UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Viviane Grassi

Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo

> PIRACICABA - SP 2008

Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

PIRACICABA - SP

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Grassi, Viviane

Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores em fase sólida em sistemas de análises em fluxo / Viviane Grassi; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - Piracicaba, 2008. 179 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise em fluxo contínuo 2. Espectrofotometria 3. Método de separação 4. Polímeros sintéticos I. Título

CDU 543.068.3:677.021.122.6

"Ninguém pode dar aquilo que não possui. Para dar amor, você deve ter o amor.

Ninguém pode ensinar aquilo que não sabe. Para ensinar o amor, você precisa compreendê-lo.

Ninguém pode conhecer aquilo que não estuda. Para estudar o amor, você precisa viver o amor.

Ninguém pode apreciar aquilo que não aceita. Para aceitar o amor, você deve torna-se receptivo a ele.

Ninguém pode ter dúvida daquilo em que deseja acreditar. Para acreditar no amor, você deve estar convencido do amor.

Ninguém admite aquilo a que não se entrega. Para se entregar ao amor, você deve ser vulnerável a ele.

Ninguém vive aquilo a que não se dedica. Para se dedicar ao amor, você deve estar sempre crescendo no Amor ... "

(Leo Buscaglia)

 \hat{A} Deus pelo amor incondicional, pelo consolo nos momentos difíceis, pela força que me fez crescer em meio às lutas, pela alegria em minhas vitórias e pelos sonhos que plantaste em meu coração. A Ti dedico todas as conquistas da minha vida e agradeço por todos os momentos vividos contigo os quais estão eternizados em minha memória em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo, pelas instalações e facilidades oferecidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa e auxílio financeiro.

Ao Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto, pelