molécula molde com moléculas de um ou mais monômeros

funcionais. Posteriormente, ocorre a formação de uma matriz polimérica e rígida, em torno do complexo molde-monômero formado, após as adições de solvente, reagente de ligação cruzada, iniciador radicalar e realização de purga seguida de aquecimento ou iluminação por radiação UV do meio reacional. Em seguida, após a extração da molécula molde (também referida como molécula chave, molécula alvo, molécula impressa, antígeno impresso ou analito, YAN & RAMSTRÖM, 2005), que é realizada por meio de um solvente adequado, são reveladas cavidades complementares a este molde tanto em tamanho, forma e quanto à presença de grupos funcionais (TARLEY *et al.*, 2005a; TAMAYO *et al.*, 2005). Tais cavidades constituem os sítios específicos de ligação que agem no reconhecimento deste composto e/ou de substâncias com estrutura semelhante a ele. Por causa desta capacidade os MIP são conhecidos como anticorpos plásticos ou plasticorpos, já que os mesmos podem atuar como bioimitadores, imitando o mecanismo de ação de enzimas (YAN & RAMSTRÖM, 2005).

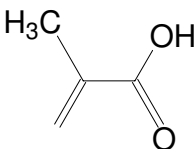
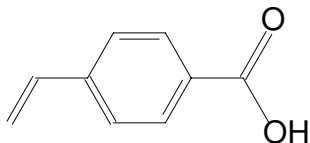
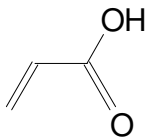
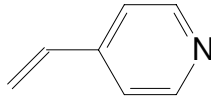
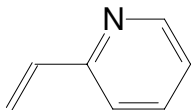
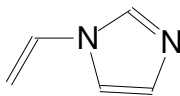
O primeiro trabalho de MIP em química analítica é datado de 1972, onde Wulf e Sarhan descreveram a síntese de um polímero com sítios seletivos para a separação emantiomérica de racematos de açúcares (WULF & SARHAN, 1972). Desde então, estes materiais têm recebido grande atenção por causa das vantagens, em relação aos materiais biológicos, que atuam no mecanismo de reconhecimento molecular. A facilidade de síntese, o baixo custo dos reagentes empregados, a estabilidade química, física e térmica do material por longos períodos de tempo, a capacidade de ser estocado sem perder sua especificidade e a possibilidade de reutilização do polímero, após a limpeza do mesmo, são algumas dessas vantagens (MAIER *et al.*, 2004; MAHONY *et al.*, 2005). Em contrapartida, os materiais imunossorventes possuem algumas desvantagens como: o elevado custo, a variação de sua estabilidade, a fragilidade química, física e térmica dos mesmos, a necessidade de condições especiais de armazenagem, a dificuldade de obtenção de biomoléculas e instabilidade quando estas são empregados em condições diferentes daquelas presentes em seu ambiente nativo (MAIER *et al.*, 2004; TARLEY *et al.*, 2005b). Desta forma, os MIP têm sido empregados como substitutos de biomoléculas que atuam no processo de reconhecimento molecular (MAIER *et al.*, 2004;

BAGGIANI *et al.*, 2001). Entretanto, os Polímeros de Impressão Molecular apresentam algumas desvantagens como: baixa capacidade catalítica, formação de sítios de ligação heterogêneos, processo laborioso de quebra e trituração do material e dificuldade de remoção da molécula molde em alguns casos (MAHONY *et al.*, 2005).

O ponto de partida para a síntese destes materiais bioimitadores é a escolha criteriosa da molécula a ser utilizada como molde e do monômero funcional empregado. O molde, por sua vez, não deve ser polimerizável, deve ser estável ao aquecimento e/ou radiação UV, conforme forem as condições de reação, devendo ainda, ser solúvel no solvente empregado (CORMACK & ELORZA, 2004). Além disto, a escolha de moldes que possuam rigidez conformacional aumenta a afinidade e seletividade no processo de reconhecimento molecular, visto que estas moléculas podem se encaixar melhor à cavidade impressa no polímero (AL-KINDY *et al.*, 2000). No mais, o tamanho do molde, sua solubilidade e o uso que será dado ao material impresso também devem ser levados em consideração durante o planejamento de síntese do polímero (YAN & RAMSTRÖM, 2005).

O monômero funcional desempenha um papel muito importante no processo de reconhecimento molecular, uma vez que ele está diretamente envolvido na formação de ligações químicas com a molécula molde nos sítios impressos (AL-KINDY *et al.*, 2000). Por isto, uma avaliação dos grupos funcionais presentes na molécula alvo deve ser realizada, para que seja feita uma melhor escolha do monômero funcional que permitirá a formação de ligações químicas mais efetivas com o analito (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Alguns exemplos de monômeros funcionais são mostrados no **Quadro 1**.

Quadro 1: Exemplos de monômeros funcionais empregados em impressão molecular.

	Monômero funcional	Nome	Possíveis tipos de interação com o analito
Ácidos		Ácido metacrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
		Ácido <i>p</i> -vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
		Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
Básicos		4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
		2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
		1-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais

Como pode ser visto na **Quadro 1**, os monômeros funcionais tipicamente usados em impressão molecular apresentam diferentes formas de interação com as possíveis moléculas molde. Por isto, a avaliação da estrutura da molécula a ser impressa é de fundamental importância para que o processo de reconhecimento

molecular seja bem sucedido. Uma regra básica a ser observada é que o monômero funcional deve ter complementaridade em relação ao molde utilizado. Assim, analitos contendo grupos funcionais básicos são melhores impressos com monômeros contendo grupos funcionais ácidos e vice-versa (AL-KINDY *et al.*, 2000; CORMACK & ELORZA, 2004).

O tipo de interação estabelecida entre o molde e o monômero funcional determina o método de impressão molecular que pode ser covalente, não covalente, ou semi-covalente (CARO *et al.*, 2006a). No modo covalente são formadas ligações covalentes reversíveis e lábeis, entre o molde e monômero funcional, de modo que o analito possa ser extraído e novamente se ligar às cavidades seletivas do polímero através deste tipo de interação. No modo não covalente são formadas ligações dos tipos dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, eletrostática, hidrofóbica ou de transferência de carga entre o analito e o monômero funcional. Já o modo semi-covalente consiste de um híbrido dos dois primeiros métodos e neste caso são inicialmente formadas ligações covalentes durante a síntese do polímero e ligações não covalentes durante o processo de reconhecimento molecular do analito (CARO *et al.*, 2006a).

Interações do tipo covalente são mais difíceis de serem obtidas e estão restritas a poucos grupos funcionais. Por outro lado, as interações não-covalentes são facilmente formadas. Assim, os MIP que utilizam interações não-covalentes no processo de reconhecimento molecular são os mais encontrados na literatura, correspondendo a cerca de 90 % dos trabalhos publicados (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Uma justificativa para este fato é que a preparação deste tipo de polímero é relativamente direta e requer etapas simples de síntese. Além disso, uma grande variedade de monômeros funcionais, que podem ser utilizados para realizar diferentes tipos de interações intramoleculares, está disponível no mercado. Finalmente, comparada com os métodos covalentes, o modo não covalente utiliza interações que são similares àquelas vistas em processos naturais, o que faz com que este método tenha maior aplicabilidade (YAN & RAMSTRÖM 2005; QIAO *et al.* 2006).

Conforme mostrado por meio da **Figura 1** (pág 5), durante a síntese do MIP ocorre a formação de um complexo molde-monômero funcional que obedece ao princípio de Le Chatelier. Desta forma, um aumento na concentração do monômero funcional provoca o deslocamento do equilíbrio estabelecido no sentido de formação do complexo pré-polímero. Por isto, durante a síntese do MIP utiliza-se geralmente uma relação molde:monômero funcional de 1:4, pois além de garantir a formação do complexo, o excesso de reagente também pode proporcionar interação com todos os grupos funcionais do molde, acarretando na formação de sítios de ligação com alta seletividade e especificidade (CORMACK & ELORZA, 2004).

Para que as interações entre o molde e o monômero funcional sejam estabilizadas deve-se fazer uma escolha criteriosa do solvente empregado durante a síntese do polímero. O solvente desempenha importantes funções, uma vez que além de promover a solubilização do meio de síntese ele também governa as interações estabelecidas entre o analito e o sítio de ligação no polímero, bem como exerce influência nas características morfológicas que o material irá apresentar, como por exemplo, sua porosidade (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY *et al.* 2005a; SPIVAK, 2005). Por causa desta característica os solventes são muitas vezes referidos como porogênicos (SPIVAK, 2005). A porosidade dos polímeros impressos origina-se da separação de fases entre o solvente porogênico e as cadeias poliméricas que crescem durante a reação. Porogênicos com baixa solubilidade de fase separam-se mais rápido e tendem a formar materiais com poros grandes e baixas áreas superficiais. Por outro lado, porogênicos com alta solubilidade separam-se mais lentamente, gerando polímeros com poros pequenos e maiores áreas superficiais (SPIVAK, 2005).

Solventes de caráter apolar têm a vantagem de estabilizar as interações de ligações de hidrogênio, formadas no complexo molde-monômero funcional durante a reação de síntese do MIP e, posteriormente, no processo de reconhecimento molecular (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY *et al.*, 2005a). Por outro lado, os solventes próticos de caráter polar, tais como água e metanol, podem atuar como competidores no meio reacional pela formação de ligações de hidrogênio com o monômero funcional (TARLEY *et al.*, 2005a; YAN & RAMSTRÖM, 2005). Assim,

neste último caso, para que possa ocorrer reconhecimento molecular em meio aquoso é necessário que os moldes utilizados apresentem grupos apolares em suas estruturas. Deste modo, o efeito de repulsão torna-se dominante em relação ao efeito competidor, fazendo com que o analito tenha mais afinidade pelo polímero do que pela fase aquosa (TARLEY *et al.*, 2005a).

Para que os sítios de ligação do MIP adquiram rigidez conformacional (conforme mostra a **Figura 1**) é feita a adição de um reagente de ligação cruzada (RLC) durante a síntese do polímero. Este monômero estrutural tem a função de gerar uma matriz polimérica rígida (em torno do complexo pré-polímero), dar forma ao MIP e manter fixos os grupos funcionais presentes nas cavidades seletivas do material (CORMACK & ELORZA, 2004). Por isto, o RLC deve estar presente em excesso em relação à quantidade de monômero funcional para garantir maior estabilidade mecânica ao polímero. Em geral, os valores ótimos para a relação monômero funcional:RLC estão em torno de 1:4. (SPIVAK, 2005). Na **Figura 2** são mostrados alguns exemplos de reagentes de ligação cruzada tipicamente utilizados em impressão molecular.

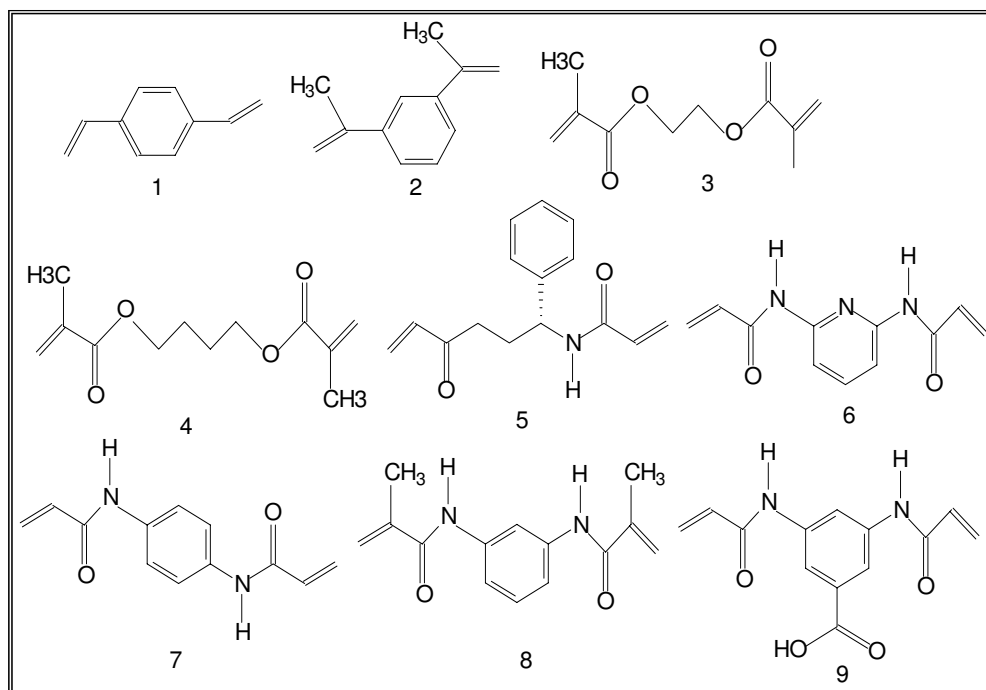


Figura 2: Exemplos de reagentes de ligação cruzada tipicamente utilizados em impressão molecular. 1) *p*-divinilbenzeno (DVB), 2) 1,3-diisopropenil benzeno (DIP), 3) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), 4) tetrametileno dimetacrilato (TDMA), 5) *N,O*-bisacrilóil-*L*-fenilalaninol, 6) 2,6 bisacrilóilaminopiridina, 7) 1,4-fenileno diacrilamida, 8) *N,N'*-1,3-fenilenebis(2-metil-2-propenamida) (PDBMP), 9) 3,5 ácido benzóico bisacrilamido.

Para que possa ocorrer a reação de polimerização do RLC em torno do complexo molde-monômero funcional é acrescentado um iniciador radicalar ao meio. Esse composto, por sua vez, sofre clivagem em sua estrutura, ou por radiação UV ou por aquecimento, para gerar radicais ($\dot{R}_0$) que iniciam o mecanismo da reação de polimerização (CORMACK & ELORZA, 2004). Na **Figura 3**, são mostrados alguns exemplos de iniciadores típicos empregados com esta finalidade.

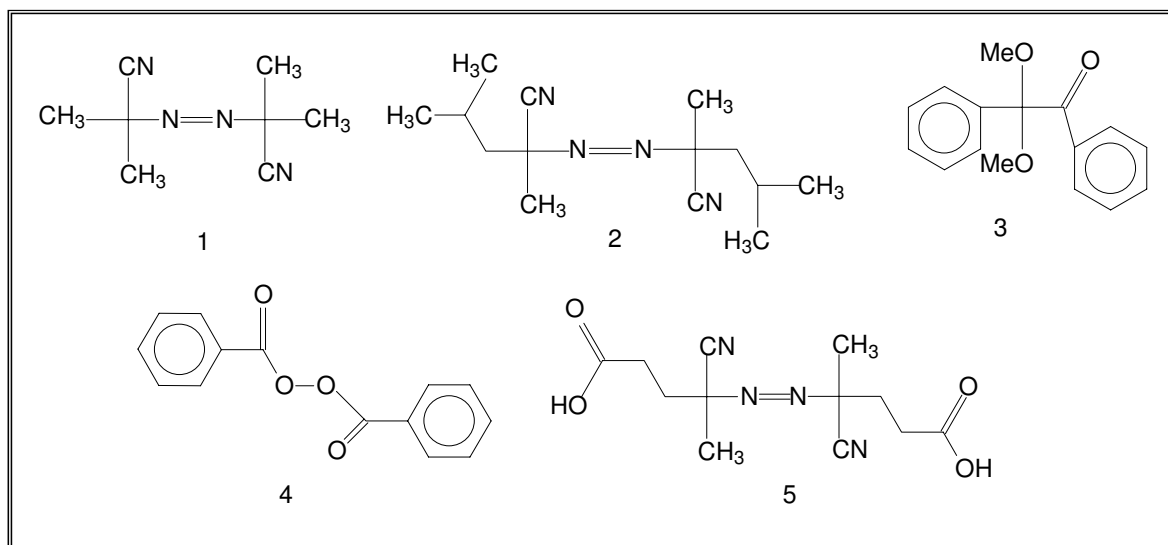


Figura 3: Exemplos de iniciadores radiculares empregados em impressão molecular. 1) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), 2) azo-bis-dimetilvaleronitrila (ABDV), 3) dimetilacetal de benzila, 4) peróxido de benzoíla (BPO), 5) ácido 4,4' azo-bis-(4-ciano pentaenóico).

Atualmente são conhecidos vários métodos de síntese dos MIP. Dentre estes, a polimerização por solução convencional tem sido o modo de preparo mais utilizado para polímeros que objetivam o uso em cartuchos para SPE (TAMAYO *et al.*, 2007; TARLEY *et al.*, 2005a; PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004). Este método consiste na adição consecutiva do molde, monômero, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar em um recipiente adequado. Posteriormente, é feita desaeração, lacre do frasco e por fim, aquecimento ou irradiação do mesmo. Como resultado obtêm-se um sólido duro que deve ser triturado e peneirado, sendo por fim lavado para a eluição da molécula molde (QIAO *et al.*, 2006). Apesar deste ser o método mais popular e simples, o processo de quebra e trituração do polímero é laborioso e produz partículas que são irregulares em forma e tamanho, provocando a perda de cerca de 70 % dos sítios de ligação, o que gera um material heterogêneo com aplicação cromatográfica reduzida (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004; QIAO *et al.*, 2006; MAHONY *et al.*, 2005).

Em vista destes fatos, foram desenvolvidas, nos últimos anos, novas metodologias de preparo de MIP com o objetivo de conferir aos polímeros propriedades físicas como tamanho, porosidade, volume de poro e área superficial mais adequadas (TAMAYO *et al.*, 2007).

A polimerização por suspensão emprega como solvente perfluorocarbono o qual permite o estabelecimento das mesmas interações que ocorrem na polimerização convencional. A reação que ocorre através de irradiação (UV) é promovida em menos de duas horas e como resultado são obtidas partículas em torno de 5 a 50 μm , dependendo da velocidade de agitação do meio e quantidade do surfactante empregado (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004).

A polimerização por precipitação é um método para a obtenção de partículas na escala de 0,3 a 10 μm . O processo é análogo ao método de solução convencional, exceto pela adição de volumes maiores de solvente que impedem a formação do monolito. A geração das partículas é baseada na precipitação de cadeias poliméricas que crescem e se tornam insolúveis no meio orgânico (TARLEY *et al.*, 2005a).

A polimerização em duas etapas requer a expansão prévia das partículas iniciais com a mistura a ser impressa. Neste caso, utiliza-se o meio aquoso para o prosseguimento da reação. Como resultado as partículas obtidas apresentam tamanho entre 2 e 50 μm (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004).

Um processo interessante é a polimerização no interior de materiais porosos como a sílica. A reação ocorre dentro dos poros do material e ao término do processo a remoção do sólido suporte e do analito são feitas por dissolução química com ácido fluorídrico (TARLEY *et al.*, 2005a).

Os MIP também podem ser sintetizados em diferentes formatos, de acordo com a finalidade que será dada ao material. Algumas destas formas e suas aplicações, apresentadas por YAN & RAMSTRÖM (2005), são mostradas no **Quadro 2**.

Quadro 2: Formatos típicos dos Polímeros de Impressão Molecular.

Formato	Aplicação
Partículas trituradas a partir de monolitos	Materiais para cromatografia
Leitos poliméricos preparados por suspensão, emulsão ou polimerização por precipitação	Leitos para cromatografia
Barras preparadas <i>in situ</i>	Materiais para cromatografia
Leitos poliméricos compostos	Materiais para cromatografia
Partículas poliméricas ligadas à camadas delgadas	Cromatografia de camada delgada
Membranas finas ou filmes	Sensores e membranas seletivas
Superfícies impressas	Sensores e materiais de separação

1.3 Aplicação dos Polímeros de Impressão Molecular em SPE

A seletividade dos MIP tem sido explorada em algumas aplicações tais como sensores, eletrocromatografia capilar, separações enantioméricas, catálise e extração em fase sólida (TARLEY et al., 2005a; YAN & RAMSTRÖM, 2005). Contudo, o uso dos MIP em SPE, através de um método conhecido como Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa (MISPE), é o principal campo de aplicação destes materiais (CARO et al. 2006a; TAMAYO et al., 2007).

A SPE é um método amplamente empregado na extração e concentração de analitos, quando os mesmos estão presentes em baixos níveis de concentração, na remoção de compostos interferentes em matrizes complexas e na mudança do meio de solubilização de um analito antes de sua análise cromatográfica. Sendo assim, a SPE é considerada um método muito importante para o preparo de amostras (YANG et al., 2006). Porém, os sorventes típicos de SPE possuem, em algumas situações, baixa seletividade o que se torna um grande empecilho quando uma extração

seletiva precisa ser realizada em uma matriz complexa, pois neste caso, substâncias interferentes de polaridade similar ao analito podem ser retidas e concentradas (YANG *et al.*, 2006; BAGGIANI *et al.*, 2001). No entanto, esta dificuldade pode ser contornada através da utilização dos MIP como fases estacionárias para SPE (ZHU *et al.*, 2005; PRADA *et al.*, 2005; SAN VICENTE *et al.*, 2004).

O MISPE funciona tal qual um procedimento de SPE convencional, exceto pela substituição das fases estacionárias comuns pelo polímero impresso. Assim, ela compreende as etapas de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição dos cartuchos (QIAO *et al.*, 2006). A Extração em Fase Sólida Molecularmente Impressa pode ainda ser realizada em dois modos distintos, que são *on-line* e *off-line*. No caso do primeiro, o polímero pode ser empacotado em cartuchos de SPE. Já no segundo, o material é acoplado à técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida. Contudo, devido à simples instrumentação requerida e condições drásticas de eluição que podem ser aplicadas, sem que haja comprometimento da instrumentação analítica, a grande maioria dos estudos publicados foi desenvolvida no modo *off-line* (CARO *et al.*, 2006a).

No modo *off-line* as etapas de condicionamento e carregamento do cartucho têm como objetivo ativar as cavidades seletivas do polímero de modo que as interações com a molécula de interesse sejam maximizadas (CARO *et al.*, 2006a). Preferencialmente, o solvente no qual as amostras serão percoladas não deve interferir nas interações formadas entre o polímero e a molécula alvo afim de que a retenção dos analitos seja a maior possível. Comumente, se a amostra é carregada no MIP em solventes de baixa polaridade, pode-se conseguir um carregamento seletivo no qual somente a molécula alvo é retida no polímero. Contudo, se o analito de interesse está presente em meio aquoso, outros compostos interferentes podem ficar não especificamente retidos no material. Conseqüentemente, para que seja alcançada uma extração seletiva deve ser realizada uma etapa de limpeza do cartucho com um solvente de baixa polaridade (QIAO *et al.*, 2006).

Na etapa de lavagem devem ser otimizadas as condições de pH, polaridade e volume de solvente, necessários para que seja feita a remoção dos compostos interferentes, sem que a molécula de interesse seja retirada dos sítios específicos de

ligação (CARO *et al.*, 2006a). Para este propósito são empregados solventes orgânicos de baixa polaridade tais como: diclorometano, tolueno e clorofórmio. Como o reconhecimento de uma molécula é melhor no solvente que foi empregado durante a síntese, pelo fato do ambiente químico estabelecido durante a confecção do material ser reproduzido, este solvente é muitas vezes empregado na etapa de lavagem, ou no caso de uma adsorção seletiva, como o solvente de eluição (QIAO *et al.*, 2006).

A última etapa a ser otimizada é a remoção da molécula de interesse dos sítios seletivos de ligação do MIP. Neste caso, devem ser determinadas as condições como: pH, polaridade do solvente e o volume do mesmo para que sejam rompidas as interações específicas formadas entre o analito e o material. Por fim, o composto de interesse pode ser quantificado através de um sistema de detecção adequado (CARO *et al.*, 2006a).

Vale lembrar que a capacidade de reconhecimento molecular do MIP deve ser avaliada em relação a um polímero não impresso (NIP), do inglês Non Imprinted Polymer. Este material é sintetizado da mesma forma que o MIP, exceto pela adição da molécula molde ao meio reacional. Desta forma, o NIP funciona como um polímero de controle uma vez que não apresenta sítios específicos de ligação (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Assim, todas as condições otimizadas devem ser aplicadas igualmente a ambos os materiais para que seja feita a verificação da seletividade do polímero impresso. Deste modo, espera-se que a etapa de lavagem seja eficiente para a remoção de todos os compostos retidos no NIP, mantendo somente a molécula de interesse nos sítios específicos de ligação do polímero impresso.

Vários estudos foram realizados nos últimos anos comprovando a utilidade do método MISPE na extração de compostos em amostras biológicas, biofluidos, tecidos, água, solo e plantas. Os recentes desenvolvimentos em impressão molecular disponibilizaram polímeros que podem ser usados na detecção de drogas, toxinas, agrotóxicos, aditivos alimentares e outros (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004). Alguns autores têm verificado que o uso do método melhora consideravelmente os cromatogramas obtidos quando os mesmos são comparados com as separações feitas por SPE convencional, uma vez que ocorrem melhorias na

limpeza e concentração dos analitos antes de sua determinação (CARO *et al.*, 2006a). Alguns exemplos de aplicação de MISPE, revisados por He e colaboradores (HE *et al.*, 2007) podem ser vistos nos **Quadros 3 e 4**.

Quadro 3: Aplicação de MISPE em amostras de interesse biológico.

Molde	Analito	Matriz
Clembuterol	Clembuterol	Urina de ovelha, ração
Tetraciclina, oxitetraciclina	Antibióticos à base de Tetraciclina	Tecido de rim de porco
Sulfametazina	Sulfametazina	Leite
Iosciamina	Escopolamina	Urina humana e de ovelha
Ceramida III	Ceramidas	Levedura
Hidrocloreto de metilformina	Metilformina	Plasma humano
Cefalexina	Cefalexina, α -aminocefalosporina	Soro humano
Atrazina	Atrazina	Carne bovina
Teofilina	Teofilina	Soro sanguíneo
7-Hidroxycoumarina	7-hidroxycoumarina	Urina
Fosfato ditolila	Fosfato difenila	Urina humana
Pentacaína	Ropivacaína, bupivacaína	Plasma humano
Bromoclembuterol	Clembuterol	Carne bovina
Fenitoína	Fenitoína e metabólitos	Plasma
Cafeína	Cafeína, teofilina, teobromina	Urina humana, café, bebida
Nicotina	Nicotina	Goma de mascar
Quercetina	Quercetina	Vinho tinto
2-Aminopiridina	4-Aminopiridina	Soro

Quadro 4: Aplicação de MISPE em amostras de interesse ambiental.

Molde	Analito	Matriz
4-Nitrofenol	4-Nitrofenol	Água
Monosulfurom	Resíduos de Monosulfurom	Amostras de solo
Dibutilmelanina	Triazina	Água
Acetato de cádmio	Cd (II)	Água de rio
Monocrotofós	Monocrotofós, Mevinfós, Fosfamido, Ometoato	Água e solo
Pentaclorofenol	Pentaclorofenol	Água de rio, água subterrânea
4-Clorofenol	4-Clorofenol, 4-Nitrofenol	Água de rio
Ni (II)	Ni (II)	Água do mar
4-Nitrofenol	4-Nitrofenol	Água
Catecol	Catecol	Água de rio e industrial
2,4,5 Ácido triclorofenoxiacético	Herbicidas e ácidos fenóxiacéticos	Água de rio
Ácido 1-naftaleno sulfônico	Naftaleno sulfonatos	Água de rio
Propazina	Triazinas	Água, solo, milho
Pirimicarb	Carbamato de pirimicarb	Água de rio e mar
Terbutilazina	Compostos de Triazina	Água de rio
Bisfenol A	Bisfenol A e compostos análogos	Água de rio
Metilfosfonato de pinacolila	Metilfosfonatos de alquila	Solo contaminado
Metacrilato de propazina	Herbicidas triazínicos	Solo e vegetais

1.4 Fenitrotona

Dentre os vários produtos disponíveis no mercado, a fenitrotona (FNT, **Figura 4**) tem sido utilizado extensivamente em todo o mundo para o controle de pragas na agricultura (BALAKRISHNAN *et al.*, 2005). No Brasil este agrotóxico é comercializado através da marca comercial Sumitrom ® sendo recomendado para o combate de pragas nas plantações de abacaxi, algodão, amendoim, arroz, cebola, alho, batata, berinjela, café, couve flor, feijão, maçã, melão, milho, figo, pêssigo, soja, trigo e tomate (ANVISA, 2007). Este composto pertence à classe de agrotóxicos organofosforados e segundo a ANVISA o valor de ingestão diária aceitável (IDA) do mesmo é de 0,005 mg/kg pc. Assim como a FNT, a grande maioria dos agrotóxicos

organofosforados é tóxica, sendo que um dos principais efeitos associados ao consumo dessas substâncias é a inibição das enzimas colinoesterases. Sua ação se dá pela inibição destas enzimas, especialmente a acetilcolinoesterase, levando a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas e desencadeando uma série de efeitos parassimpaticomiméticos (CASARETT & DOULL, 1975).

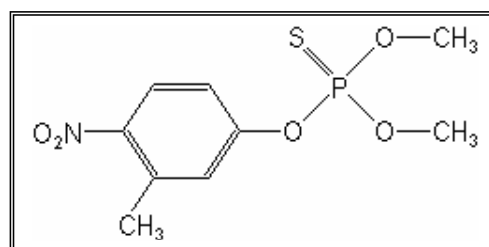


Figura 4: Estrutura da FNT.

Devido a sua solubilidade parcial na água, a FNT pode penetrar nos estratos profundos do solo e alcançar os lençóis freáticos (TOPALOV *et al.*, 2003). Em águas naturais o agrotóxico sofre fotodegradação resultando no surgimento de alguns metabólitos muito mais tóxicos, a organismos aquáticos, do que o composto inicial (DERBALAH *et al.*, 2004). Nas condições normais de pH encontradas no meio ambiente o período de meia-vida aproximado da FNT é de 50 dias, o que faz com que ele seja considerado um agrotóxico persistente (BALAKRISHNAN *et al.*, 2005). Por causa disto, alguns estudos foram realizados no intuito de acelerar sua degradação através de catálise por meio de TiO_2 , $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2$ e $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ (KORMALI *et al.*, 2004; TOPALOV *et al.*, 2003).

No caso do tomate, o LMR estabelecido para a FNT é de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (FAO, 2007). No trabalho desenvolvido por FUKUSHIMA *et al.* (2003) a extração da FNT e de seus metabólitos no tomate foi feita com 300 mL de acetona/água (4:1 v/v). O procedimento foi repetido duas vezes e os extratos foram filtrados e combinados para a determinação do agrotóxico na fase orgânica, realizada por HPLC e cromatografia em camada delgada.

Já no caso do trabalho realizado por PIZANO & BAPTISTA (1998) as amostras de tomate foram submetidas à extração com 150 mL de acetona em um

homogeneizador. Após filtração, o conteúdo foi lavado com 20 mL do mesmo solvente. Uma alíquota correspondente à metade do extrato foi coletada e os resíduos nela presentes foram submetidos à partição em 180 mL de clorofórmio. Após passagem por filtro com Na₂SO₄ anidro, o solvente foi removido e, a seguir, os resíduos foram ressuspensos em acetona. As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa.

Algumas das propriedades físicas e químicas da FNT são apresentadas no **Quadro 5** (INCHEM, 2007).

Quadro 5: Propriedades físico-químicas da FNT.

Massa Molecular	277,25 g mol ⁻¹
Nome (IUPAC)	<i>O,O</i> -dimetil <i>O</i> -(4-nitro- <i>m</i> -toluil) fosforotioato
Nomes Comerciais	Metatium, Novatium, Sumitium, Folitium
Estado físico	Líquido
Cor	amarelo
Odor	Químico
Ponto de fusão	0,3 °C
Ponto de ebulição	140-145 (1 mmHg)
Pressão de vapor	18 mPa (20 °C); 6 x 10 ⁻⁶ mmHg (20 °C)
Densidade	d ₂₅ ²⁵ 1,32-1,34; d ₄ ²⁵ 1,3227
Solubilidade em água	14 mg L ⁻¹ (30 °C)
Solubilidade em solventes orgânicos	solúvel em álcoois, ésteres, cetonas e hidrocarbontos aromáticos; > 1000 mg kg ⁻¹ em diclorometano, metanol e xileno; 193 g kg ⁻¹ em propan-2-ol e 42 g kg ⁻¹ em hexano (20-25 °C).
Estabilidade	hidrolisado por álcali: período de meia-vida de 4,5 h em NaOH 0,01 mol L ⁻¹ (30 °C), decomposto por calor a 145 °C.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho compreenderam:

- Sintetizar polímeros de impressão molecular, através da técnica de polimerização em solução convencional, em meios com diferentes polaridades utilizando a molécula da FNT como molde.
- Caracterizar o material sintetizado.
- Desenvolver o método voltamétrico para a determinação da FNT.
- Verificar, através de estudos de adsorção e determinação eletroquímica da FNT, o meio de síntese e de reconhecimento molecular no qual as interações entre o agrotóxico e a cavidade seletiva do polímero são preferencialmente formadas.
- Avaliar o MIP como fase estacionária em cartuchos de extração de fase sólida e realizar a otimização das condições de condicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição do analito.
- Avaliar a potencialidade de aplicação da técnica desenvolvida submetendo amostras de tomate fortificadas com FNT ao processo de MISPE, de acordo com as condições otimizadas, visando ao preparo destas amostras para a análise por HPLC, do agrotóxico.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

A síntese de MIP foi feita utilizando padrão de fenitrotiona (FNT, 99%) ChemService (EUA), ácido metacrílico (MAA) e etileno glicoldimetacrilato (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 feitas sempre que necessário a partir de soluções estoque de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em acetonitrila grau HPLC, J.T.Baker (EUA), armazenadas em freezer (-18°C) e protegidas de luminosidade. A estabilidade das soluções foi checada a cada mês fazendo-se a determinação do agrotóxico por voltametria de onda quadrada, empregando-se para tal as condições descritas no item **3.3.2.1.1**.

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 HCl. O monoidrogenofosfato de sódio foi adquirido da F Maia (Brasil), o ácido bórico da Merck (Alemanha), o ácido acético da Nuclear (Brasil), o ácido fosfórico da Mallinckrodt (México) e o ácido cítrico da Nuclear (Brasil).

O tampão fosfato em pH 7,75 foi preparado misturando-se soluções de ácido fosfórico e monoidrogenofosfato de sódio, ambas de concentração $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, até se alcançar o pH desejado.

O tampão Britton-Robinson (BR), na faixa de pH entre 5,00 a 8,00, 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 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a preparação do tampão citrato, pH 7,75, foram misturados 95 mL de monoidrogenofosfato de sódio diidratado $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ à 5 mL de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH do tampão foi ajustado com soluções de NaOH e HCl.

A fase móvel utilizada para a determinação cromatográfica da FNT empregou acetonitrila grau HPLC, J.T.Baker (EUA) e água purificada por sistema Milli-Q (Milipore, EUA).

3.2 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram realizadas através de um potenciostato/galvanostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE, Holanda) utilizando o programa computacional GPES para aquisição de dados. As determinações eletroquímicas da FNT foram feitas em uma cela convencional utilizando um eletrodo de mercúrio, um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3 mol L⁻¹) 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 monitoramento das soluções de lavagem dos polímeros foi realizado por um espectrofotômetro Shimadzu modelo TCC-240A (Japão).

O ajuste do pH das soluções foi realizado em um pH-metro Digimed DM-20 (Brasil).

A secagem do polímero foi feita em uma estufa Fanem (Brasil), modelo 145.

A agitação das misturas da FNT e MIP foi realizada em um agitador horizontal Fanem (Brasil), modelo 315E.

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

A homogeneização das amostras de tomate foi realizada em um homogeneizador ultra-turrax Kika T18 Basic (Brasil).

As medidas de ressonância magnética nuclear de ¹³C empregando as técnicas de polarização cruzada e ângulo mágico de rotação (C¹³ CP-MAS NMR) foram feitas em um equipamento Bruker Avance II (Alemanha) de 400 MHz com tempo de

contato de 3 μ s e intervalo de acumulações de 3 s. No caso do MIP-D (polimerizado em diclorometano) o número de acumulações foi de 286 e para o NIP-D (polimerizado em diclorometano) 755.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (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 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 porosimetria de sorção de nitrogênio foram realizadas em um ASAP 2010 da Micromeritics (EUA). As isotermas de adsorção e dessorção foram medidas a -195,5 °C. Antes das medidas as amostras foram desgaseificadas a 200 °C por 24 h sob um vácuo de aproximadamente 15 mPa.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram feitos em pastilhas de KBr 1 % no espectrofotômetro FIT-IR Bomem MB Series, (Canadá) modelo B100, em resolução de 4 cm^{-1} .

As determinações cromatográficas foram realizadas em um equipamento Waters (EUA), constituído de um sistema de bombas binárias (modelo 1525), detector de arranjo de diodos Waters 2996, injetor manual Rheodyne (modelo 7725) e alça de amostragem de 50 μ L. A aquisição dos dados foi realizada pelo programa computacional Millenium (Waters, EUA). A coluna cromatográfica empregada foi Xterra C₁₈, 20 cm x 3,9 mm com partículas de 5 μ m (Waters, EUA).

Para a realização da extração da FNT em tomate, utilizando a SPE convencional, foram empregados cartuchos octadecil de 500 mg da marca Oasis (EUA).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular

Para a síntese dos polímeros foram adicionadas, em frascos de vidro, as quantidades dos reagentes relacionados na **Tabela 1**:

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

Polímero	FNT (mmol)	Solvente (mL)	MAA (mmol)	EGDMA (mmol)	AIBN (mmol)
MIP-A	0,5	ACN 2	2	8	1,2
MIP-M	0,5	MeOH 2	2	8	1,2
MIP-D	0,5	DCM 2	2	8	1,2

FNT: fenitrotiona, MAA: ácido metacrílico, EGDMA: etileno glicol-dimetacrilato, AIBN: 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, ACN: acetonitrila, MeOH: metanol, DCM: diclorometano, MIP-A: Polímero de Impressão Molecular sintetizado em acetonitrila, MIP-M: Polímero de Impressão Molecular sintetizado em metanol, MIP-D: Polímero de Impressão Molecular sintetizado em diclorometano.

Após a adição dos reagentes os frascos foram sonicados por aproximadamente 2 minutos, purgados com N₂ por 1 minuto e aquecidos em uma placa de aquecimento por meio de um banho de silicone a 65 °C por 24 h. Ao término deste período obteve-se um sólido que foi posteriormente triturado (com auxílio de um gral e pistilo) e peneirado em uma peneira de 250 mesh. Em seguida, o material resultante foi assentado em frits previamente colocados em cartuchos vazios de SPE e foi realizada a limpeza de cada um dos polímeros com auxílio de uma

câmara de vácuo. A mistura acetonitrila/água/metanol (7:2:1, v/v/v) foi empregada para a lavagem do material até que as alíquotas eluídas e analisadas em um espectrofotômetro não apresentassem bandas de absorção entre 200 e 800 nm, indicando a ausência da FNT. Por fim, os polímeros foram secos em uma estufa a 100 °C, por um período de aproximadamente 12 h, e guardados em um dessecador.

Dois polímeros de controle também foram sintetizados exatamente como descrito anteriormente, exceto pela adição da molécula molde no meio reacional. No caso do primeiro (NIP-A) empregou-se acetonitrila como solvente de síntese e no segundo (NIP-D) diclorometano.

3.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico da fenitrotona sobre o eletrodo de mercúrio (HMDE)

O comportamento eletroquímico da FNT sobre o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) foi verificado através da técnica de voltametria cíclica empregando-se como eletrólito suporte tampão Britton-Robinson 0,10 mol L⁻¹ com pH na faixa de 3 a 12.

O estudo de influência da velocidade de varredura foi realizado na faixa de 10 a 500 mV s⁻¹ utilizando tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ em pH 4,75 e voltametria cíclica.

3.3.2.1 Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada

A determinação eletroquímica da FNT foi realizada por meio de um eletrodo de gota pendente de mercúrio, empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV). Para isso, foram otimizados os parâmetros de frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s).

Para o estudo da frequência, o valor de f foi variado entre 10 e 1000 s⁻¹, mantendo-se o incremento em 2 mV e a amplitude de onda quadrada em 50 mV.

A influência da variação da amplitude nos voltamogramas da FNT foi avaliada no intervalo de 10 a 100 mV. Neste caso utilizou-se $f = 100$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.

O incremento de varredura da voltametria de onda quadrada foi avaliado no intervalo de 1 a 10 mV. Para tal, a amplitude foi mantida em 50 mV e frequência em 100 s^{-1} . Após a otimização dos parâmetros de SWV foi construída uma curva analítica para o FNT utilizando as condições experimentais: tampão acetato $0,10\text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,75 (eletrólito suporte), $f = 250\text{ s}^{-1}$, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV. Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente calculados por $(3 \times \text{DP})/\alpha$ e $(10 \times \text{DP})/\alpha$, onde DP é o desvio padrão da curva e α o coeficiente angular da reta.

3.3.2.1.1 Determinação de fenitrotona por Voltametria de Onda Quadrada

Para a determinação de fenitrotona por SWV foram empregados um eletrodo de trabalho de gota pendente de mercúrio, um eletrodo auxiliar de Ag/AgCl e um contra eletrodo de platina. Foram utilizados 5 mL de tampão acetato $0,10\text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,75) como eletrólito suporte. As condições de determinação do analito foram: $E_{\text{inicial}} = 0$ mV, $E_{\text{final}} = -700$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, $a = 40$ mV, $f = 250\text{ s}^{-1}$, e v de 200 mV s^{-1} . A quantificação foi realizada mediante curva externa no intervalo de 3 a $9\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Todas as soluções foram desaeradas com N_2 , por um minuto, antes da análise.

3.3.3 Estudos de adsorção

Foram preparadas soluções da FNT 2 mmol L^{-1} em diclorometano/acetonitrila (DCM/ACN) nas proporções 80:20, 70:30 e 0:100 (v/v). Em seguida foram pesadas quatro alíquotas de 50 mg dos polímeros MIP-A, MIP-M, MIP-D e NIP-A. Cada amostra foi colocada em um frasco rotulado e recebeu 2 mL de uma das soluções preparadas. A seguir, os frascos foram lacrados e agitados durante 18 horas em um agitador horizontal. Ao término deste período as alíquotas do sobrenadante foram coletadas, evaporadas, ressuspendidas em acetonitrila e posteriormente analisadas

por voltametria de onda quadrada, conforme as condições descritas no item **3.3.2.1.1**.

Por fim, os polímeros utilizados durante o estudo foram lavados, com a mistura ACN/H₂O/MeOH (7:2:1, v/v/v), secos e armazenados em um dessecador sob sílica gel.

Alíquotas das soluções da FNT utilizadas no estudo de adsorção e amostras dos polímeros acrescidas do solvente de lavagem foram lacradas e agitadas por 18 horas. Após este período foi feita a quantificação do sobrenadante, por SWV, conforme o procedimento descrito no item **3.3.2.1.1**.

Para a construção das isotermas de adsorção amostras de 50 mg dos polímeros MIP-D e NIP-D foram agitadas por 18 horas com 2 mL da FNT em diferentes concentrações. Todas as soluções foram preparadas em DCM/ACN (80:20, v/v). A quantificação do sobrenadante foi feita de acordo com as condições descritas no item **3.3.2.1.1**. O ajuste dos modelos de adsorção foi realizado com auxílio do programa computacional Origin 7.5 (EUA).

3.3.4 Otimização do procedimento de MISPE

3.3.4.1 Procedimento de enchimento dos cartuchos

Para o enchimento dos cartuchos quantidades de 500 ou 250 mg do MIP-D e NIP-D foram adicionadas de 3 mL de metanol. Em seguida, cada mistura foi separadamente transferida para cartuchos de SPE que já continham um frits posicionado em sua base. Esperou-se o material assentar e o segundo frits foi cuidadosamente posicionado no topo da fase polimérica. Caso não fossem usados imediatamente, os cartuchos eram secos e armazenados em um dessecador com sílica gel. Porém, antes do procedimento de extração os cartuchos eram condicionados com 5 mL de metanol.

3.3.4.2 Estudo de condicionamento e carregamento

A otimização das condições de condicionamento e carregamento dos cartuchos foi realizada simultaneamente. Para tal, os cartuchos empacotados com 250 ou 500 mg de MIP-D foram condicionados em três etapas e, em seguida, carregados com 1 mL de uma solução padrão da FNT de concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em DCM/ACN (80:20, v/v). O eluato coletado após o carregamento foi quantificado de acordo com as condições descritas no item **3.3.2.1.1**. A vazão medida nos cartuchos foi de aproximadamente 1 mL min^{-1} .

Na primeira etapa de condicionamento dos polímeros uma solução ácida foi percolada através dos mesmos. Na segunda, utilizou-se um solvente polar e na terceira um solvente apolar. Todo o procedimento foi realizado em uma câmara de vácuo sob pressão de -5 mmHg. Entre a segunda e a terceira etapa foi aplicado vácuo de 20 mmHg nos cartuchos durante 5 minutos.

Foram testados 20 e 10 mL das seguintes soluções ácidas: acetonitrila/ácido acético (ACN/HAc, 95:5, 90:10, 85:15, v/v) e água/ácido acético ($\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$, 90:10, v/v).

No caso dos solventes polares foram testados 10 e 20 mL de metanol, acetonitrila, acetato de etila, dimetil sulfóxido, dimetil formamida e água.

No caso dos solventes apolares foram testados 10 e 20 mL de hexano, tolueno e diclorometano.

Após a quantificação da FNT no eluato os cartuchos foram lavados com metanol, secos e armazenados em um dessecador com sílica gel.

3.3.4.3 Estudo de lavagem do MISPE

Os cartuchos de MIP-D e NIP-D (contendo 500 mg de polímero cada um) foram previamente condicionados em metanol e receberam 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (90:10, v/v), 10 mL de acetonitrila e 10 mL de hexano. Foi aplicado vácuo de 20 mmHg durante 5 minutos para secagem dos polímeros entre o solvente polar e apolar e vácuo de 5 mmHg no restante do procedimento. A vazão medida nos

cartuchos foi de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Os cartuchos foram carregados com soluções de FNT $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em DCM/ACN, MeOH/ACN e $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (todas com porcentagem 80:20, v/v) e lavados com 2 mL de um determinado solvente em cada teste. Foram testados como solvente de lavagem: água, metanol, diclorometano, clorofórmio, tolueno e hexano. Após a lavagem, a FNT no eluato coletado foi quantificado de acordo com as condições descritas no item **3.3.2.1.1**. Por fim, os cartuchos foram novamente lavados com metanol, secos e armazenados em um dessecador.

3.3.4.4 Estudo de variação do conteúdo de água nos cartuchos

Os cartuchos de MIP-D e NIP-D (contendo 250 mg de polímero cada um) foram previamente condicionados em metanol e receberam 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (90:10, v/v), 10 mL de acetonitrila e 10 mL de hexano. Foi aplicado vácuo de 20 mmHg durante 5 minutos para secagem dos polímeros entre o solvente polar e apolar e vácuo de 5 mmHg no restante do procedimento. A vazão medida nos cartuchos foi de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Os cartuchos foram carregados com soluções de FNT $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (com porcentagem de água variando entre 0 e 80% v/v) e lavados com 1 mL de tolueno. A FNT no eluato coletado durante a lavagem foi quantificado de acordo com as condições escritas no item **3.3.2.1.1**. Por fim, os cartuchos foram novamente lavados com metanol, secos e armazenados em um dessecador.

3.3.4.5 Estudo de pH

Os cartuchos de MIP-D e NIP-D (contendo 250 mg de polímero cada um) foram previamente condicionados em metanol e receberam 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (90:10, v/v), 10 mL de acetonitrila e 10 mL de hexano. Foi aplicado vácuo de 20 mmHg durante 5 minutos para secagem dos polímeros entre o solvente polar e

apolar e vácuo de 5 mmHg no restante do procedimento. A vazão medida nos cartuchos foi de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Os cartuchos foram carregados com soluções de FNT $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em tampão Britton-Robinson/ACN (60:40, v/v), com pH do tampão entre 5,0 e 8,0. Os cartuchos foram lavados com 1 mL de tolueno e a FNT no eluato coletado foi quantificado de acordo com as condições descritas no item **3.3.2.1.1**. Por fim, os cartuchos foram lavados com metanol, secos e armazenados.

O estudo também foi realizado com os tampões citrato e fosfato, ambos em concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Neste caso o carregamento dos cartuchos foi realizado em pH 7,75.

3.3.4.6 Estudo de eluição

Os cartuchos de MIP-D e NIP-D (contendo 250 mg de polímero cada um) foram previamente condicionados em metanol e receberam 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (90:10, v/v), 10 mL de acetonitrila e 10 mL de hexano. Foi aplicado vácuo de 20 mmHg durante 5 minutos para secagem dos polímeros entre o solvente polar e apolar e vácuo de 5 mmHg no restante do procedimento. A vazão medida nos cartuchos foi de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Os cartuchos foram carregados com soluções de FNT $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v). Foram aplicados 10 minutos de vácuo (20 mmHg) e em seguida foi feita a primeira lavagem com 1 mL de tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v). Novamente foram aplicados 10 minutos de vácuo (20 mmHg) e posteriormente foi feita a segunda lavagem com 1 mL de tolueno. Finalizando, a eluição foi feita com DCM/HAc nas proporções 95:5 e 90:10 (v/v).

3.3.5 Estudo de eficiência de extração em meio aquoso

Os cartuchos de MIP-D e NIP-D (contendo 250 mg de polímero cada um) foram previamente condicionados em metanol e receberam 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (90:10, v/v), 10 mL de acetonitrila e 10 mL de hexano. Foi aplicado vácuo de 20

mmHg durante 5 minutos para secagem dos polímeros entre o solvente polar e apolar e vácuo de 5 mmHg no restante do procedimento. A vazão medida nos cartuchos foi de aproximadamente 1 mL min^{-1} . Os cartuchos foram carregados com soluções de FNT $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ preparadas em tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v). Foram aplicados 10 minutos de vácuo (20 mmHg) e em seguida foi feita a primeira lavagem com 1 mL de tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v). Novamente foram aplicados 10 minutos de vácuo (20 mmHg) e posteriormente foi feita a segunda lavagem com 1 mL de tolueno. Finalizando, a eluição foi feita com 3 mL de DCM/HAc (90:10, v/v). As alíquotas coletadas em cada etapa foram quantificadas de acordo com as condições descritas no item **3.3.2.1.1**.

Após as extrações os cartuchos foram regenerados, utilizando 10 mL de acetonitrila e 5 mL de metanol, secos e armazenados em dessecador sob sílica gel.

3.3.6 Aplicação do MIP no preparo de amostra visando a determinação de fenitrotona em tomate

Foram pesados 5 g de tomate orgânico adquirido no comércio local de Barão Geraldo, SP. As amostras receberam 5 mL de tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v) e foram homogeneizadas em um ultra-turrax. Em seguida, foi feita a adição de 500 μL de FNT $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e a mistura foi centrifugada por 5 minutos à 980 g. O sobrenadante foi coletado e percolado através dos cartuchos de MIP-D e NIP-D, previamente condicionados com 10 mL de $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ (90:10 v/v), 10 mL de acetonitrila e 10 mL de hexano. Após o carregamento foram aplicados 10 minutos de vácuo (20 mmHg). Em seguida, foi feita a primeira lavagem do polímero com 1 mL de tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v). Novamente foram aplicados 10 minutos de vácuo (20 mmHg) e posteriormente foi feita a segunda lavagem com 1 mL de tolueno. Finalizando, a eluição foi realizada com 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v). O eluato coletado foi evaporado até secar e ressuspenso em 1 mL de acetonitrila. A quantificação da FNT foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência empregando como fase estacionária uma coluna Xterra C₁₈ com 20 cm

x 3,9 mm e partículas de 5 μm , fase móvel de ACN/H₂O (70:30, v/v), λ = 270 nm, detector DAD e vazão de 1,0 mL min⁻¹. Os resultados foram obtidos em triplicata.

Após as extrações, os cartuchos foram regenerados com 5 mL de acetonitrila:ácido acético (90:10, v/v) e 10 mL de metanol. Os polímeros utilizados foram os mesmos empregados durante o processo de otimização do MISPE. Para tal, os cartuchos foram secos e armazenados em dessecador sob sílica gel até que fossem realizados os próximos estudos.

No segundo estudo, o procedimento de avaliação do MIP no preparo de amostra, visando à determinação da FNT em tomate, foi novamente realizado, como descrito neste item, excluindo-se a lavagem dos cartuchos com tolueno. Os resultados foram obtidos em triplicata.

Para a realização da extração da FNT em tomate, através de SPE convencional, foram empregados cartuchos octadecil de 500 mg da marca Oasis (EUA). Os cartuchos foram condicionados com 5 mL de água e 5 mL de metanol. Após o preparo das amostras de tomate, conforme descrito neste item, foi feito o carregamento dos cartuchos. Em seguida, foi feita a lavagem com 1 mL de tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v) e eluição com 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v). Os eluatos foram coletados, evaporados, ressuspensos e quantificados por HPLC, de acordo com as condições cromatográficas apresentadas neste item. Os resultados foram obtidos em triplicata.

A eficiência de extração do MIP-D, NIP-D e cartucho octadecil para as amostras de tomate fortificadas com a FNT foi calculada a partir de uma curva analítica externa, construída no intervalo de 2,5 a 38 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e as condições cromatográficas descritas neste item. Os limites de detecção e quantificação da curva foram calculados conforme descrito no item **3.3.2.1**.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos Polímeros de Impressão Molecular

O Polímero de Impressão Molecular foi sintetizado a partir de um monômero funcional ácido. A escolha do MAA justifica-se pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do ácido metacrílico (**Figura 5**) e os grupos NO_2 e fosforotioato da molécula molde da FNT (**Figura 6**).

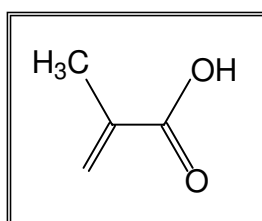


Figura 5: Estrutura do ácido metacrílico (MAA).

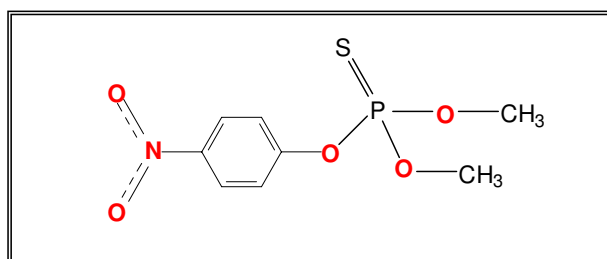


Figura 6: Estrutura da FNT e possíveis pontos de interação da FNT com o MAA (em vermelho).

Desta forma, a presença de possíveis sítios de interação entre a FNT e o MAA poderia facilitar o processo de reconhecimento molecular, uma vez que teoricamente, após o enrijecimento do polímero a cavidade impressa apresentaria maior especificidade para a FNT.

Embora o MAA não seja o único monômero funcional que possa formar ligações de hidrogênio com a FNT, o seu uso também é justificado pelo largo emprego do mesmo na impressão molecular de uma ampla variedade de moléculas (TARLEY *et al.*, 2005a; YAN & RANSTRÖM, 2005).

Conforme apresentado na **Tabela 1** (pg 27), a síntese dos polímeros foi feita empregando-se a relação molécula molde:monômero funcional na proporção de 1:4. Este excesso de MAA tem como objetivo garantir que o mesmo possa interagir com todos os sítios disponíveis da molécula molde, favorecendo a formação de cavidades impressas de maior especificidade (SPIVAK, 2005).

Como já se sabe, as interações formadas pela molécula molde e o monômero funcional são responsáveis pela formação de um complexo pré-polímero, que ocorre durante a reação de polimerização. Por se tratar de um equilíbrio, o excesso de MAA tem a finalidade de deslocar o equilíbrio no sentido de formação do complexo. Assumindo hipoteticamente que a formação de cada sítio de ligação é atribuído a uma molécula molde individual, que é rodeada por monômeros funcionais, este deslocamento no equilíbrio criaria sítios mais específicos (SPIVAK, 2005), conforme mostra a **Figura 7**.

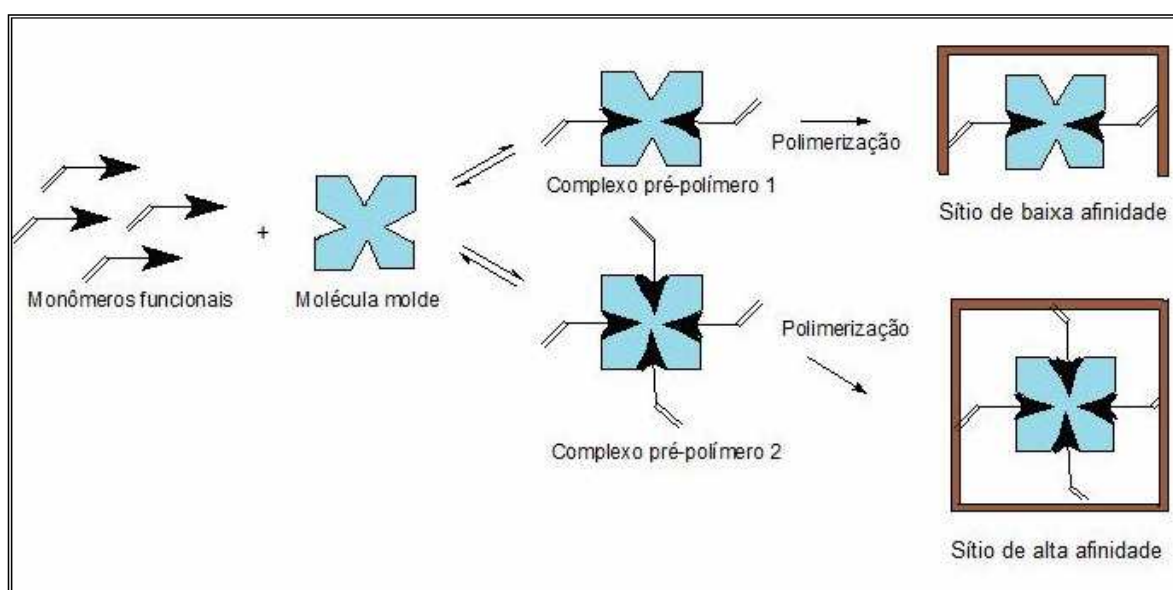


Figura 7: Representação esquemática de complexos molde-monômero funcional (adaptado de SPIVAK, 2005).

Dentre os vários reagentes de ligação cruzada, disponíveis no mercado, optou-se por utilizar o etileno glicoldimetacrilato (EGDMA) uma vez que o mesmo tem sido empregado em larga escala e com grande sucesso na síntese de MIP (AL-

KINDY *et al.*, 2000; TARLEY *et al.*, 2005a; YAN & RANSTRÖM, 2005). Conforme pode ser visto na **Figura 8** este composto apresenta duas unidades vinílicas ($\text{CH}_2=\text{CXY}$, onde X e Y representam os radicais ligados ao carbono terciário) dissubstituídas e isoladas em sua estrutura.

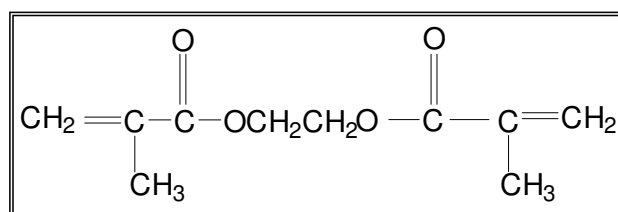


Figura 8: Estrutura do etileno glicoldimetacrilato (EGDMA).

Estes grupos vinílicos são reativos frente a radicais livres, cátions ou ânions e formam espécies de transição que podem ser adicionadas às duplas ligações. Tal processo gera um novo centro ativo e a repetição sucessiva do mesmo permite a formação do polímero (SELLERGREN, 2001). Assim, o EGDMA atua como um monômero estrutural uma vez que ele cria uma estrutura polimérica tridimensional que preserva os grupos do monômero funcional em uma posição fixa e complementar à molécula molde, garantindo rigidez e estabilidade aos sítios de ligação (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Por isto, o EGDMA deve ser utilizado em excesso em relação à quantidade de monômero funcional, a fim de que a estabilidade mecânica do material seja garantida (SPIVAK, 2005).

Desta forma, foi utilizada a relação molécula molde: monômero funcional: monômero estrutural na proporção de 1:4:20, uma vez que a mesma tem sido rotineiramente empregada em impressão molecular (TAMAYO *et al.*, 2005; TAMAYO *et al.*, 2003; MENA *et al.*, 2002).

A iniciação do processo de polimerização somente é possível quando radicais livres estão presentes no meio reacional. Estes, por sua vez, iniciam o mecanismo de síntese que ocorre por via radicalar (ALLCOCK, 1990; KROSCWITZ, 1990).

Neste sentido, a presença do iniciador 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila (AIBN) fez-se necessária uma vez que esta substância sofre reação de homólise por irradiação (através de uma lâmpada de vapor de mercúrio com emissão em 345 nm)

ou por aquecimento (a 65 °C) para gerar os radicais livres requeridos, conforme mostra a **Figura 9** (SELLERGREN, 2001).

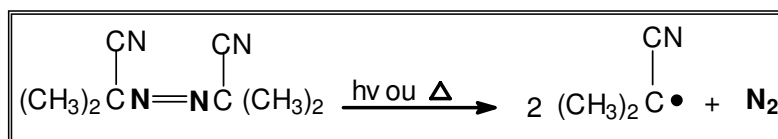
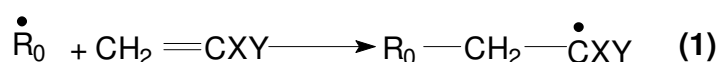
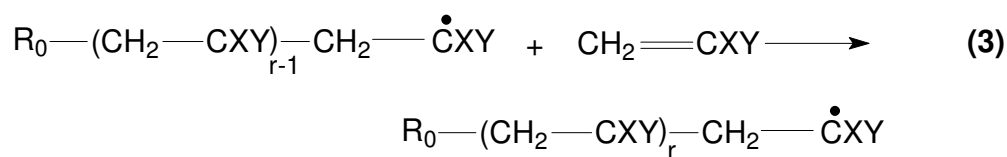
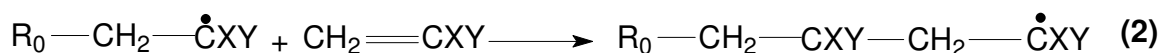


Figura 9: Reação de homólise do AIBN.

A polimerização por radical livre é realizada em quatro etapas que são: iniciação, propagação, terminação e transferência de cadeia. Na etapa de iniciação o radical livre derivado do AIBN (representado por $\dot{\text{R}}_0$) é adicionado ao grupo polimerizável do EGDMA (representado por $\text{CH}_2=\text{CXY}$) formando um centro ativo, conforme representado pela **Equação 1** (KROSCWITZ, 1990).



A etapa de propagação ou crescimento consiste na adição de moléculas de EGDMA às espécies radicais formando cadeias poliméricas lineares, como representado pelas **Equações 2 e 3** (KROSCWITZ, 1990).



onde r indica o número de unidades do monômero estrutural que foram adicionadas ao radical inicial ($\dot{\text{R}}_0$).

Na etapa de terminação, o crescimento das cadeias de polímeros é interrompido pela destruição dos radicais de propagação. Isto pode ocorrer das seguintes formas: interação de duas cadeias, reação de uma cadeia com um radical

iniciador, transferência de um centro ativo para outra molécula (que pode ser o iniciador ou monômero) e interação com impurezas (SELLERGREN, 2001).

Na etapa de transferência de cadeia as cadeias poliméricas podem transferir o radical a outras espécies e desta forma permitir a terminação da reação ou a geração de um novo radical que reagirá posteriormente (SELLERGREN, 2001).

A polimerização por radical livre é atualmente a rota sintética mais importante para a conversão de monômeros em polímeros, sendo largamente explorada pela indústria para a produção de diversos plásticos. Este método pode ser realizado em condições reacionais brandas, sendo aplicável a muitos monômeros, tolerante a impurezas no meio reacional e de baixo custo. Tais vantagens fizeram com que este fosse o método escolhido para a preparação dos Polímeros de Impressão Molecular neste trabalho.

Como a molécula de EGDMA apresenta dois grupos vinilas polimerizáveis (**Figura 8**) que reagem com cadeias poliméricas ativas, o produto final da polimerização não é linear, mas sim, um polímero no qual várias cadeias lineares estão entrecruzadas. Por isto, o EGDMA é chamado de reagente de ligação cruzada - RLC - (SELLERGREN, 2001). Em consequência das ligações químicas entre as cadeias, o polímero ganhou alta rigidez e estabilidade mecânica, características pertencentes aos MIP (CORMACK & ELORZA, 2004). Desta forma, o material obtido ao final da polimerização foi um monolito que precisou ser triturado, peneirado e lavado para a eluição da molécula molde.

Uma vez que o método de impressão molecular utilizado foi o não covalente, eram esperadas ligações de hidrogênio entre a molécula molde e o monômero funcional. Deste modo, por causa da alta constante dielétrica e capacidade de desestabilização de ligações de hidrogênio (YAN & RAMSTRÖM, 2005) a lavagem dos polímeros foi realizada com solventes polares.

Vale ressaltar que a sonicação e desgaseificação do meio reacional, feitas no início da polimerização, foram necessárias para que ocorresse a retirada de oxigênio do meio, uma vez que o mesmo retarda reações de polimerização por radical livre (CORMACK & ELORZA, 2004).

Como já se sabe, a escolha do solvente de síntese é um fator crítico para o sucesso do processo de reconhecimento molecular, uma vez que além de solubilizar todos os componentes, ele interfere nas interações entre a molécula molde e o monômero (CORMACK & ELORZA, 2004; TARLEY *et al.*, 2005a; SPIVAK, 2005). Assim, para que pudesse ser feita uma avaliação do meio no qual as interações entre a FNT e polímero impresso seriam preferencialmente estabilizadas foram feitas três sínteses: a primeira em acetonitrila, a segunda em metanol e a terceira em diclorometano.

4.2. Caracterização dos polímeros

Polímeros de Impressão Molecular são sólidos insolúveis e por isto não podem ser caracterizados por métodos geralmente empregados no caso de polímeros comuns, já que estas técnicas requerem a preparação de uma solução do material. No entanto, alguns testes podem ser realizados para que alguns aspectos químicos e morfológicos do material sejam conhecidos (CORMACK & ELORZA, 2004).

A caracterização química do polímero pode ser feita por micro análise elementar, infravermelho com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear do estado sólido. Já as características morfológicas podem ser obtidas através da microscopia de varredura eletrônica, porosimetria de sorção de nitrogênio e porosimetria de intrusão de mercúrio (CORMACK & ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005).

No estudo em questão somente os polímeros MIP-D e NIP-D foram caracterizados, já que os mesmos foram escolhidos para o uso em cartuchos, conforme a ser apresentado no item 4.5.

4.2.1 Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de FT-IR, obtidos em pastilhas de KBr, para o MIP-D e NIP-D são mostrados na **Figura 10**.

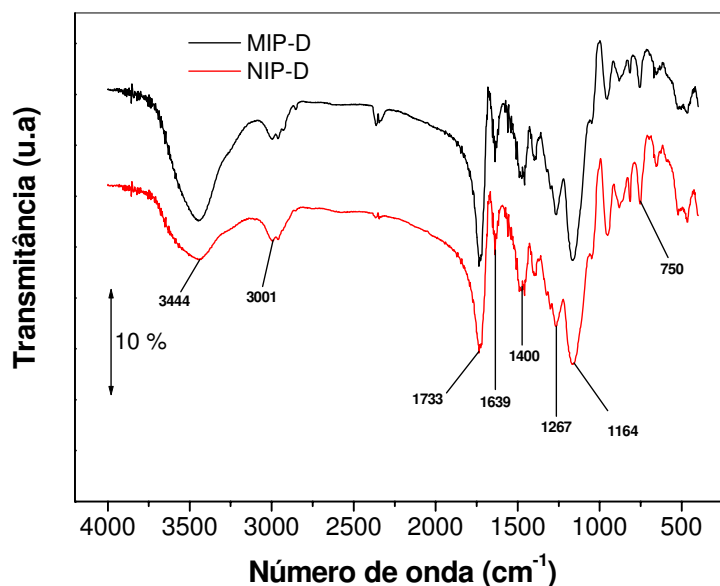


Figura 10: Espectros de FT-IR (KBr) do MIP-D e NIP-D.

As bandas assinaladas na **Figura 10** são as seguintes: 3444 cm^{-1} → estiramento OH do grupo COOH monomérico, 3001 cm^{-1} → estiramento OH do grupo COOH dímero, 1733 cm^{-1} → estiramento CO do grupo éster e COOH, 1639 cm^{-1} → estiramento C=C (grupos vinila não reagidos), 1400 cm^{-1} → deformação angular -O-CH₂, 1267 → deformação angular C-O do grupo éster, 750 → deformação angular fora do plano do grupo CH (vinila). A banda fraca vista no MIP-D em aproximadamente 2500 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O da molécula de CO₂.

Pode-se observar na **Figura 10** que não são caracterizadas diferenças no que diz respeito à composição química dos polímeros MIP-D e NIP-D. Este fato é esperado uma vez que ambos materiais foram sintetizados da mesma forma, exceto pela adição da molécula molde ao polímero de controle. Portanto, este é um indício de que a lavagem do MIP-D foi eficiente para a remoção da FNT e de que não houve incorporação da molécula à estrutura polimérica. Outro aspecto que confirma esta afirmação é a ausência, no espectro do polímero impresso, de picos intensos em 1553 e 1347 referentes às deformações axial assimétrica e simétrica de grupo NO₂ ligado ao anel aromático da FNT.

4.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C com Polarização Cruzada e Ângulo Mágico de Rotação

Por se tratarem de materiais insolúveis, as informações a respeito dos diferentes tipos de carbono, encontrados nos polímeros impresso e de controle, foram obtidas através de ressonância magnética nuclear do estado sólido. Neste caso, foi empregada a técnica de polarização cruzada com ângulo mágico de rotação (CP-MAS). As ressonâncias, mostradas nas **Figuras 11 e 12**, em torno de 20-80 ppm são referentes à grupos metila e metileno presentes no EGDMA e MAA, entre 100-130 ppm são devidas à duplas ligações não reagidas do EGDMA e picos por volta de 160-180 ppm são atribuídos à diferentes grupos C=O que podem ser encontrados no EGDMA/MAA (SELLERGREN, 2001; COURTOIS *et al.*, 2006).

Conforme pode ser visto nas **Figuras 11 e 12**, ambos espectros apresentaram o mesmo perfil, o que reafirma a igualdade química dos dois materiais.

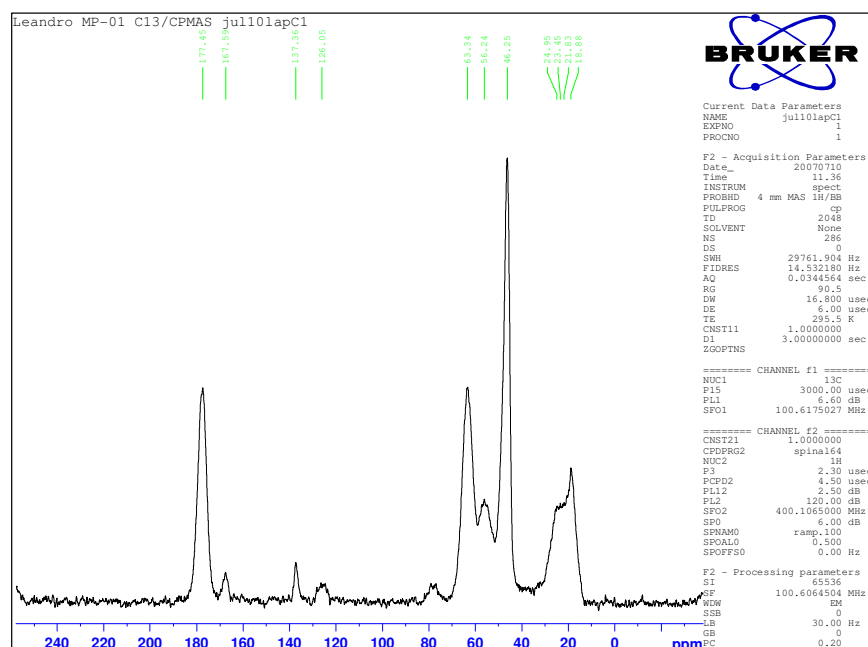


Figura 11: ^{13}C CP-MAS NMR do MIP-D.

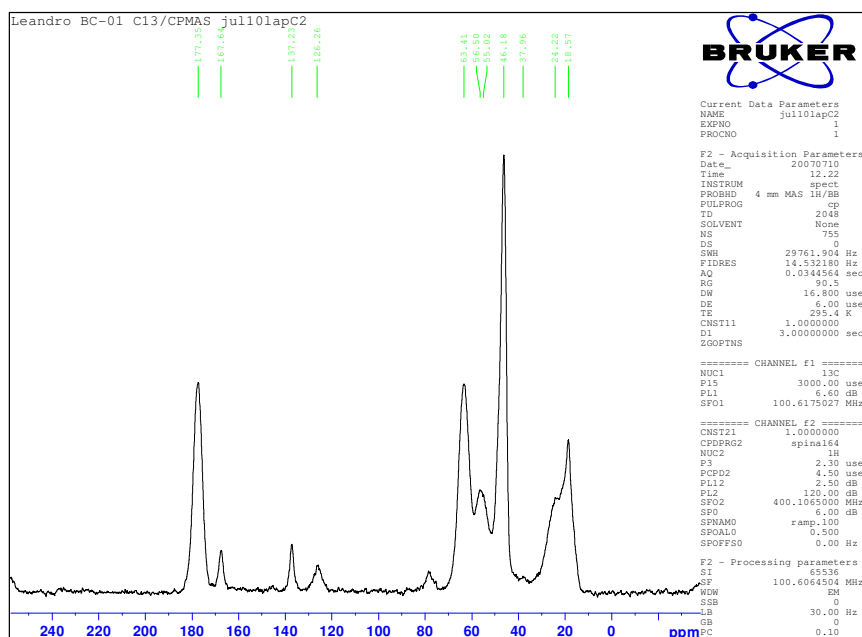


Figura 12: ^{13}C CP-MAS NMR do NIP-D.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Porosimetria de Sorção de Nitrogênio

Conforme pode ser visto nas **Figuras 13 e 14**, tanto o polímero impresso quanto o de controle apresentaram partículas de tamanhos não uniformes. Estas irregularidades foram causadas pelo processo de trituração dos materiais, já que após a síntese os mesmos foram obtidos na forma de um monolito que precisou ser quebrado.

Atualmente, a grande maioria dos trabalhos publicados emprega a polimerização por solução convencional, devido ao fato deste método ser simples, barato e requerer uma única etapa de síntese. Contudo, a presença de partículas irregulares, que embora não seja descrita como problema quando o polímero é utilizado em SPE, torna o material inadequado para o enchimento de colunas cromatográficas (PÉREZ-MORAL & MAYES, 2004; QIAO *et al.*, 2006; MAHONY *et al.*, 2005).

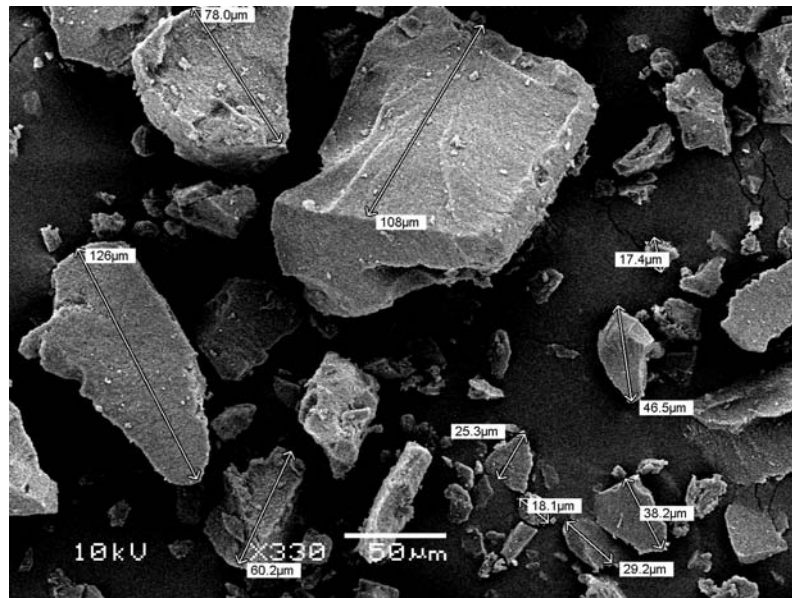


Figura 13: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do MIP-D (aumento de 330 vezes).

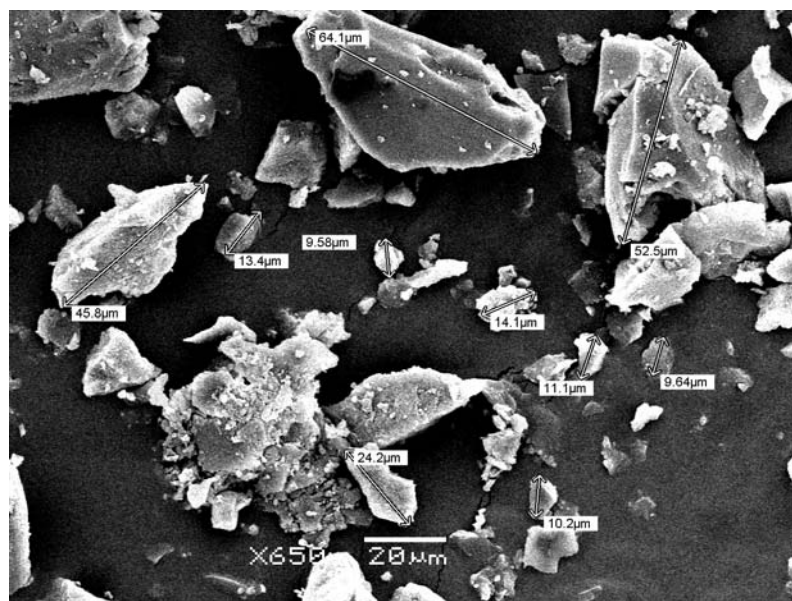


Figura 14: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do NIP-D (aumento de 650 vezes).

Embora o MIP-D e NIP-D tenham sido polimerizados da mesma forma, exceto pela não adição da molécula molde durante a polimerização do polímero de controle, os dois materiais apresentaram morfologias diferentes, uma vez que a superfície do NIP-D mostrou-se mais escamada quando comparada com o polímero impresso (**Figuras 15 e 16**).

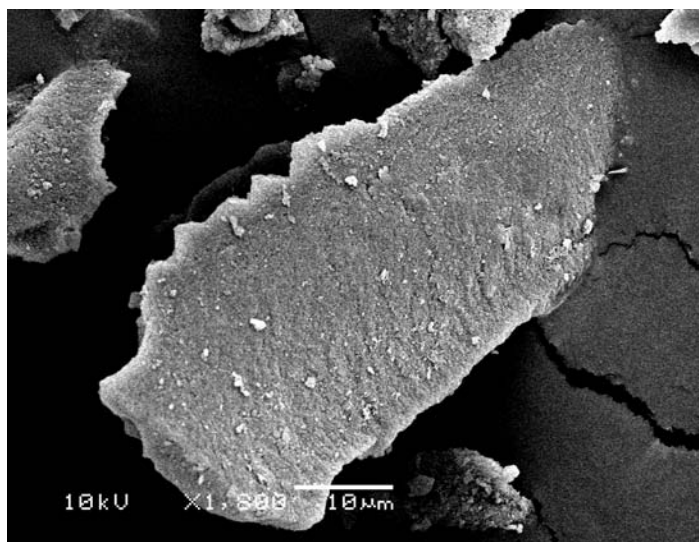


Figura 15: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do MIP-D (aumento de 1800 vezes).

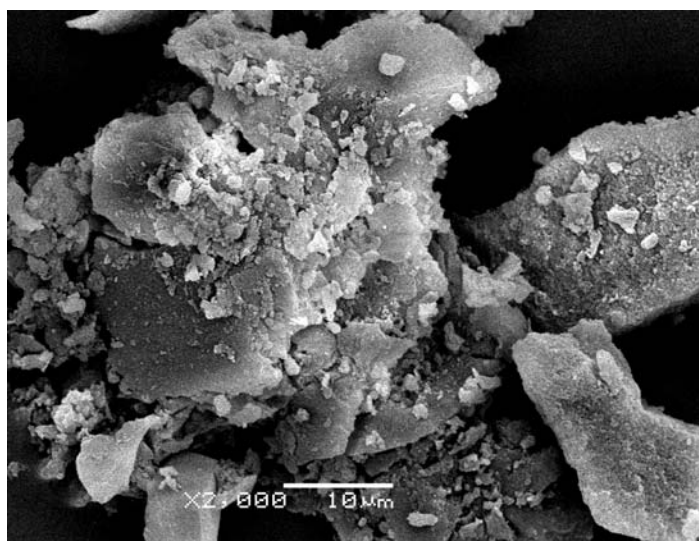


Figura 16: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do NIP-D (aumento de 2000 vezes).

A diferença na porosidade dos materiais foi nítida. Conforme mostram as **Figuras 17 e 18** o MIP-D apresentou-se mais granuloso e poroso do que o polímero de controle. Por causa desta característica os polímeros impressos possuem maiores áreas superficiais do que os polímeros não impressos (FARRINGTON & REGAN 2007).

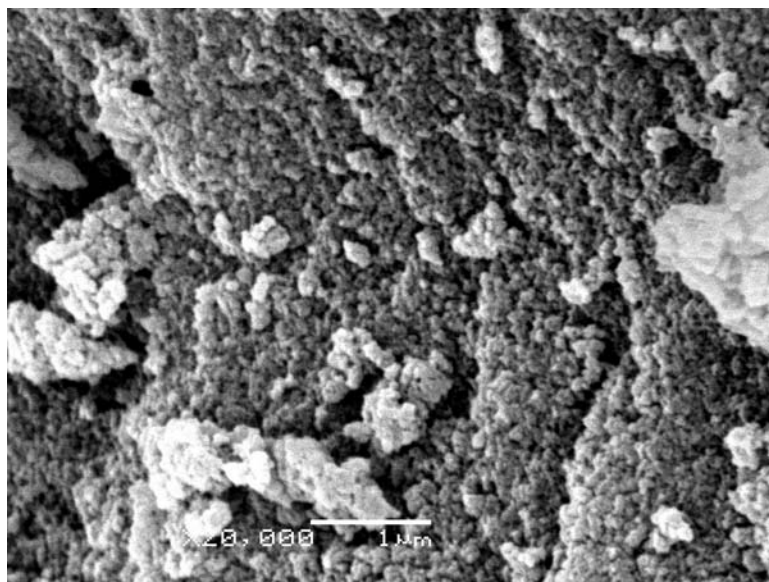


Figura 17: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do MIP-D (aumento de 20000 vezes).

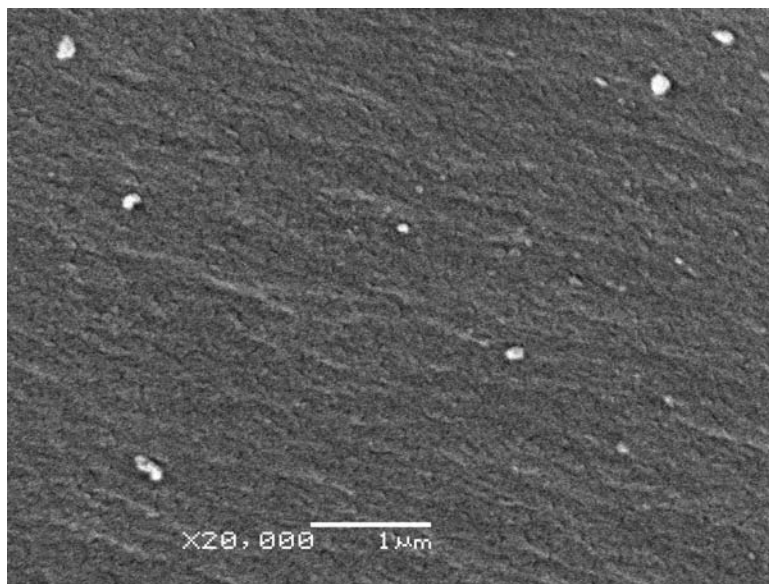


Figura 18: Imagem de microscopia de varredura eletrônica do NIP-D (aumento de 20000 vezes).

A diferença na porosidade dos materiais foi confirmada através dos ensaios de porosimetria de sorção de nitrogênio, empregando o método BET (**Tabela 2**). Este método consistiu na exposição de uma massa fixa do MIP-D e NIP-D a diferentes pressões de nitrogênio. Em seguida, a quantidade de gás sorvido foi medida em função da pressão do mesmo. Foram então construídas isotermas de sorção que forneceram informações a respeito da área superficial, volume e diâmetro médio dos poros de ambos polímeros. Infelizmente, como o método de BET requer cerca de 500 mg de material, para a realização dos testes, a determinação das porosidades do MIP-A e MIP-M não puderam ser feitas, já que os mesmos haviam sido sintetizados em pequena escala e a fenitrotona disponível não foi suficiente para sínteses posteriores.

Tabela 2: Porosimetria dos polímeros impresso e de controle.

Polímero	Área superficial (m ² /g)	Volume do poro (cm ³ /g)	Diâmetro médio do poro (Å)
MIP-D	77,5	0,155	80,0
NIP-D	41,8	0,0710	67,8

Os resultados apresentados na **Tabela 2** confirmam que os polímeros impressos tendem a ter áreas superficiais e volume de poros maiores do que os polímeros de controle, como consequência dos sítios de ligação distribuídos através do material (FARRINGTON, 2007).

A morfologia do MIP-D, mostrada na **Figura 17**, é originada de um núcleo, que cresceu até 10-30 nm de diâmetro, e se agregou a outros núcleos para formar microesferas com diâmetro de 100-200 nm. Em seguida, a agregação das microesferas gerou clusters que formaram o corpo do polímero. A porosidade e área superficial resultantes foram criadas por vazios localizados entre os clusters de microesferas. Estes vazios são formados pelos macroporos com diâmetro entre 50 e 1000 nm, pelos mesoporos (criados pelo espaço intersticial entre os clusters), com diâmetro de 2 a 50 nm, e pelos microporos (localizados dentro das microesferas)

com diâmetro menor que 2 nm (SPIVAK, 2005), conforme esquematizado na **Figura 19**.

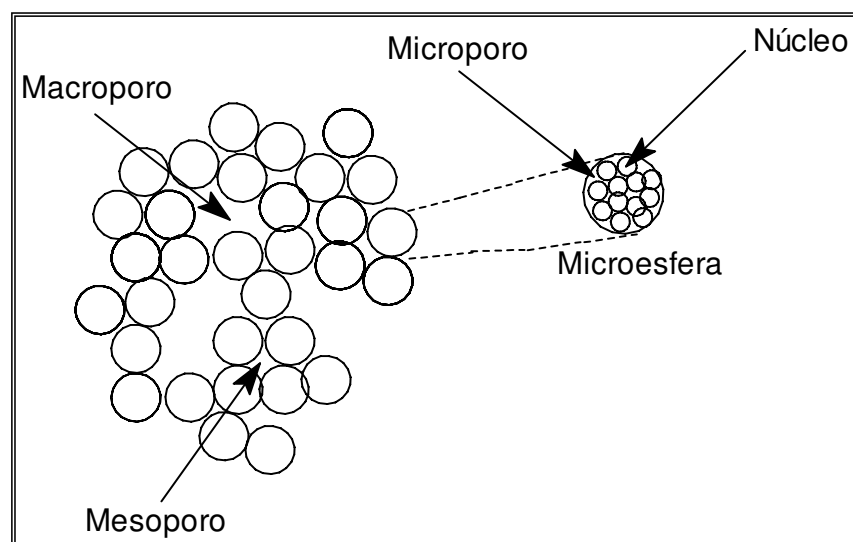


Figura 19: Morfologia dos Polímeros de Impressão Molecular (adaptado de SPIVAK, 2005).

4.3 Estudo do comportamento eletroquímico da fenitrotiona sobre o eletrodo de mercúrio

Para avaliar e otimizar as condições de extração da FNT através do MISPE foi necessário selecionar um método analítico que fosse rápido e permitisse a determinação do analito em baixas concentrações. Como nesta etapa de trabalho a seletividade não era importante, uma vez que o MISPE seria otimizado mediante o uso de soluções padrão de FNT, a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) foi selecionada para a determinação do analito. Para tal, foi inicialmente feito o estudo do comportamento eletroquímico da FNT sobre o eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE), usando a voltametria cíclica e posteriormente foram otimizados os parâmetros da técnica de SWV.

Em estudos realizados por MELGAR & MACHADO (2005) foi verificada a capacidade de redução eletroquímica da FNT sobre um eletrodo de mercúrio, o qual

produziu um pico catódico em -0,63 V vs Ag/AgCl em tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,5. Entretanto, como não é adequado trabalhar em pH muito elevado, usando o eletrodo de mercúrio, foram feitos novos testes para a avaliação da resposta eletroquímica da FNT em função do pH, conforme mostra a **Figura 20**.

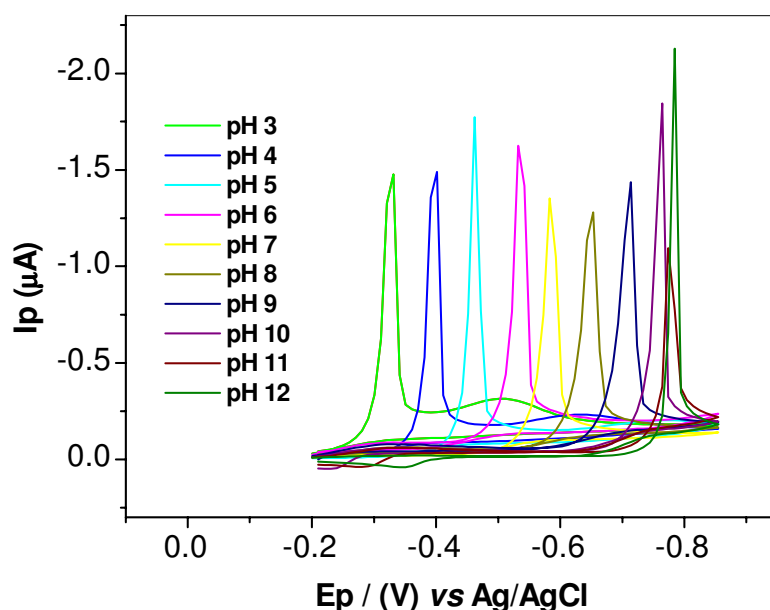
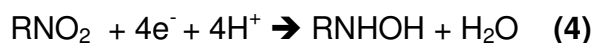


Figura 20: Voltamogramas cíclicos para a redução da FNT sobre o eletrodo de mercúrio (HMDE) em tampão Britton-Robinson 0,10 mol L⁻¹ de pH 3 a 12. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser visto na **Figura 20**, o processo de redução da FNT é irreversível em toda a escala de pH estudada. O formato simétrico dos picos sugere a presença de fenômenos de adsorção. Verifica-se também, que o comportamento voltamétrico da FNT é dependente do pH. O aumento do pH do meio provoca um deslocamento do potencial de pico (E_p) para valores mais negativos, indicando que a redução é dificultada. Segundo Ni e colaboradores (NI *et al.*, 2004) este comportamento é devido à redução irreversível do grupo NO₂ da FNT para hidroxilamina, **Reação 4**:



A dependência da corrente de pico (I_p) com o pH é confirmada através do gráfico I_p vs pH, **Figura 21**.

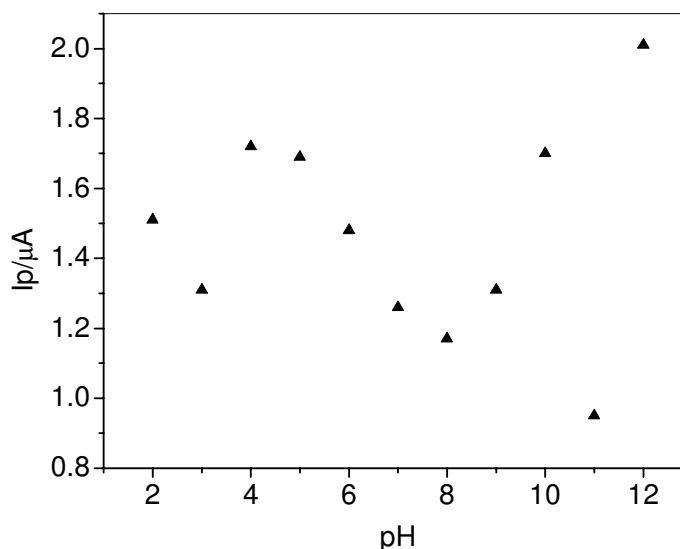


Figura 21: Relação entre I_p e o pH.

Conforme é observado na **Figura 21** a corrente de pico depende do pH no intervalo estudado. Com o aumento do pH entre o pH 5 e 8 verifica-se uma diminuição da corrente de pico, comportamento característico para a redução do grupo nitro para hidroxilamina (**Reação 4**). Esses resultados indicam que uma reação química ácido-base antecede a transferência de carga. Em pH ácido a corrente de pico deveria independe da concentração de prótons em solução, uma vez que esta se encontra em elevada concentração. No entanto, foi verificada uma menor intensidade da corrente de pico em pH 3. Tal comportamento também foi observado por RATH & HOFFMANN (1997) na redução de compostos nitroalogenados e pode ser justificado pela influência de ânions do eletrólito suporte e da variação da capacidade tamponante do meio, já que em processos adsorptivos a composição do eletrólito suporte e a força iônica podem influenciar significativamente o processo eletroquímico (RATH & HOFFMANN, 1997). Para confirmar se a variação da intensidade da corrente de pico observada é apenas consequência da mudança do pH ou se é influenciada pela concentração dos ânions, deveriam ser feitos estudos

adicionais. Contudo, uma vez que o objetivo não era estabelecer o mecanismo eletroquímico, mas sim desenvolver um método analítico, esses estudos não foram realizados.

A dependência do E_p da FNT em função do pH é apresentada na **Figura 22**.

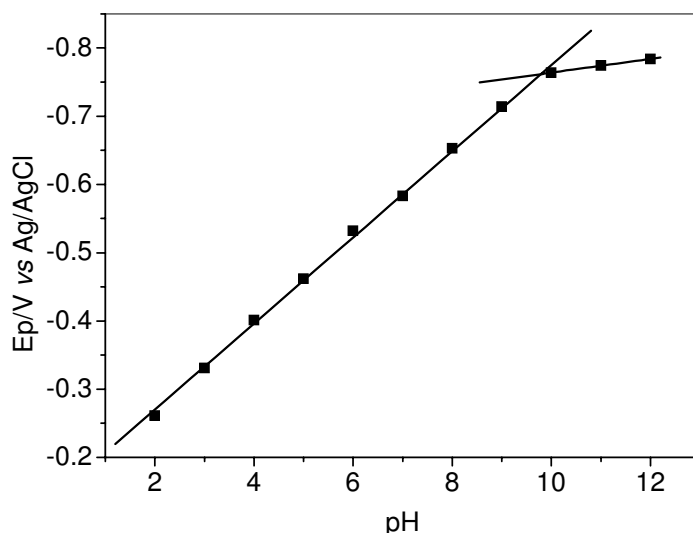


Figura 22: Relação entre E_p e o pH.

Conforme pode ser visto na **Figura 22**, entre os valores de pH 2 e 10 foi observada uma relação linear entre o potencial de pico e o pH, apresentando a equação de reta: $E_p = -0,14373 - 0,0631\text{pH}$. Contudo, a partir do pH 10, o processo passa a não depender da concentração hidrogeniônica da solução.

Embora as correntes de pico (I_p) mais altas tenham sido obtidas nos valores de pH 5, 10 e 12, optou-se por trabalhar na região mais ácida para que não houvesse comprometimento à estabilidade da gota de mercúrio no capilar de vidro. Como o tampão acetato possui máxima capacidade tamponante no pH 4,75 (por ser este o valor do pK_a do ácido acético) o mesmo foi empregado para a continuação dos estudos.

Os voltamogramas cíclicos da FNT em função da velocidade de varredura (v) podem ser observados na **Figura 23**. Com o aumento da velocidade de varredura houve aumento no I_p e deslocamento do potencial de pico para valores mais negativos.

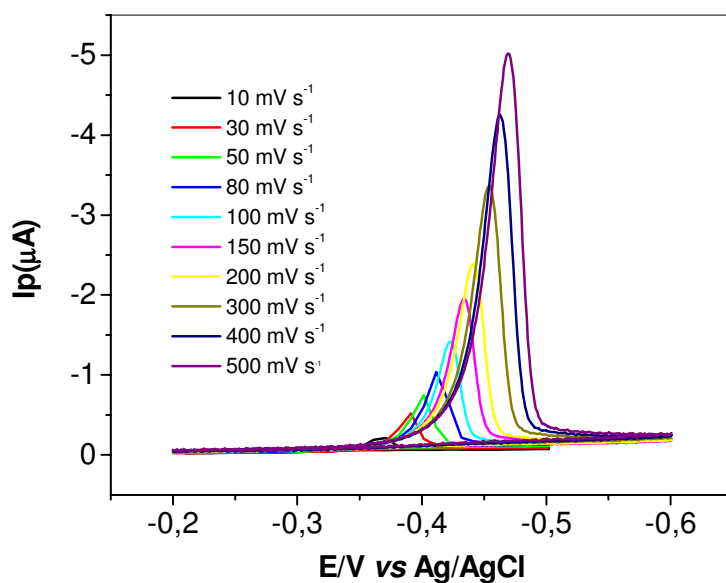


Figura 23: Influência da variação da velocidade de varredura no voltamograma da FNT em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹, pH 4,75.

Plotando-se I_p em função de v e em função da raiz quadrada de v (ambos valores retirados da **Figura 23**), nota-se que a corrente de pico não variou linearmente com a velocidade de varredura e com $v^{1/2}$, indicando desta forma que o processo é controlado tanto por adsorção quanto por difusão.

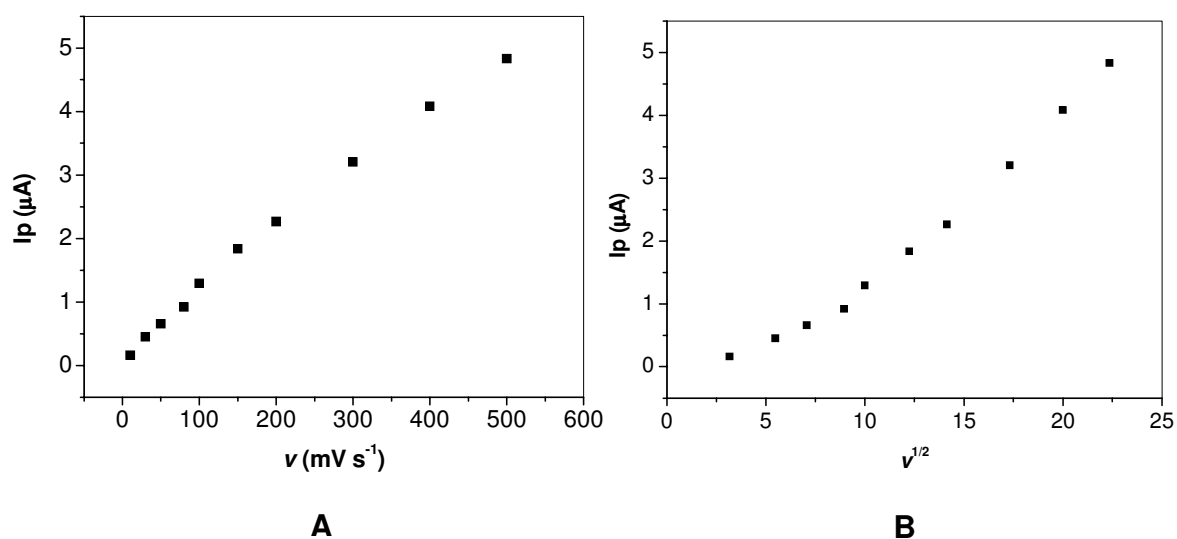


Figura 24: (A) Dependência de I_p com a velocidade de varredura (B) dependência de I_p com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

A característica adsorptiva do processo foi evidenciada também pelo gráfico de logaritmo da intensidade da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (a partir dos valores retirados da **Figura 23**). Neste caso, o gráfico (**Figura 25**) apresentou comportamento linear com inclinação de 0,87; valor próximo do previsto pela literatura (no caso 1,0) para sistemas controlados pela adsorção de espécies (GOSSER JR, 1993).

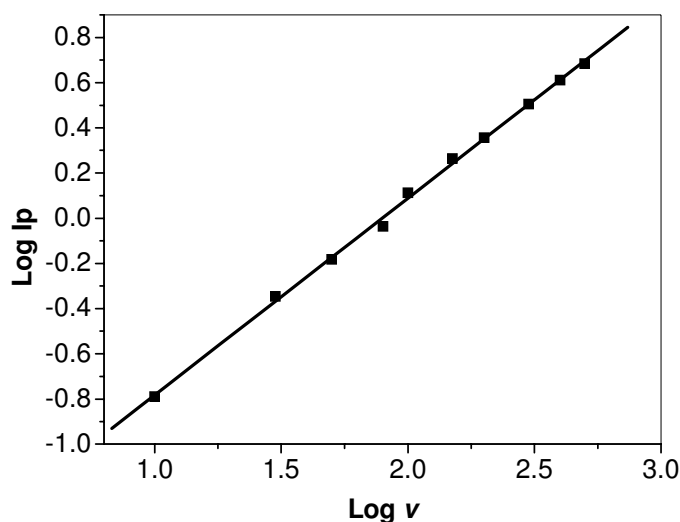


Figura 25: Dependência do logaritmo da corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura da FNT.

4.4 Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada

Para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica faz-se necessária a otimização dos parâmetros que podem influenciar a resposta voltamétrica. Desta forma, foram otimizados a frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s).

A frequência de onda quadrada é um dos parâmetros mais importantes da SWV, pois é ela que determina a intensidade dos sinais e, conseqüentemente, a sensibilidade do método.

A partir dos voltamogramas da **Figura 26** nota-se que com o aumento da frequência de onda quadrada, entre 10 e 400 s^{-1} , ocorreu um aumento na corrente de pico e deslocamento de E_p para valores mais negativos.

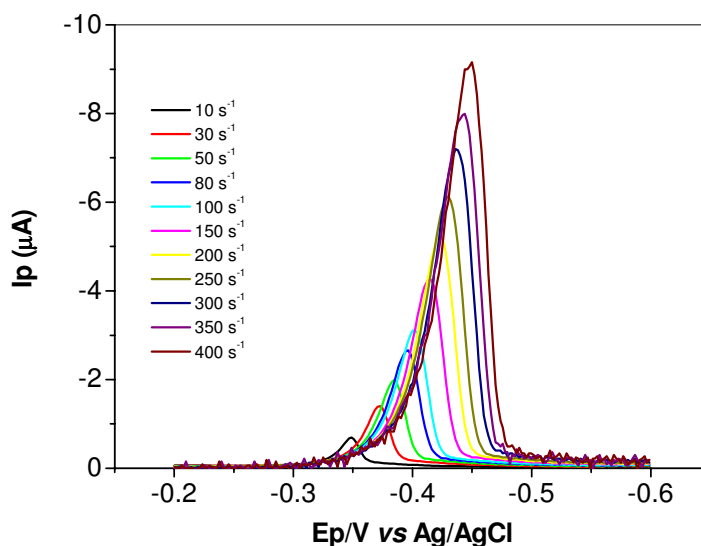


Figura 26: Influência da variação da frequência de onda quadrada no perfil dos voltamogramas da FNT. Condições experimentais: tampão acetato 0,10 mol L^{-1} em pH 4,75, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

A relação entre I_p e a frequência da onda quadrada é linear (**Figura 27**). Segundo a teoria proposta por OSTERYOUNG & O'DEA (1982) este fato caracteriza sistemas irreversíveis com processo controlado pela adsorção das espécies, o que vem corroborar com os resultados obtidos durante o estudo do comportamento eletroquímico da FNT sobre o eletrodo de mercúrio usando a voltametria cíclica (item 4.3), os quais indicam um processo controlado por adsorção e difusão das moléculas de FNT.

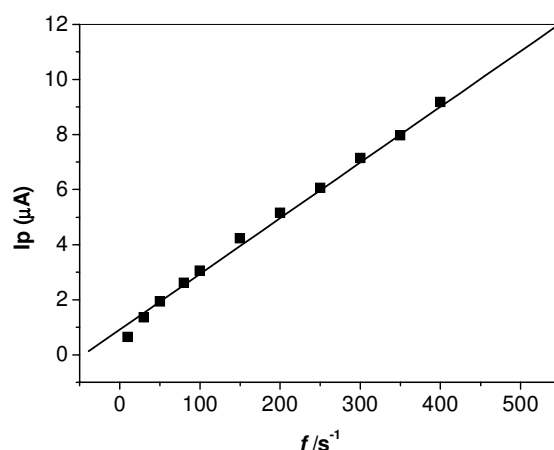


Figura 27: Dependência da corrente de pico com a frequência de onda quadrada para a FNT.

Para sistemas redox totalmente irreversíveis a sensibilidade obtida pela voltametria de onda quadrada sofre grande influência com a variação da amplitude da onda, isto porque a largura de meia onda se mantém constante para amplitudes maiores do que 50 mV. Por isto, a amplitude de pulso é um dos parâmetros a serem avaliados na SWV para a otimização do método (SOUZA *et al.*, 2003).

Na **Figura 28** são apresentados os voltamogramas obtidos para a FNT em função da variação da amplitude da onda quadrada.

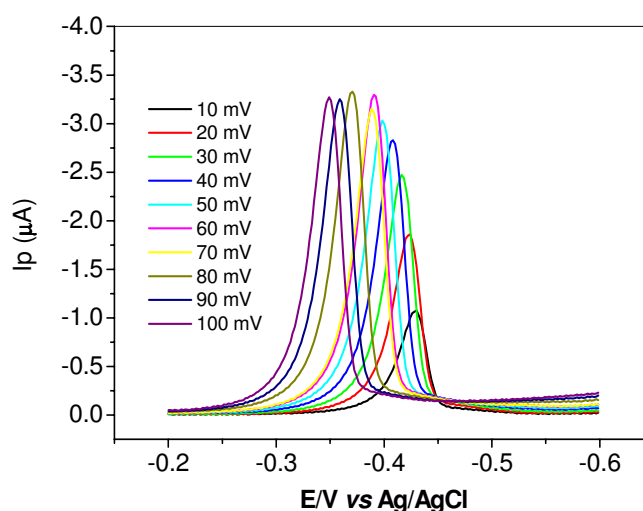


Figura 28: Influência da variação da amplitude da onda quadrada no perfil dos voltamogramas da FNT. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ em pH 4,75, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Através da **Figura 28** pode-se verificar que o aumento da amplitude promove um deslocamento dos potenciais de pico para valores mais positivos e que a corrente de pico se mantém praticamente constante para valores de amplitudes acima de 60 mV. Embora os valores de I_p sejam máximos a partir deste valor, preferiu-se trabalhar com amplitude de onda quadrada de 40 mV uma vez que ela está dentro do intervalo no qual I_p apresentou uma relação linear com a amplitude, conforme mostra a **Figura 29**.

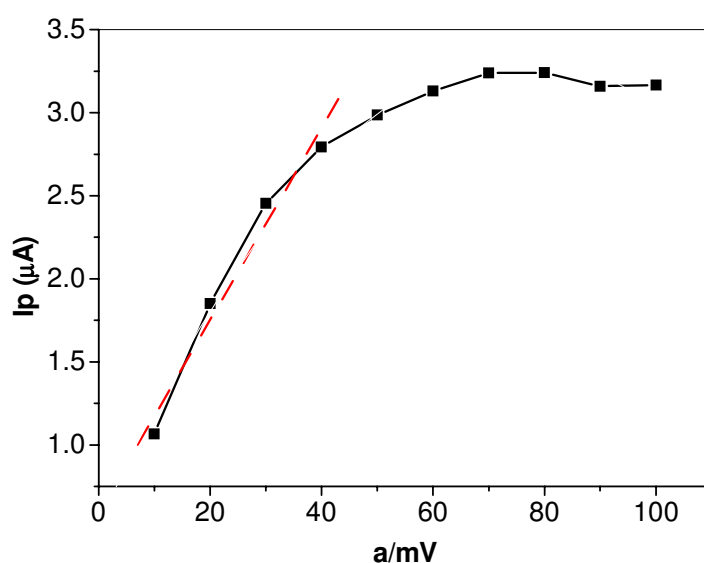


Figura 29: Dependência da corrente de pico com a variação da amplitude de onda quadrada.

O terceiro parâmetro avaliado foi o incremento de varredura. Uma vez que a velocidade efetiva da voltametria de onda quadrada é resultado do produto da frequência pelo valor de ΔE_s , um aumento no incremento de varredura pode aumentar o sinal obtido e, conseqüentemente, melhorar a sensibilidade do método. Porém, incrementos maiores podem acarretar em alargamento dos picos e comprometimento da resolução dos picos.

Os voltamogramas de onda quadrada obtidos em função da variação de ΔE_s são mostrados na **Figura 30**.

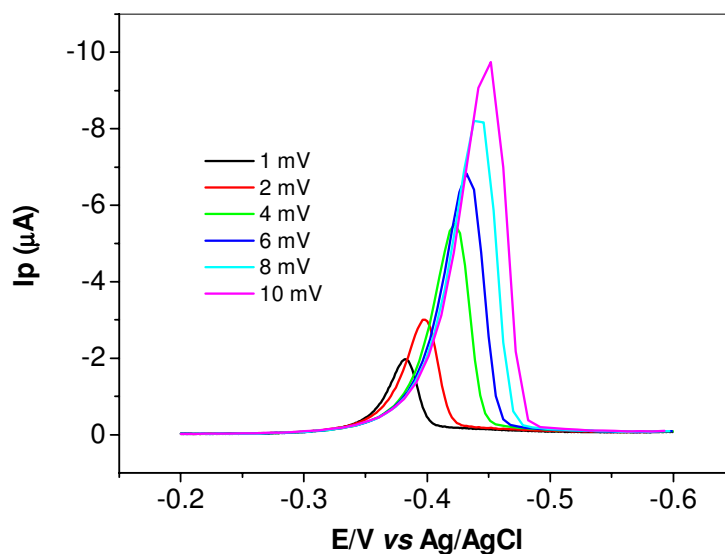


Figura 30: Voltamogramas de onda quadrada para a FNT. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ e pH 4,75, $a = 50$ mV e $f = 100$ s⁻¹.

Conforme pode ser observado na **Figura 30** houve deformação dos voltamogramas para valores de ΔE_s acima de 6 mV. Deste modo, optou-se trabalhar com o valor de 4 mV para que não houvesse comprometimento do sinal analítico.

Estabelecidas as melhores condições para a determinação da FNT como frequência da onda quadrada (250 s⁻¹), amplitude (40 mV) e incremento de varredura (4 mV) foi feita a construção da curva analítica da FNT (**Figura 31**).

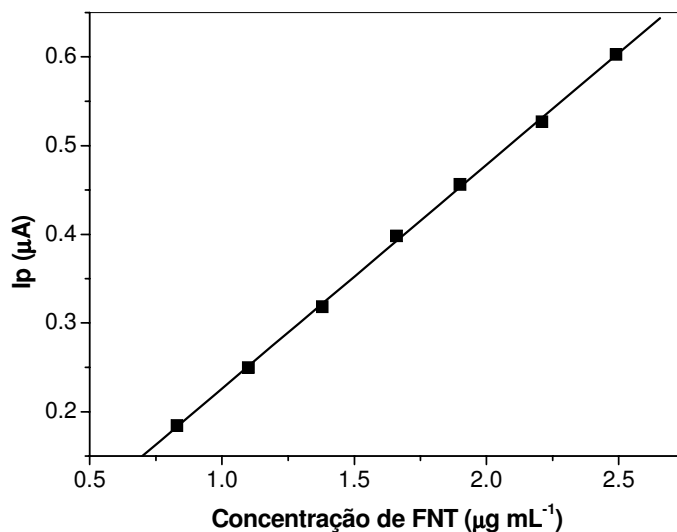


Figura 31: Curva analítica para a FNT utilizando SWV e HMDE. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ em pH 4,75, $f = 250$ s⁻¹, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV.

A curva analítica mostrada na **Figura 31**, cuja equação é $I_p = -0,266 + 1,392 \times C_{FNT}$, onde C_{FNT} é a concentração de fenitrotiona, apresentou uma sensibilidade de 0,0696 A/ mol L⁻¹ e linearidade de 0,9996 no intervalo de concentração estudada. Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 0,09 µmol L⁻¹ e 0,33 µmol L⁻¹, respectivamente.

Os voltamogramas de onda quadrada referentes às concentrações de FNT, obtidas através da curva analítica, são mostrados na **Figura 32**. Observa-se que a corrente de pico aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração e que ocorreu um deslocamento do potencial de pico indicando a característica adsorptiva do processo.

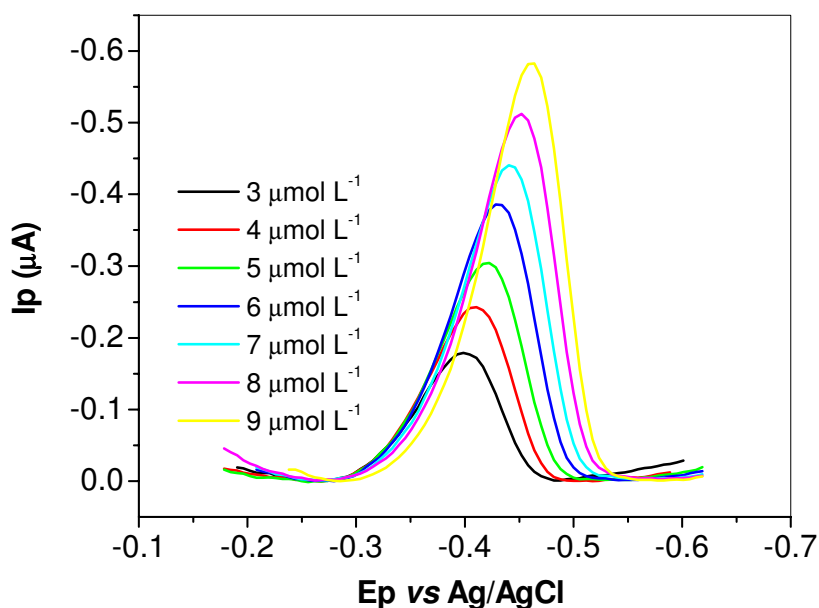


Figura 32: Voltamogramas de onda quadrada para a FNT em diferentes concentrações. Condições experimentais: eletrólito suporte: tampão acetato 0,10 mol L⁻¹ em pH 4,75, $f = 250 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

4.5 Estudos de adsorção

Os estudos de adsorção, conforme descrito no item **3.3.3** (pág 34), foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade de reconhecimento molecular dos polímeros, sintetizados em diferentes solventes porogênicos e verificar em qual material a retenção da FNT seria mais favorecida. Para tal, a adsorção do analito foi estudada em 3 meios de polaridades distintas. A quantidade de FNT adsorvida (Ad) pelo MIP-A (polimerizado em acetonitrila), MIP-M (polimerizado em metanol), MIP-D (polimerizado em diclorometano) e NIP-A (polimerizado em acetonitrila) foi estimada através da **Equação 5**:

$$Ad = I - F \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

Ad é a concentração de FNT adsorvida pelo polímero (mmol L⁻¹);

I é a concentração inicial da solução (no caso 2 mmol L^{-1});

F é a concentração de analito livre (mmol L^{-1}).

A porcentagem de FNT adsorvida foi calculada através da **Equação 6**:

$$FNT(\%) = \left(\frac{Ad}{I} \right) \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Os resultados do estudo de adsorção são mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Porcentagem de FNT adsorvida.

Polímero	% de diclorometano em acetonitrila (v/v)		
	0	70	80
NIP-A	nd	32	7
MIP-A	nd	55	17
MIP-M	nd	nd	nd
MIP-D	nd	nd	29

Como pode ser notado na **Tabela 3**, a presença de um meio muito polar, que neste caso continha 100 % de acetonitrila, provocou total desestabilização das interações entre a FNT com os polímeros impressos e o polímero de controle. Desta forma, não foi verificada a retenção da molécula em nenhum dos quatro materiais. Embora a acetonitrila seja um solvente aprótico e, portanto, com baixa capacidade de formação de ligações de hidrogênio, a grande solubilidade da FNT neste meio foi responsável pela não adsorção do analito. De acordo com CAI & GUPTA (2004) quando as interações entre a molécula e o solvente são mais fortes do que entre a molécula e o polímero, o analito passa a ter maior afinidade pela fase líquida, não sendo retido pelo adsorvente, como foi neste caso.

Com a diminuição da polaridade do meio de reconhecimento molecular para DCM/ACN 70:30 (v/v) ocorreu adsorção de 55 % de FNT inicial no MIP-A. Entretanto, também foi observada uma adsorção considerável no caso do polímero de controle (32 %).

De acordo com CAI & GUPTA (2004) 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 RLC. Como estes sítios não específicos também estão presentes no NIP-A, 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 a 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 interações não específicas em ambos polímeros impresso e de controle (CARO *et al.*, 2006a; TAMAYO *et al.*, 2007).

Diminuindo-se a polaridade do meio para a proporção DCM/ACN 80:20 (v/v) pôde-se verificar melhor seletividade na adsorção da FNT. No caso do MIP-D a retenção do analito foi de 29 %, em contrapartida, no polímero de controle a retenção foi de apenas 7 %. Esta diferença na adsorção da molécula é explicada pelo efeito de memória do solvente. Segundo esta teoria, a adsorção de uma molécula é favorecida quando o ambiente de síntese é reproduzido (CARO *et al.*, 2006a). Assim, como o MIP-D 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.

Embora a adsorção da FNT no MIP-A (na situação em que o meio de reconhecimento continha 70 % de diclorometano) tivesse sido maior, a adsorção não específica da molécula no polímero de controle, nesta mesma situação, foi alta. Desta forma, a relação: % adsorvida no polímero impresso/ % adsorvida no polímero de controle foi de 1,6 contra 4,1 (no caso em que o meio de reconhecimento continha 80 % de diclorometano). Tais resultados indicaram que o MIP-D apresentou maior potencial para ser usado como material sorvente para a FNT. Este fato está de acordo com a teoria de impressão molecular pois, como eram esperadas ligações de hidrogênio entre a FNT e a cavidade seletiva do polímero, a presença de um meio preferencialmente apolar promoveria maior estabilização destas interações, já que

neste caso o solvente não seria competidor. Por este mesmo motivo o metanol não foi testado como meio de reconhecimento da FNT. Uma vez que este solvente é polar e prótico o mesmo possui grande capacidade de romper ligações de hidrogênio (YAN & RAMSTRÖM, 2005).

Para que fosse feito um estudo da eficiência de adsorção da FNT no MIP-D, foi feita a síntese de um novo polímero de controle (NIP-D), em diclorometano. Em seguida, a adsorção da FNT nos dois materiais foi verificada variando-se a concentração das soluções do analito, preparadas em DCM/ACN 80:20 (v/v), meio no qual havia ocorrido a retenção mais seletiva da molécula. Como resultado foram obtidas duas isotermas de adsorção que são mostradas nas **Figuras 33 e 34**.

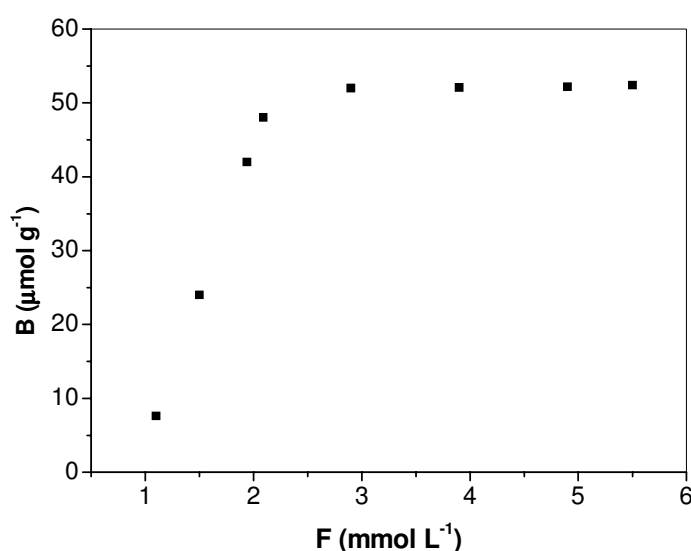


Figura 33: Isoterma de adsorção do MIP-D.

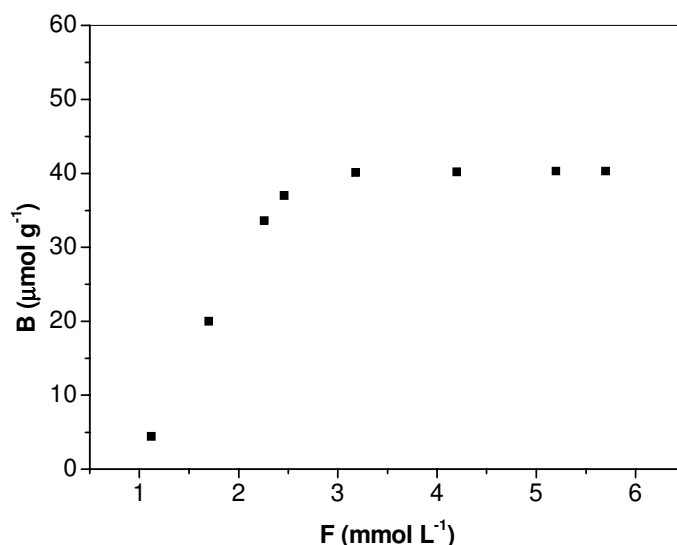


Figura 34: Isotherma de adsorção do NIP-D.

Onde:

$B = (\text{concentração de FNT retida} / \text{concentração de polímero}) \times 1000.$

Observando-se as isotermas mostradas nas **Figuras 33 e 34** pode-se verificar que ambas apresentam duas regiões distintas. A primeira, entre 1 e 3 mmol L⁻¹ aproximadamente, é conhecida como região de sub-saturação e a segunda, a partir de 3 mmol L⁻¹, é chamada de região de saturação. Nesta última, os sítios específicos e não específicos de ligação são ocupados e a concentração de analito ligado ao polímero permanece constante.

A adsorção da FNT nos polímeros impresso e não impresso mostrou-se discretamente diferenciada, uma vez que o analito apresentou uma ligeira preferência pelo MIP-D, característica evidenciada pelo maior valor de B na região de saturação da isoterma de adsorção do polímero impresso (**Figura 33**).

Em geral, as isotermas de adsorção podem ser divididas em duas classes: homogêneas e heterogêneas. Modelos homogêneos assumem somente um tipo de sítios de ligação, considerando-os bem separados e caracterizados pela estequiometria 1:1, características que coincidem com o modelo de adsorção de

Langmüir. Neste modelo, existe uma energia livre individual bem definida associada com a adsorção de um molde para um dado solvente. Outros compostos que podem ser adsorvidos (considerados como interferentes) também têm suas respectivas constantes de equilíbrio. Desta forma, o equilíbrio de ligação pode ser quantitativamente caracterizado em soluções de duas ou mais substâncias, considerando o balanço de massa entre as espécies e a competição das mesmas pelos sítios de ligação do polímero. A grande vantagem de sistemas de Languimir é que as constantes de equilíbrio medidas para substâncias individuais podem ser usadas diretamente no cálculo das isotermas de suas misturas (PAP & HORVAI, 2004; YAN & RAMSTÖM, 2005).

Alguns estudos mostraram evidências de que a ligação de analitos nos polímeros impressos pode ocorrer com estequiometrias diferentes de 1:1, devido a ligação de clusters de moldes ou a ligação de uma molécula molde a um sítio já ocupado por outra molécula, formando ligações cooperativas. Deste modo, assume-se que os polímeros apresentem uma variedade de sítios de ligação, alguns Languimirianos e outros que não possuem estequiometria 1:1 (PAP & HORVAI, 2004). Além disto, a variedade da forma, tamanho e rigidez dos sítios de ligação dos polímeros faz com que as propriedades de ligação variem em seletividade e afinidade. Como evidências desta heterogeneidade estão a seletividade altamente dependente da concentração e assimetria dos picos cromatográficos (YAN & RAMSTRÖM, 2005).

Por causa destas observações alguns modelos heterogêneos têm sido empregados para caracterizar os polímeros impressos. Neste caso, considera-se que existam dois ou mais tipos de sítios de ligação no material, cada um com constantes de ligação diferentes (PAP & HORVAI, 2004). Como por exemplo nas isotermas de Bi-Langmüir, Freundlich e Langmüir-Freundlich (LF).

Para que pudesse ser feita uma melhor avaliação de qual modelo seria mais adequado, foram plotados os gráficos $\log B$ vs $\log F$ para o MIP-D e NIP-D, mostrados nas **Figuras 35 e 36**.

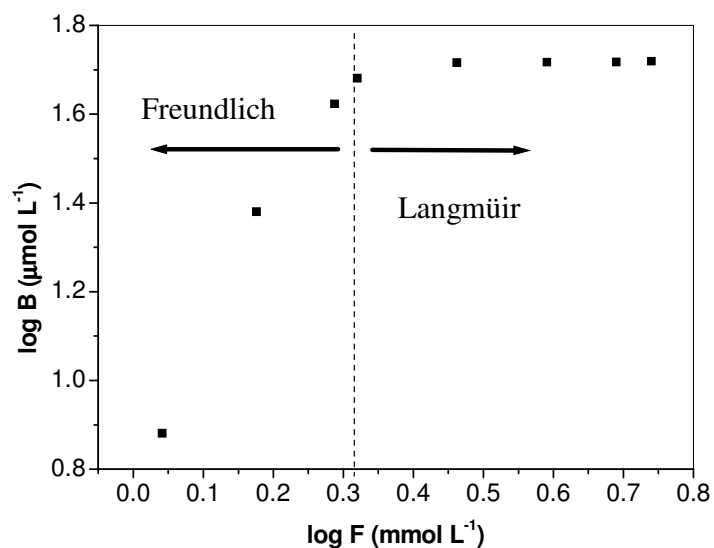


Figura 35: Gráfico log B vs log F para o MIP-D.

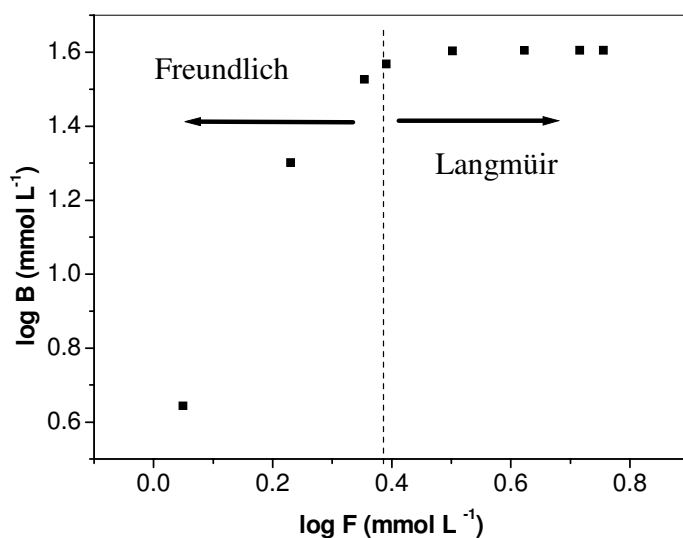


Figura 36: Gráfico log B vs log F para o NIP-D.

Como pode ser verificado os gráficos log B vs log F, mostrados nas **Figuras 35 e 36**, apresentaram duas regiões de comportamentos distintos. A região de concentrações mais baixas da FNT é melhor modelada por Freundlich, uma vez que este modelo é incapaz de modelar regiões de saturação da curva. Já a região de

concentrações mais altas é melhor ajustada ao modelo de Langmüir (YAN & RAMSTRÖM, 2005). Desta forma, nenhum dos dois modelos pode, isoladamente, descrever o comportamento de adsorção da FNT de maneira adequada. Por isto, foi utilizado o modelo de Langmüir-Freundlich para relacionar matematicamente as concentrações de FNT ligado e livre, permitindo o cálculo dos parâmetros de ligação do analito em cada polímero.

Este modelo heterogêneo 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 MIP que contenha sítios homogêneos e heterogêneos. Desta forma, este é o modelo universal para descrever o comportamento de adsorção nos polímeros impressos (TAMAYO *et al.*, 2003; YAN & RAMSTRÖM, 2005).

O ajuste dos pontos de cada isoterma ao modelo LF foi feito através da **Equação 7**.

$$B = \frac{N_t A F^m}{1 + A F^m} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

N_t 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.

Para que os resultados pudessem ser comparados, também foi feito o ajuste das isotermas aos modelos de Langmüir e Freundlich. Os resultados são apresentados nas **Figuras 37 e 38**.

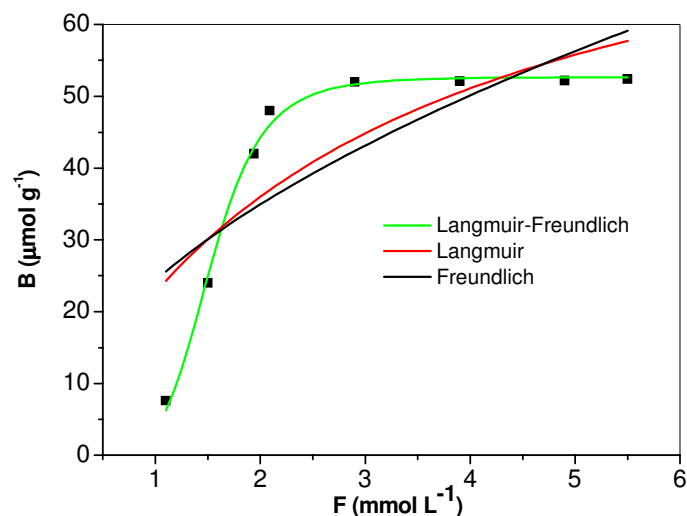


Figura 37: Isoterma de adsorção do MIP-D ajustada aos modelos de Langmüir-Freundlich, Langmüir e Freundlich.

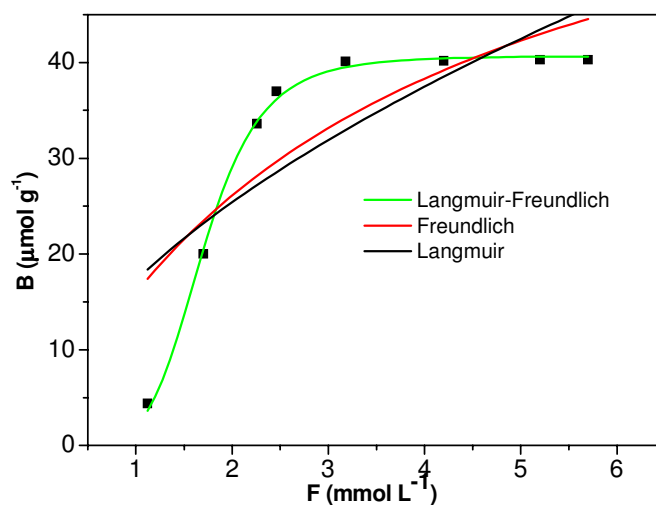


Figura 38: Isoterma de adsorção do NIP-D ajustada aos modelos de Langmüir-Freundlich, Langmüir e Freundlich.

As **Figuras 37 e 38** confirmam que as isotermas não podem ser unicamente ajustadas por Langmüir ou Freundlich. Entretanto, o ajuste ao modelo LF apresentou um coeficiente de correlação (R) acima de 0,99. Os coeficientes calculados para este modelo, a partir da **Equação 7**, são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Coeficientes de ajuste ao modelo LF.

Polímero	$N_t (\mu\text{mol g}^{-1})$	$A (\text{mmol}^{-1})$	m	R
MIP-D	$52,7 \pm 0,7$	$0,08 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	0,997
NIP-D	$40,7 \pm 0,4$	$0,052 \pm 0,009$	$0,178 \pm 0,009$	0,999

Os resultados apresentados na **Tabela 4** mostram que houve uma pequena diferença no número total de sítios de ligação (N_t) dos polímeros impresso e de controle. Este aspecto pode ser atribuído à presença dos sítios não específicos de ligação no NIP-D, que tornaram o valor de N_t maior para este polímero, além da destruição de parte dos sítios específicos de ligação do MIP-D, provocada pelo processo de quebra e trituração do material. Neste caso, a otimização da etapa de lavagem dos polímeros é necessária para que a seletividade do método seja conseguida.

Teoricamente, o valor de m pode variar entre 0 e 1. Quando $m = 1$ o material é considerado homogêneo. Por outro lado, quando m é menor que 1, como foi o caso do MIP-D e NIP-D, o material é considerado heterogêneo (UMPLEBY *et al.*, 2001). A proximidade da variável m com o valor zero indicou o caráter fortemente heterogêneo dos polímeros que possuem sítios de ligação com diferentes estequiometrias. No entanto, este fato é considerado problemático quando o polímero visa ao empacotamento de colunas cromatográficas, o que não foi realizado no caso deste trabalho.

4.6 Otimização do procedimento de MISPE

4.6.1 Procedimento de enchimento dos cartuchos

Conforme foi comprovado através dos estudos de adsorção o MIP-D apresentou a retenção mais seletiva de FNT, ocorrida em DCM/ACN (80:20, v/v), (**Tabela 3**). Por isto, este polímero foi empregado como sorvente nos cartuchos de SPE para a otimização do MISPE.

Como já demonstrado por alguns autores, a exposição do MIP seco à solventes polares provoca um aumento substancial em seu volume. Tal efeito está provavelmente associado à excessiva solvatação de grupos funcionais insaturados que estão localizados nas cavidades seletivas do material. Desta forma, o enchimento de cartuchos de SPE utilizando o polímero seco pode resultar em um leito adsorbente não homogêneo e comprimido com permeabilidade de líquidos extremamente pobre (MAIER *et al.*, 2004). Além de evitar este efeito, a expansão prévia do polímero contribui para proporcionar uma estrutura menos compactada, com poros maiores e mais acessíveis que aumentam a capacidade de carregamento do material (SELLERGREN, 2005). Por isto, o enchimento dos cartuchos foi realizado com o polímero previamente umedecido em metanol e para que o leito polimérico não fosse comprimido, a adição do segundo frits foi feita cuidadosamente após o assentamento da fase polimérica.

A escolha do metanol se deu pelo fato do aumento do volume de polímeros de impressão molecular ser maior neste solvente, por um fator de aproximadamente 1,5 vezes (MAIER *et al.*, 2004). Assim, esperava-se que o material, já expandido, não sofresse aumento de volume quando entrasse em contato com outros solventes.

Já que uma das vantagens dos polímeros impressos é sua capacidade de reutilização, os polímeros empacotados eram reaproveitados. Neste caso, após a remoção da FNT, os cartuchos eram secos e armazenados em um dessecador. Posteriormente, antes de serem novamente reutilizados, os cartuchos eram pré-condicionados com metanol e permaneciam vedados até o início dos experimentos. Quando necessária a troca dos frits era realizada, sempre tomando cuidado de posicioná-los sem que houvesse compressão do leito polimérico.

4.6.2 Estudo de condicionamento e carregamento

O objetivo desta etapa foi encontrar uma condição na qual as cavidades seletivas do MIP-D fossem ativadas, para maximizar as interações entre o analito e o sorbente e possibilitar a mínima perda da FNT durante o carregamento dos cartuchos. Para tal, foram aplicadas diversas condições de condicionamento,

seguidas pelo carregamento dos cartuchos e quantificação da FNT no eluato afim de que fosse feita a verificação da eficiência de extração.

Como eram esperadas ligações de hidrogênio entre a FNT e o MAA, a primeira etapa de condicionamento consistiu na percolação de uma solução ácida de ACN/HAc (90:10,v/v) através dos cartuchos. Com isto, deveria ocorrer a protonação dos grupos carboxílicos presentes nos sítios específicos de ligação.

Em seguida, para que fosse feita a retirada de resíduos de ácido do meio, foi empregado um solvente polar. Por fim, para que o meio polar não pudesse interferir nas interações entre a FNT e o sorvente, era percolado um solvente apolar através dos cartuchos.

De acordo com o método de impressão molecular utilizado (modo não-covalente), a presença de um meio apolar deveria privilegiar a retenção da FNT, uma vez que este caso não haveria interferência nas ligações de hidrogênio estabelecidas (TARLEY *et al.*, 2005a; YAN & RAMSTRÖM 2005). Por isto, o carregamento dos cartuchos foi inicialmente realizado com soluções de FNT preparadas em DCM/ACN (80:20, v/v), já que além deste ter sido o meio no qual ocorreu a retenção mais seletiva, o mesmo deveria favorecer a adsorção do analito.

Para que fossem evitados problemas de miscibilidade entre os solventes polares e apolares, empregados durante o condicionamento dos polímeros, foi necessária a aplicação de vácuo nos cartuchos entre os solventes para a secagem do material.

Na situação em que o cartucho foi cheio com 250 mg de MIP-D e o condicionamento realizado com 2 x 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v), seguidos por 4 x 5 mL de metanol e finalizado com 4 x 5 mL de diclorometano, houve mais de 50 % de perda de FNT durante o carregamento, com 1 mL de uma solução de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FNT. Este mesmo resultado também foi observado quando foram testados acetato de etila, dimetil sulfoxido e dimetil formamida no lugar do metanol. Entretanto, após a substituição do metanol por acetonitrila as perdas de FNT registradas durante o carregamento diminuíram para 30 %.

Embora tivesse ocorrido uma ligeira melhora na retenção do analito, este resultado ainda não foi considerado satisfatório. Por isto, foram feitos novos estudos

de carregamento dos cartuchos, utilizando 500 mg de MIP-D. Como consequência houve diminuição da perda de FNT para 13 % durante o carregamento.

Na tentativa de diminuir ainda mais a porcentagem de perda, a terceira etapa de condicionamento foi feita com hexano. Desta forma, as perdas de FNT foram reduzidas para $6,8 \pm 0,5$ % ($n=3$), o que indicou que a presença de um meio muito apolar favoreceu a retenção do analito na fase polimérica do cartucho, possivelmente pela menor competição do solvente nas interações entre a FNT e o polímero.

Como a perda de $6,8 \pm 0,5$ % foi considerada aceitável, prosseguiu-se a otimização do solvente de lavagem dos cartuchos. Para isto, os cartuchos foram condicionados com 2 x 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v), seguidos por 4 x 5 mL de acetonitrila e 4 x 5 mL de hexano. Em seguida, o carregamento dos cartuchos foi feito com 1 mL de uma solução de FNT $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada em DCM/ACN (80:20, v/v), finalizando com a lavagem dos polímeros com diversos solventes.

Interessantemente, após a lavagem dos cartuchos com diclorometano houve perda total da FNT retida no polímero impresso, enquanto que no caso do polímero de controle a perda foi de somente 33 %. Este resultado foi oposto ao esperado, uma vez que a lavagem deveria remover preferencialmente a FNT do NIP-D, provocando a perda mínima do analito no cartucho empacotado com MIP-D.

Em seguida, a lavagem dos cartuchos foi testada com hexano, pois se esperava que um solvente mais apolar não rompesse as interações entre o analito e o MIP-D. Porém, observou-se novamente a remoção quase total de FNT no cartucho do polímero impresso e somente 20 % de perda no caso do polímero de controle.

Por isto, foram realizados novos testes de condicionamento e carregamento dos cartuchos, para que se encontrasse uma condição que possibilitasse a lavagem seletiva dos polímeros.

Desta forma, os cartuchos foram condicionados com diclorometano, carregados com 1 mL da solução de FNT e por fim lavados com diclorometano. Mesmo assim, a perda quase total do analito não pôde ser evitada.

Outra tentativa foi feita condicionando os cartuchos com metanol, carregando-os em seguida com a solução de FNT e lavando-os com hexano. No entanto, não houve melhora em relação aos resultados anteriormente obtidos.

Um problema parecido com este foi descrito por Caro e colaboradores (CARO *et al.*, 2006b). Neste caso, foi verificada a total retenção de quinolonas, durante a etapa de carregamento do polímero impresso, realizado por meio de uma solução ácida. Porém, durante as tentativas de lavagem todos os compostos foram completamente removidos de ambos MIP e NIP, mesmo quando quantidades mínimas de solventes foram empregadas. Assim, a realização de uma lavagem seletiva tornava-se inviável. Contudo, o problema foi resolvido com a mudança no meio de preparo das quinolonas para metanol. Como resultado, uma lavagem seletiva dos cartuchos pôde ser realizada sem que houvesse perda considerável de analito no polímero impresso.

Atentando-se para este fato foram feitos novos estudos de solventes de carregamento dos cartuchos. Inicialmente, o condicionamento foi feito com 2 x 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v), seguidos por 2 x 5 mL de acetonitrila e 2 x 5 mL de hexano. Após estas etapas o carregamento foi realizado com 1 mL de uma solução de FNT ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), preparada em metanol/acetonitrila (80:20, v/v). Finalizando, a lavagem dos cartuchos foi feita com 1 mL de hexano e como resultado, houve remoção de 40 % de FNT, em ambos MIP-D e NIP-D.

Num outro estudo a primeira etapa de condicionamento dos cartuchos foi feita com 2 x 5 mL de H₂O/HAc (90:10, v/v) e o carregamento realizado com uma solução de FNT preparada em água/acetonitrila (80:20, v/v). Deste modo, não houve perda do analito durante o carregamento do MIP-D e NIP-D, bem como no processo de lavagem dos polímeros com 1 mL de hexano.

Como regra geral, os polímeros impressos exibem melhor reconhecimento molecular no solvente empregado durante a síntese, devido ao efeito conhecido como memória de solvente (CARO *et al.*, 2006a). Na prática este efeito foi presenciado, pois conforme mostra a **Tabela 3**, o polímero sintetizado em diclorometano (MIP-D), apresentou maior seletividade, frente ao polímero de controle, quando o meio de reconhecimento continha diclorometano em maior proporção.

Contudo, como após o carregamento em meio aquoso não foram verificadas perdas de FNT, durante a lavagem do MIP-D com hexano, os estudos posteriores

foram realizados no modo de fase reversa. Assim, a última etapa de condicionamento dos cartuchos consistiu na percolação de um solvente apolar, através dos mesmos, sendo em seguida o carregamento realizado em meio polar.

Esta alteração na polaridade foi feita pois, embora o meio inicialmente empregado para o carregamento favorecesse a adsorção de FNT, a lavagem seletiva do material era inviabilizada.

O trabalho realizado por Yang e colaboradores (YANG *et al.*, 2006) também é um exemplo no qual o carregamento do MIP foi feito em meio aquoso. Neste caso, embora a síntese do polímero impresso com cotinina tivesse sido feita em meio apolar, a condição de fase reversa foi empregada para que houvesse maior retenção do analito. Porém, como o polímero de controle exibiu a mesma capacidade de retenção da molécula molde, uma lavagem seletiva dos cartuchos teve de ser posteriormente implementada.

O carregamento em meio aquoso é favorecido quando a molécula apresenta grupos polares e apolares em sua estrutura (TARLEY *et al.*, 2005a), tal como ocorre com a FNT. Em casos como este o processo de reconhecimento molecular passa a ser dominado por interações hidrofóbicas. Assim, a repulsão entre a molécula e a fase aquosa faz com que o analito tenha mais afinidade pela fase estacionária, favorecendo sua adsorção (CAI & GUPTA, 2004).

Vale lembrar que a solução de FNT não foi preparada em água, pois neste caso não foi possível solubilizar completamente o analito.

4.6.3 Estudo de lavagem do MISPE

Conforme foi verificado durante a otimização do procedimento de condicionamento e carregamento do MISPE, descrito no item **4.6.2**, a lavagem dos cartuchos com hexano não provocou remoção de FNT nos polímeros impresso e de controle, na situação em que o carregamento dos cartuchos havia sido realizado em meio aquoso. No entanto, até o momento, este fato não era um problema já que esperava-se otimizar a etapa de lavagem para que a FNT fosse seletivamente removido do NIP-D.

A seletividade durante o MISPE pode ser conseguida por dois modos distintos: através de um processo de adsorção seletiva ou por uma dessorção seletiva. No primeiro modo o analito é seletivamente retido nos sítios específicos de ligação, através de interações não covalentes, enquanto que as moléculas interferentes não são retidas por estes sítios. Por fim, a eluição do analito pode ser realizada por meio de um solvente orgânico apropriado. Já no processo de dessorção seletiva, que é o caso do MIP-D, os analitos e outros interferentes são retidos pela matriz polimérica hidrofóbica, que age como um material de fase reversa sem especificidade aparente. No entanto, a eluição dos compostos interferentes é conseguida aumentando-se a hidrofobicidade da fase móvel enquanto que a molécula molde não é eluída, permanecendo retida nos sítios específicos de ligação (BAGGIANI *et al.*, 2007b).

Desta forma, o procedimento de lavagem dos cartuchos foi estudado, no sentido de que fosse feito um processo de dessorção seletiva, que rompesse as interações não específicas entre a FNT e o NIP-D.

As percentagens de FNT removida, após a lavagem dos cartuchos com os solventes testados, são mostradas na **Figura 39**.

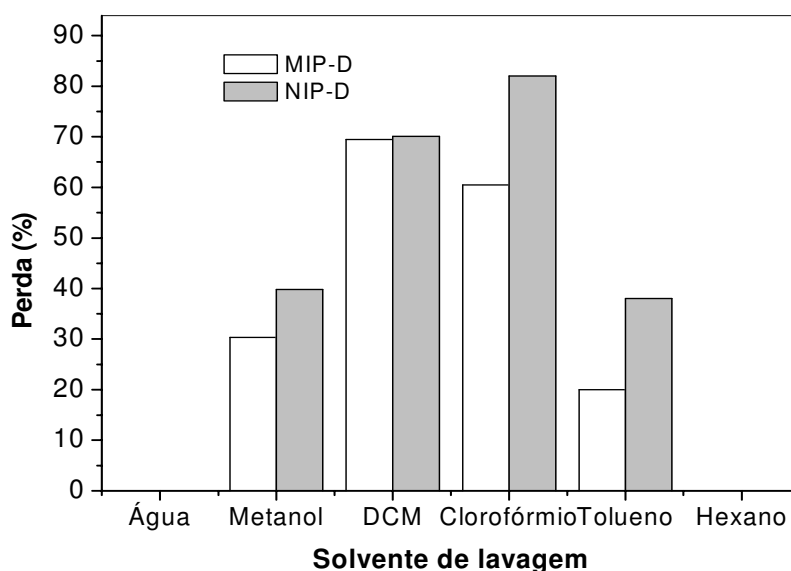


Figura 39: Perda de FNT em função do solvente de lavagem.

Como pode ser visto na **Figura 39**, a lavagem com água e hexano não provocou remoção de FNT nos polímeros impresso e de controle.

No primeiro caso a explicação para este fato está no efeito de repulsão hidrofóbica, o qual favoreceu a retenção do analito nos polímeros.

No caso do hexano a quebra das interações entre a FNT e os polímeros não foi verificada, uma vez que ligações de hidrogênio podem ser estabilizadas neste solvente.

Em ambos MIP-D e NIP-D a mesma tendência verificada por Zhu e colaboradores (ZHU *et al.*, 2005) foi observada. A medida em que a polaridade do solvente de lavagem diminui ocorre um aumento na porcentagem de perda de FNT, até um valor máximo, seguido pela queda na porcentagem de remoção do analito.

Portanto, a remoção de FNT depende de dois fatores: da solubilidade que a molécula apresenta pela fase móvel e da capacidade do solvente em romper ligações formadas entre o analito e polímero.

Embora a água tivesse grande capacidade de romper ligações de hidrogênio, a solubilidade de FNT verificada para este meio foi menor, o que dificultou a retirada da molécula neste caso. Já para o diclorometano e tolueno, embora os solventes não possuíssem constantes dielétricas altas, a solubilidade da molécula foi maior nestes meios, o que favoreceu a remoção de FNT em ambos polímeros impresso e de controle.

Outras tentativas de realização de uma lavagem seletiva nos polímeros foram feitas. Para tal, foram empregadas misturas de hexano/tolueno, tolueno/diclorometano, hexano/ácido acético e hexano/acetato de etila. Porém, em nenhum dos casos a remoção de FNT do polímero de controle foi privilegiada. Entretanto, notou-se que nestas situações a perda de analito foi maior no cartucho do polímero impresso do que no caso do NIP-D.

Idealmente, o solvente de lavagem mais apropriado deveria promover a remoção do analito somente no cartucho do polímero de controle. Porém, como pode ser visto na **Figura 39**, em nenhum dos casos esse comportamento foi verificado. Dentre as possibilidades avaliadas o tolueno apresentou o melhor grau de seletividade, uma vez que removeu cerca de 40 % de FNT do NIP-D e

aproximadamente 20 % no caso do MIP-D. Por isto, o mesmo foi empregado para a lavagem dos cartuchos em estudos posteriores.

4.6.4 Estudo de variação do conteúdo de água nos cartuchos

Como já reportado na literatura, a presença de um ambiente aquoso pode resultar em fortes adsorções não específicas de analitos nos polímeros impresso e de controle (BAGGIANI *et al.*, 2007b; THEODORIDIS & MANESIOTIS, 2002; YANG *et al.*, 2006). Além deste problema, a lavagem seletiva dos polímeros pode ter sido dificultada pelo fato do MIP-D apresentar pouca especificidade pela FNT, conforme foi verificado através do parâmetro Nt , calculado a partir das isotermas de adsorção (**Tabela 4**).

No intuito de aumentar a seletividade, buscou-se diminuir a porcentagem de água do meio na solução de carregamento, para que houvesse um decréscimo na retenção de FNT no polímero de controle, sem prejuízo à adsorção da molécula no polímero impresso. Por isto, a porcentagem de água empregada durante o carregamento dos cartuchos foi estudada.

Uma segunda medida tomada, para que houvesse diminuição da adsorção de FNT no NIP-D, foi a redução da quantidade de polímero empacotado nos cartuchos de 500 para 250 mg.

Os resultados do estudo de variação do conteúdo de água durante o carregamento dos cartuchos são mostrados nas **Figuras 40 e 41**.

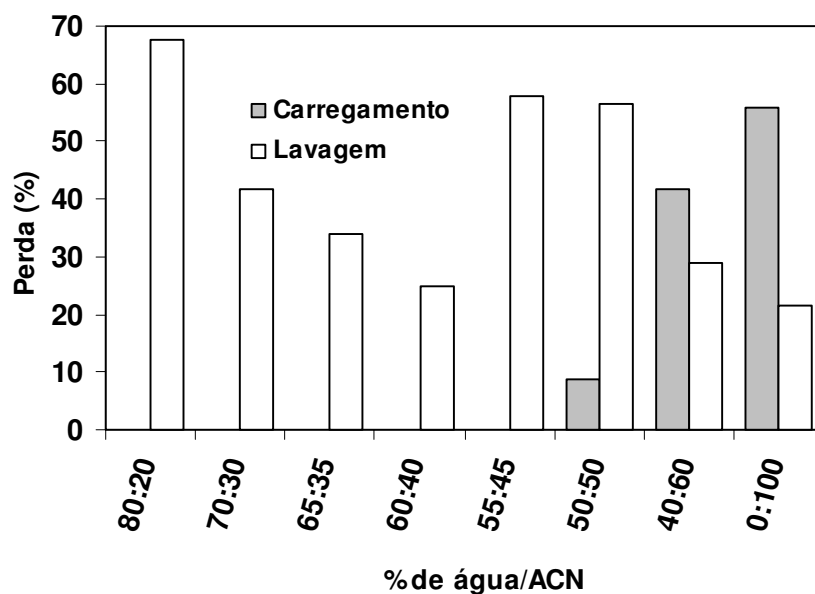


Figura 40: Perda de FNT (durante a lavagem) em função da porcentagem de água empregada no carregamento do MIP-D.

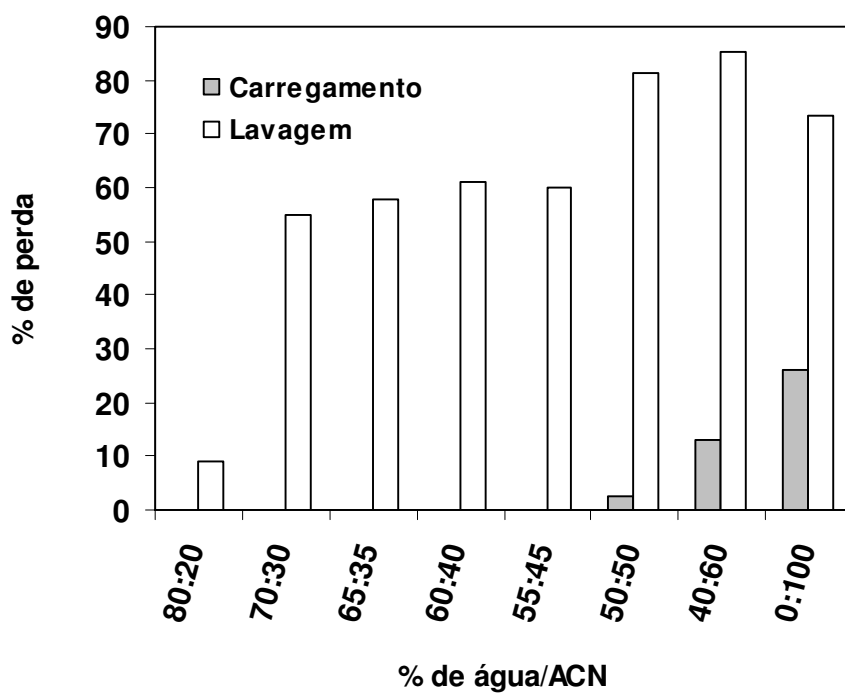


Figura 41: Perda de FNT (durante a lavagem) em função da porcentagem de água empregada no carregamento do NIP-D.

Através das **Figuras 40 e 41** observa-se que em ambos MIP-D e NIP-D, a variação do conteúdo de água, entre 80 e 55%, não provocou perda de FNT durante o carregamento dos cartuchos. Porém, a perda de analito tornou-se crescente a partir da proporção de H₂O/ACN (50:50, v/v), de forma que o efeito foi mais acentuado para o polímero impresso. Na situação em que somente acetonitrila foi utilizada, houve mais de 50 % de perda de FNT durante o carregamento, fato que confirma que este meio não é propício para a adsorção de FNT, conforme já tinha sido verificado através dos estudos de adsorção (**Tabela 3**).

Na faixa entre 80 e 60 % observa-se que os dois polímeros exibiram comportamentos muito diferenciados. No MIP-D a diminuição do conteúdo de água provocou um decréscimo gradativo na perda de FNT. Já para o NIP-D o efeito foi contrário, havendo inicialmente um aumento brusco na perda de analito que se manteve praticamente constante até 55 %.

Em vista dos resultados obtidos verificou-se que a proporção H₂O/ACN (60:40, v/v) foi a porcentagem que mais favoreceu a perda de FNT durante a lavagem do polímero de controle sem, no entanto, prejudicar a retenção da molécula no polímero impresso. Com isso, a remoção de FNT do NIP-D que era de 40 % (**Figura 39**) subiu para 60 % (**Figura 41**), já no caso do MIP-D o aumento foi de somente 5 % (**Figuras 39 e 40**).

4.6.5 Estudo de pH

A dificuldade para se realizar uma lavagem seletiva no MISPE foi relatada na literatura em alguns casos nos quais o meio aquoso foi utilizado. Nestas situações a retenção da molécula molde, nos respectivos polímeros de controle, foi atenuada com o auxílio de um tampão em pH básico. Este, segundo os autores, teve a função de mascarar os grupos funcionais ácidos, localizados na superfície dos polímeros, a fim de suprimir as interações não específicas (ANDERSSON *et al.*, 2004; THEODORIDIS & MANESIOTIS, 2002; YANG *et al.*, 2006).

Embora o carregamento em H₂O/ACN (60:40, v/v) tivesse favorecido a remoção de FNT, foram realizados testes a fim de verificar se o carregamento em

meio tamponado, de pH controlado, poderia diminuir as interações não específicas no polímero de controle. Desta forma, o volume de água foi substituído por tampão Britton-Robinson - BR - (preparado em diversos valores de pH). As porcentagens de FNT removida ($n = 2$) durante a lavagem dos polímeros são mostradas na **Figura 42**.

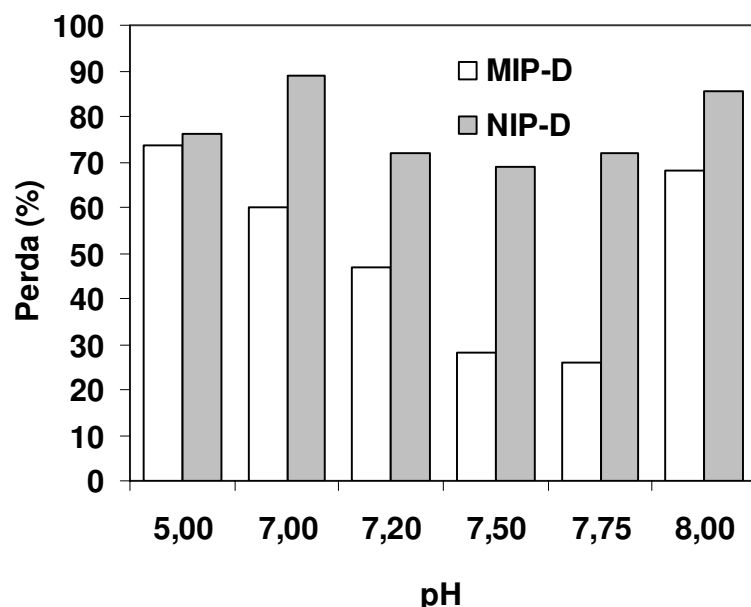


Figura 42: Perda média de FNT (durante a lavagem) em função do pH da solução de carregamento do MIP-D/NIP-D.

Conforme pode ser visto na **Figura 42** ocorreu uma diminuição gradativa, entre os valores de pH 5,00 e 7,75, na porcentagem de FNT removida durante a etapa de lavagem do cartucho de MIP-D. Já para o NIP-D as perdas oscilaram em torno do valor médio de 75 %. Nota-se também que em pH 5,00 e 8,00 ocorreu a maior remoção de FNT durante a lavagem do polímero impresso (cerca de 70 %).

Embora não tivesse ocorrido a diminuição da perda de FNT no MIP-D, em relação aos resultados mostrados na **Figura 40**, a remoção média do analito, no caso do polímero de controle, foi de 70 % dentro do intervalo de pH 7,50-7,75. Tal valor representa um aumento de 10 % em relação ao último resultado no qual o carregamento havia sido feito em H₂O/ACN (60:40, v/v), conforme mostra a **Figura 41**.

Apesar das porcentagens de FNT removida do polímero impresso não apresentarem diferenças significativas, nos casos em que o carregamento dos cartuchos foi feito com tampão entre pH 7,50 e 7,75, optou-se por prosseguir os estudos de otimização do MISPE utilizando o carregamento em tampão BR pH 7,75/ACN (60:40, v/v). Com isto, espera-se que o pH levemente básico favorecesse o efeito de mascaramento dos grupos funcionais ácidos presentes no polímero.

Os tampões citrato e fosfato (ambos em concentração 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,75) também foram testados para o carregamento dos cartuchos, conforme mostra a **Figura 43**. Contudo, a maior remoção de FNT ocorreu no caso do tampão BR.

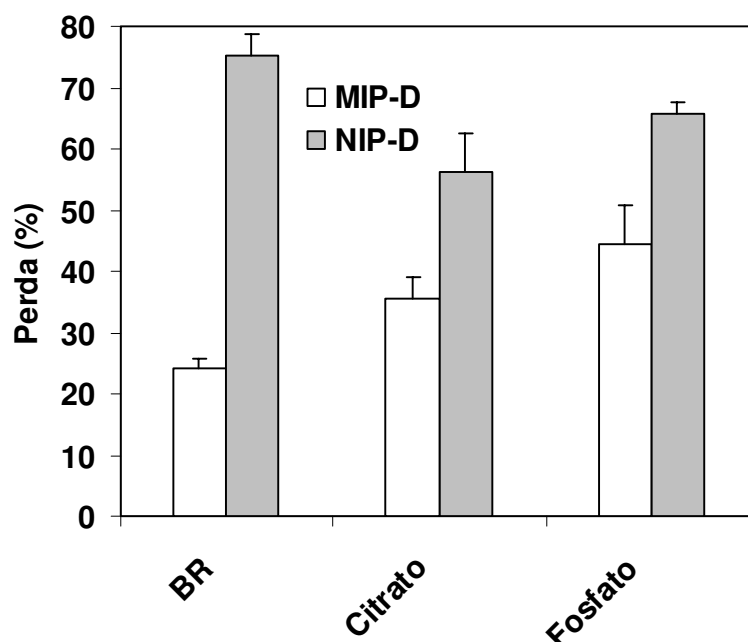


Figura 43: Variação da porcentagem de FNT removida, durante a lavagem, em função do tampão utilizado no carregamento (n = 3).

4.6.6 Estudo de eluição

Conforme pode ser visto na **Figura 39** a maior remoção de FNT ocorreu durante a lavagem do MIP-D com diclorometano. Por isto, este solvente foi empregado na etapa de eluição do MISPE.

Neste estudo, os cartuchos de polímero impresso e controle foram carregados com FNT, preparado em tampão BR pH 7,75/ACN (60:40, v/v), lavados com 1 mL de uma mistura nesta mesma proporção, novamente lavados com 1 mL de tolueno e eluídos com DCM/HAc (em diversas proporções v/v).

Como a seletividade do MIP seria avaliada em uma matriz complexa, no caso o tomate, foram realizadas duas lavagens nos cartuchos, pois previa-se que a remoção de interferentes poderia ser mais eficiente durante a extração de FNT. A primeira lavagem foi feita com a mesma solução empregada para o carregamento, uma vez que neste meio não havia ocorrido perda de FNT em ambos MIP-D e NIP-D. Contudo, esperava-se que futuramente esta etapa pudesse promover a remoção de interferentes polares presentes no tomate. Já a segunda lavagem foi feita com o intuito de remover uma maior quantidade de FNT do polímero de controle e futuros interferentes apolares da matriz.

Na **Figura 44** são mostradas as porcentagens totais de FNT recuperado após as lavagens e eluição.

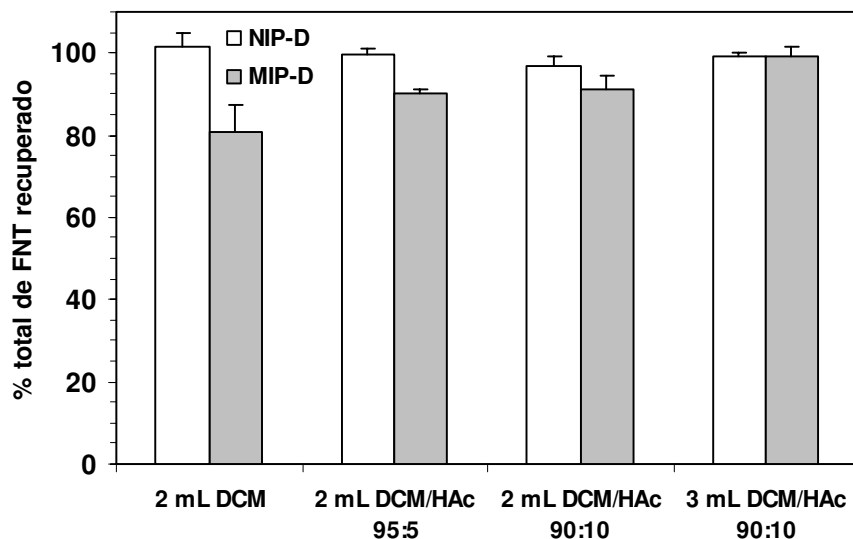


Figura 44: Porcentagem total de FNT recuperada após a etapa de lavagem e eluição dos cartuchos (n = 3).

Nota-se que embora tenha havido remoção completa de FNT no NIP-D, após a percolação de 2 mL de diclorometano, a eluição do analito não foi total no caso do

MIP-D. Assim, foram empregadas misturas de DCM/HAc para promover maior remoção do analito, pois conforme é preconizado, a protonação de uma molécula em meio ácido impede que a mesma se encaixe nos sítios de ligação do polímero. Por isto, a condição ácida é empregada para promover a eluição de analitos em polímeros impressos (MENA *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2005).

Na situação em que a eluição foi realizada com 2 mL de DCM/HAc 95:5 e 90:10 (v/v) a remoção de FNT no MIP-D não foi completa. Contudo, o aumento do volume do solvente (mantendo a proporção de ácido acético em 10 %) resultou em uma recuperação de 99 ± 4 ($n = 3$) do analito.

Desta forma, a maior remoção de FNT em meio ácido pode ser justificada pela protonação da molécula, uma vez que a mesma apresenta átomos eletronegativos em sua estrutura (**Figura 6**) que podem ceder pares de elétrons a íons H^+ .

4.6.7 Estudo de eficiência de extração em meio aquoso

As condições otimizadas das etapas de carregamento, lavagem e eluição do MISPE são mostradas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Procedimento otimizado do MISPE para remoção de FNT em meio aquoso.

Etapa	Condição
Condicionamento	10 mL H_2O/HAc (90:10, v/v), 10 mL $ACN^{\#}$, 10 mL hexano
Carregamento*	50 μg de FNT em Tampão Britton-Robinson pH 7,75/ ACN (60:40, v/v)
1ª Lavagem*	1 mL tampão Britton-Robinson pH 7,75/ ACN (60:40, v/v)
2ª Lavagem	1 mL tolueno
Eluição	3 mL DCM/HAc (90:10, v/v)

[#] Seguido pela secagem do cartucho

* Seguido pela aplicação de vácuo no cartucho (10 minutos)

A secagem do cartucho foi realizada para que fossem evitados problemas de imiscibilidade entre os solventes, já que foram feitas mudanças bruscas de polaridade do meio, além de promover a retirada de resíduos de água, evitando problemas de interferência nas ligações de hidrogênio entre a FNT e o MIP-D.

A eficiência de extração de FNT (expresso pela porcentagem de FNT recuperado) adotando as condições otimizadas para o meio aquoso, é mostrada na **Tabela 6**.

Tabela 6: Eficiência de extração de FNT durante o MISPE (n = 4).

Etapa	% de FNT recuperado	
	MIP-D	NIP-D
Carregamento	nd	nd
1ª Lavagem	nd	nd
2ª Lavagem	23 ± 3	70 ± 3
Eluição	76 ± 6	30 ± 4
Total	99 ± 4	100 ± 4

Conforme pode ser visto na **Tabela 6** não houve perda de FNT nos polímeros impresso e de controle durante as etapas de carregamento e primeira lavagem, já que a adsorção de FNT no NIP-D foi provocada pela presença de sítios não específicos de ligação. Por isto, a otimização da etapa de lavagem foi necessária para que a seletividade do método fosse alcançada. Após a segunda lavagem pode-se observar que a remoção de FNT foi maior no polímero não impresso, comprovando que a molécula possui maior interação com o MIP-D. Nota-se também que a eluição foi eficiente para a extração do FNT retido.

4.6.8 Aplicação do MIP no preparo de amostra visando a determinação de Fenitrotona em tomate

No intuito de avaliar o MIP no processo de preparo de amostra de uma matriz complexa, o polímero impresso foi empregado na determinação de FNT em tomate.

Inicialmente, a extração de FNT em tomate foi feita adotando-se as condições de condicionamento, carregamento, lavagem e eluição otimizadas para o MIP-D em meio aquoso, conforme mostra a **Tabela 5**. As condições cromatográficas foram previamente estabelecidas a partir do trabalho realizado por Sanchez e colaboradores (SANCHEZ *et al.*, 2003). Usando uma coluna de fase reversa octadecil e uma fase móvel composta por ACN/H₂O (70:30, v/v) a FNT apresentou um tempo de retenção de 5,7 minutos. Nestas condições, o fator de assimetria foi de 0,97 e a eficiência de $2,486 \times 10^3$ pratos.

Os cromatogramas de uma amostra branco (tomate sem FNT) e de uma amostra fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT são mostrados nas **Figuras 45 e 46**, respectivamente.

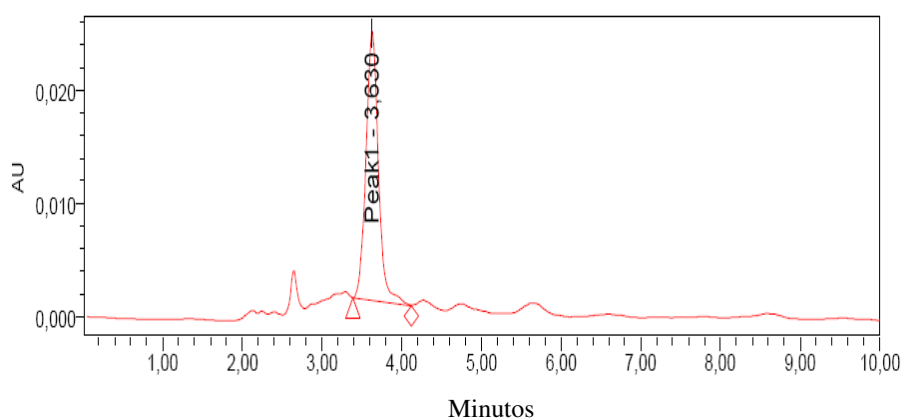


Figura 45: Cromatograma de amostra branco após o MISPE. Fase estacionária: XTerra C₁₈, fase móvel: ACN/H₂O (70:30, v/v), $\lambda = 270 \text{ nm}$, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

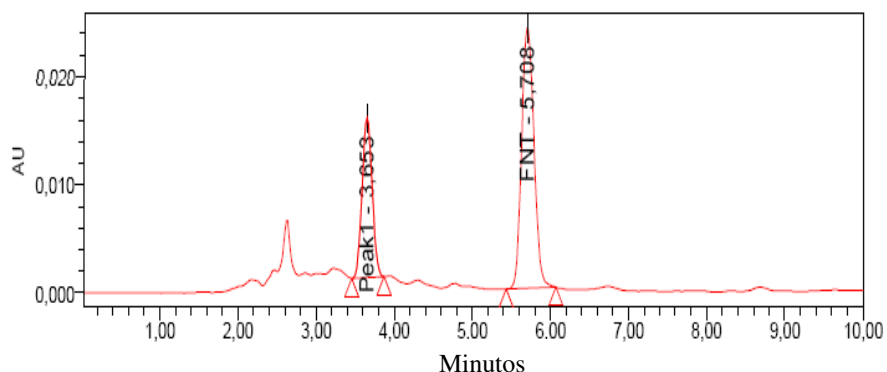


Figura 46: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após o MISPE. Fase estacionária: XTerra C₁₈, fase móvel: ACN/H₂O (70:30, v/v), $\lambda = 270 \text{ nm}$, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Conforme pode ser visto nos cromatogramas das **Figuras 45 e 46** não existem compostos interferentes eluídos no tempo de retenção (t_r) da FNT.

A eficiência de extração do MIP-D e NIP-D para a amostra de tomate fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT foi de 26 ± 2 e $28 \pm 3 \%$, respectivamente. Os valores foram calculados a partir de uma curva analítica externa obtida para cinco níveis de concentração de FNT em solvente (**Figura 47**).

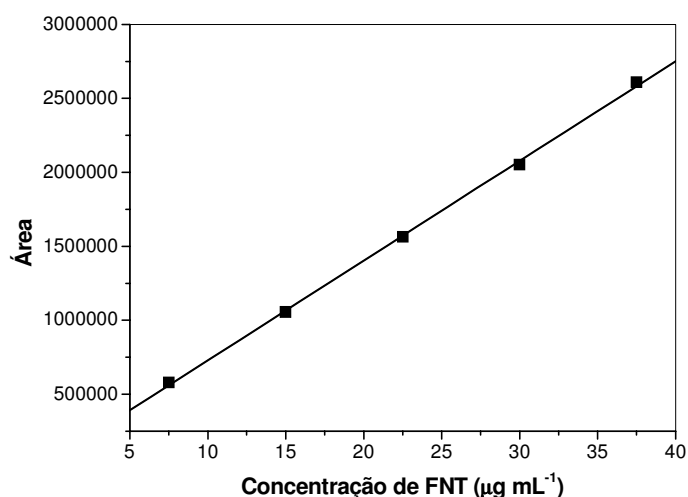


Figura 47: Curva analítica para a FNT utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

A curva analítica mostrada na **Figura 47**, cuja equação é: $\text{Área} = 55054 + 67414 \times C_{\text{FNT}}$, apresentou uma sensibilidade de $67414 \text{ A/ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e linearidade de 0,99964 no intervalo de concentração estudada. Os limites de detecção e quantificação foram calculados por $(3 \times \text{DP})/\alpha$ e $(10 \times \text{DP})/\alpha$, onde DP é a estimativa do desvio padrão da curva e α o coeficiente angular da reta. Os valores encontrados foram de $1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5,57 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Houve queda na eficiência de extração de FNT no MIP-D, em relação aos resultados obtidos em meio aquoso (que foram de $76 \pm 6 \%$, **Tabela 6**), quando as condições de extração otimizadas para este meio foram adotadas no tomate. Já para o polímero de controle, as eficiências de extração de FNT em meio aquoso e em tomate, que foram de 30 ± 4 e $28 \pm 3 \%$, mantiveram-se no mesmo intervalo.

Foi notado que durante a etapa de lavagem com tolueno do MIP-D a remoção de FNT foi de aproximadamente 50 %. Uma vez que o tomate é composto em sua grande maioria por água, houve aumento do conteúdo aquoso na solução empregada para o carregamento dos cartuchos, que consistia inicialmente em 60 % de Tampão Britton-Robinson pH 7,75 e 40 % de ACN. Conforme mostra a **Figura 40**, o aumento do conteúdo de água, na solução de carregamento do MIP-D, provoca acréscimo na perda de FNT durante a lavagem com tolueno, o que justifica a diminuição na eficiência de extração do agrotóxico. Como o tolueno não removeu nenhum interferente que coelúisse junto com a FNT, a segunda lavagem foi suprimida para que houvesse ganho na eficiência de extração no MIP-D. Além disto, para que não ocorressem danos às torneiras de plástico da câmara de vácuo, a mistura diclorometano/ácido acético (90:10, v/v) foi substituída por 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v) para a eluição dos cartuchos. Um cromatograma característico obtido após estas adaptações é mostrado na **Figura 48**.

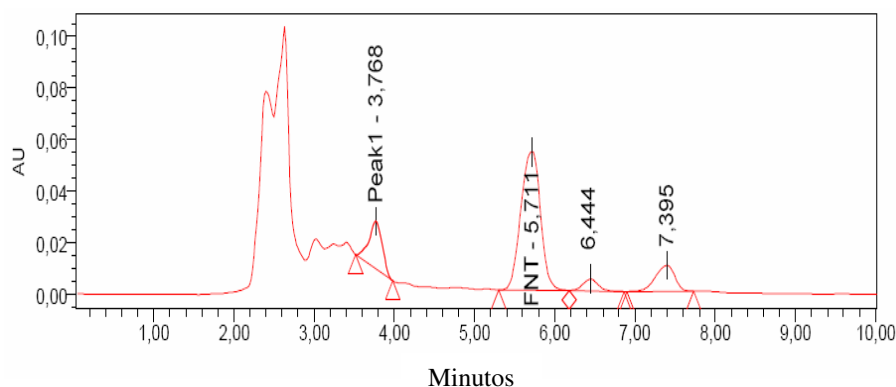


Figura 48: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após o MISPE (excluindo-se a lavagem com tolueno). Fase estacionária: XTerra C₁₈, fase móvel: ACN/H₂O (70:30, v/v), $\lambda = 270 \text{ nm}$, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Comparando-se os cromatogramas mostrados nas **Figuras 46 e 48** nota-se que no segundo caso houve maior presença de compostos polares no intervalo entre dois e quatro minutos. Contudo, verificou-se que não foram eluídos interferentes no tr da FNT e que a recuperação do analito aumentou para $60 \pm 3 \%$ ($n = 3$), consistindo num resultado mais próximo do obtido em meio aquoso.

Para comparação, a extração de FNT utilizando o polímero não impresso foi feita nestas mesmas condições. O resultado é mostrado na **Figura 49**.

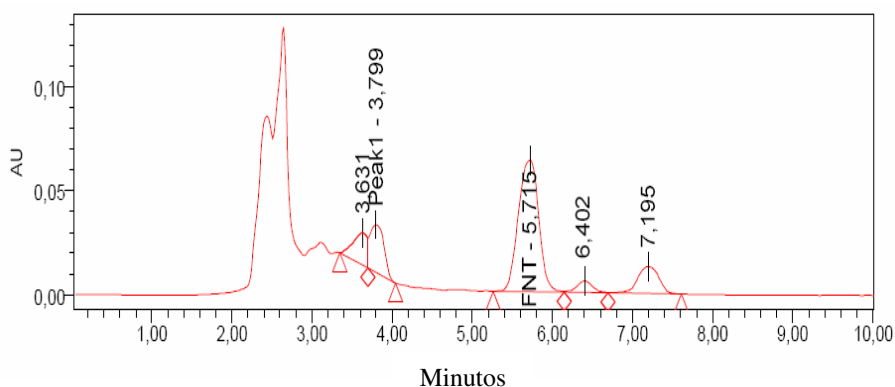


Figura 49: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após o NISPE*. Fase estacionária: XTerra C₁₈, fase móvel: ACN/H₂O (70:30, v/v), $\lambda = 270 \text{ nm}$, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. * Non Imprinted Solid Phase Extraction.

No caso do polímero de controle, a supressão da lavagem do cartucho com tolueno e eluição com 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v) acarretou em recuperação de $65 \pm 2 \%$ ($n = 3$) de FNT. Uma vez que a lavagem com tolueno era responsável pela remoção majoritária de FNT do NIP-D, conforme mostra a **Tabela 6**, houve perda de seletividade já que resultados semelhantes de eficiência de extração foram obtidos para o MIP-D.

Após os procedimentos de MISPE e NISPE os cartuchos dos polímeros impresso e de controle foram reaproveitados. Contudo, foi necessário realizar a regeneração dos materiais com 5 mL de acetonitrila:ácido acético (90:10, v/v) e 10 mL de metanol. Esta lavagem foi feita com o objetivo de remover possíveis resíduos de FNT nos polímeros, evitando assim interferências nos resultados das extrações, além de retirar resíduos de substâncias do tomate aderidos às fases estacionárias.

A extração de FNT em tomate também foi realizada por SPE usando cartuchos de fase reversa octadecil. Neste caso, a lavagem dos cartuchos foi feita com 1 mL de tampão Britton-Robinson pH 7,75/ACN (60:40, v/v), seguida pela eluição com 5 mL de ACN/HAc (90:10, v/v). A recuperação obtida, para uma amostra de tomate fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, foi de $98 \pm 3 \%$ ($n = 3$). O cromatograma de uma amostra de tomate fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT é mostrado na **Figura 50**.

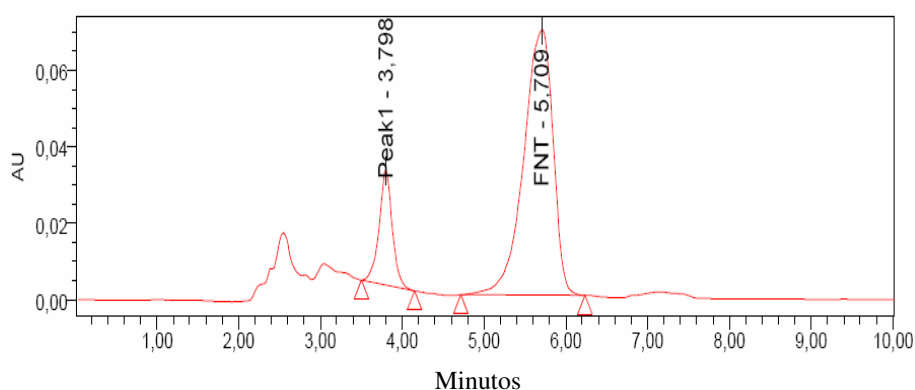


Figura 50: Cromatograma de uma amostra de tomate, fortificada com $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de FNT, após extração utilizando o cartucho C₁₈. Fase estacionária: XTerra C₁₈, fase móvel: ACN/H₂O (70:30, v/v), $\lambda = 270 \text{ nm}$, vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Comparando-se os cromatogramas, mostrados nas **Figuras 46 e 50**, nota-se que ambos apresentam um perfil muito parecido no que diz respeito à remoção de interferentes. Entretanto, no caso do MIP-D, a etapa de lavagem do cartucho com tolueno remove uma quantidade considerável de FNT prejudicando a eficiência de extração do analito.

Os resultados obtidos confirmam o potencial de uso do polímero de impressão molecular, sintetizado em diclorometano, para o uso no preparo de amostras de tomate visando à determinação de resíduos de FNT nas mesmas. Além disto, a capacidade de reutilização e aproveitamento do MIP-D torna-o economicamente vantajoso em relação aos cartuchos C₁₈ comumente empregados em SPE, já que estes últimos não são rotineiramente reutilizados. Outro aspecto que vale a pena ser destacado é o fato de que o MIP após utilizado e regenerado mantém suas características morfológicas e, conseqüentemente, sua performance entre as análises.

Também, a possibilidade de seletividade para outros compostos, com estrutura semelhante a da molécula molde, torna-se uma vantagem para os polímeros impressos na determinação de produtos de degradação do analito.

5. CONCLUSÕES

- O polímero de impressão molecular, sintetizado a partir de ácido metacrílico, etileno glicoldimetilacrilato, 2,2'-azo-bis-iso-butyronitrila, fenitrotona como molécula molde e diclorometano como solvente porogênico apresentou maior afinidade pela FNT, contida em uma solução aquosa, em relação ao polímero de controle durante a etapa de lavagem do MISPE com tolueno.
- A escolha do solvente porogênico empregado na síntese é de fundamental importância para garantir a seletividade do método. No caso da molécula molde de fenitrotona, entre o metanol, acetonitrila e diclorometano, apenas o último foi capaz de estabilizar as interações entre o fenitrotona e o material sorvente.
- A voltametria de onda quadrada mostrou ser uma técnica adequada para monitorar a concentração de fenitrotona nos estudos de otimização das condições da extração em fase sólida molecularmente impressa e dos estudos de adsorção.
- 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 (com a molécula molde) e não impresso (sem a molécula molde).
- O polímero não impresso também apresentou sítios, porém considerados não específicos, que permitiram a adsorção de fenitrotona.
- Os polímeros impressos e não impressos (sem a molécula molde) apresentaram as mesmas características espectrais (espectroscopia no infravermelho e ressonância nuclear magnética no estado sólido). No entanto, o polímero impresso apresentou uma estrutura mais porosa com maior área superficial e volume do poro em relação ao polímero não impresso.
- O polímero de impressão molecular sintetizado em diclorometano apresentou propriedades adequadas para viabilizar seu uso em procedimentos de extração em fase sólida. O estudo e escolha dos solventes para as etapas de condicionamento, aplicação da amostra, lavagem e eluição são fundamentais para permitir a retenção seletiva do analito. A fase sorvente polimérica dos cartuchos pode ser reutilizada após lavagem com solventes, é estável em uma ampla faixa de pH, resiste a mudanças bruscas de polaridade do solvente, o que torna o material vantajoso em relação a outras fases convencionais a base de sílica.

- A extração em fase sólida molecularmente impressa, usando polímero de impressão molecular sintetizado em diclorometano, apresentou propriedades satisfatórias (seletividade e eficiência de extração) que mostram seu potencial para o preparo de amostras de tomate visando à determinação de resíduos de fenitrotona por cromatografia líquida de alta eficiência.
- A eficiência e a especificidade do material polimérico pode ainda ser melhorada. Para isto, podem ser empregados métodos de polimerização nos quais sejam obtidas partículas mais uniformes, sem que haja necessidade de quebra e trituração do polímero, além da realização de estudos de modelamento molecular para a escolha dos monômeros funcionais que interajam mais efetivamente com a fenitrotona.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: www.anvisa.gov.br, acessado em fevereiro de 2007.
- AL-KINDY, S.; BADÍA, R.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, J.L.; DÍAZ-GARCÍA, M.E.; **Molecularly Imprinted Polymers and Optical Applications**, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2000**, 30, 291-309.
- ALLCOCK, H.R.; **Contemporary Polymer Chemistry**, 2nd Edition, 1990, USA.
- ANDERSSON, L.I.; HARDENBORG, E.; SANDBERG-STÄLL, M.; MÖLLER, K.; HENRIKSSON, J.; BRAMSBY-SJÖSTRÖM, I.; OLSSON, L.; ABDEL-REHIM, M.; **Development of a molecularly imprinted polymer based solid-phase extraction of local anaesthetics from human plasma**, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 526, 147-151.
- BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C.; **Molecularly imprinted solid-phase extraction for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples**, *Journal of Chromatography A*, **2001**, 938, 35-44.
- BAGGIANI, C.; ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; **Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers**, *Analytica Chimica Acta*, **2007a**, 591, 29-39.
- BAGGIANI, C.; BARAVALLE, P.; GIRAUDI, G.; TOZZI, C.; **Molecularly imprinted solid-phase extraction method for the high-performance liquid chromatographic analysis of fungicide pyrimethanil in wine**, *Journal of Chromatography A*, **2007b**, 1141, 158-164.
- BALAKRISHNAN, V.K.; BUNCEL, E.; VANLOON, G.W.; **Micellar catalyzed degradation of fenitrothion, an organophosphorus pesticide, in solution and soils**, *Environmental Science & Technology*, **2005**, 39, 5824-5830.
- CAI, W.; GUPTA, R.B.; **Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding**, *Separation and Purification Technology*, **2004**, 35, 215-221.
- CASSARETT, L.J. and DOULL, J.; *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 2nd edition, **1975**, New York.
- 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*, **2006a**, 25, 143-153.
- CARO, E.; MARCÉ, R.M.; BORRUL, F.; CORNACK, P.A.G.; SHERRINGTON, D.C.; BORRUL, F.; **Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated quinolones from urine and tissue samples**, *Analytica Chimica Acta*, **2006b**, 562, 145-151.

- CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z.; **Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization**, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 804, 173-182.
- COURTOIS, J.; FISHER, G.; SCHAUFF, S.; ALBERT, K.; IRGUM, K.; **Interactions of bupivacaine with a molecularly imprinted polymer in a monolithic format studied by NMR**, *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, 580-584.
- DERBALAH, A.S.; NAKATANI, N.; SAKUGAWA, H.; **Photocatalytic removal of fenitrothion in pure and natural waters by photo-Fenton reaction**, *Chemosphere*, **2004**, 57, 635-644.
- FAO, 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations: http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2003_eva/fenitrothion%202003.pdf, acessado em dezembro de **2007**.
- FARRINGTON, K.; REGAN, F.; **Investigation of the nature of MIP recognition: The development and characterisation of a MIP for Ibuprofen**, *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, 22, 1138-1146.
- INCHEM, 2007. International Programme on Chemical Safety: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc133.htm>, acessado em dezembro de **2007**.
- FUKUSHIMA M.; FUJISAWA, T.; KATAGI, T.; TAKIMOTO, Y.; **Metabolism of Fenitrothion and Conjugation of 3-Methyl-4-nitrophenol in Tomato plant (*Lycopersicon esculentum*)**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5016-5023.
- GOSSER JR, K.D.; **Cyclic Voltametry: Simulation and Analysis of Reaction Mecanisms**, New York, VCH, **1993**.
- HE, C.; LONG, Y.; PAN, J.; LI, K.; LIU, F.; **Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples**, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2007**, 70, 133-150.
- KORMALI, P.; DIMOTICALI, D.; TSIPI, D.; HISKIA, A.; PAPACONSTANTINOU, E.; **Photolytic and photocatalytic decomposition of fenitrothion by $PW_{12}O_{40}^{3-}$ and TiO_2 : a comparative study**, *Applied Catalysis B: Enviromental*, **2005**, 48, 175-183.
- KROSCWITZ, I.; *Concise encyclopedia of polymer science and engineering*, **1990**, USA.
- 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.

- MAIER, N.M.; BUTTINGER, G.; WELHARTIZKI, S.; GAVIOLI, E.; LINDNER, W.; **Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations**, *Journal of Chromatography B*, **2004**, 804, 103-111.
- MELGAR, L.Z.; MACHADO, S.A.S.; **Determination of fenitrothion in commercial formulations by square wave voltammetry and UV-Vis spectroscopy**, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2005**, 16, 743-748.
- MENA, M.L.; MATÍNEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, A.J.; PINGARRÓN, J.M.; **Molecularly imprinted polymers for on-line preconcentration by solid phase extraction of pirimicarb in water samples**, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 451, 297-304.
- OSTERYOUNG, J.G.; O'DEA, J.J.; Square Wave Voltammetry. In: Bard, A. J.; Electroanalytical Chemistry, Marcel Dekker, **1982**, New York.
- PAP, T.; HORVAI, J.; **Characterization of the selectivity of a phenytoin imprinted polymer**, *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1034, 99-107. .
- PÉREZ-MORAL, N.; MAYES, A.G.; **Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods**, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 504, 15-21.
- PIZANO, M.A.; BAPTISTA, G.C.; **Resíduos de fenitrothion em frutos e folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)**, *Scientia Agrícola*, **1998**, 55, 203-209.
- PRADA, A.G.V.; MARTINEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, A.J.; PINGARRÓN, J.M.; **Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk**, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 539, 125-132.
- QIAO, F.; SUN, H.; YAN, H.; ROW, K.H.; **Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction**, *Chromatographia*, **2006**, 64, 625-634.
- RATH, S.; HOFFMANN, H.; **Mechanism of the polarographic reduction of 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane (Bronidox®)**, *Pharmazie*, **1997**, 6, 443-448.
- RODRIGUES, N. R.; **Agrotóxicos: Análises de resíduos e monitoramento**, *Revista Multiciência*, **2006**, 7, 1-7.
- SÁNCHEZ-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.
- SANCHEZ, R.; VAZQUEZ, A.; RIQUELME, D.; VILLÉN, J.; **Direct analysis of pesticide residues in olive oil by on-line reversed phase liquid chromatography-gas chromatography using an automated through oven transfer adsorption**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 6096-6102.
- SAN VICENTE, B.; VILLOSLADA, F.N.; MORENO-BONDI, M.C.; **Continuous solid-phase extraction and preconcentration of bisphenol A in aqueous samples using molecularly imprinted columns**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, 380, 115-122.
- SELLERGREN, B.; *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, **2001**, Netherlands.
- SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A.; **Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos**, *Química Nova*, **2003**, 26, 81-89.
- SPIVAK, D.A.; **Optimization, evaluation, characterization of molecularly imprinted polymers**, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, 57, 1779-1794.
- TAMAYO, F.G.; CASILLAS, J.L.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; **Highly selective fenuron-imprinted 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.; 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.; 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*, **2005a**, 28, 1076-1086.
- TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T.; **Polímeros Biominéticos em Química Analítica. Parte 2: Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no Desenvolvimento de Sensores Químicos**, *Química Nova*, **2005b**, 28, 1087-1101.

- TOPALOV, A.; MOLNÁR-GÁBOR, D.; ABRAMOVIĆ, B.; KOROM, S.; PERIČIN, D.; **Fotocatalytic removal of the insecticide fenitrothion from water sensitized with TiO₂**, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2003**, 160, 195-201.
- THEODORIDIS, G.; MANESIOTIS, P.; **Selective solid-phase extraction sorbent for caffeine made by molecular imprinting**, *Journal of Chromatography A*, **2002**, 948, 163-169.
- UMPLEBY, R.J.; BAXTER, S.C.; CHEN, Y.; SHAH, R.N.; SHIMIZU, K.D.; **Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmüir-Freundlich isotherm**, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 73, 4584-4591.
- YAN, M.; Ramström, O.; *Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, **2005**, EUA.
- YANG, J.; HU, Y.; CAI, J. B.; ZHU, X.L.; SU, Q.D.; **A new molecularly imprinted polymer for selective extraction of cotinine from urine by solid-phase extraction**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 384, 761-768.
- ZHAO, E.; HAN, L.; JIANG, S.; WANG, Q.; ZHOU, Z.; **Application of a single-drop microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice**, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1114, 269-273.
- 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.
- NI, Y.; QIU, P.; KOKOT, S.; **Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics**, *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 516, 7-17.
- WHO, World Health Organization: <http://www.who.int/foodsafety/en/>, acessado em março de **2007**.
- WULF, G.; SARHAN, A.; **Use of polymers with enzyme analogous structures for the resolution of racemates**, *Angewandte Chemie*, **1972**, 11, 341-344.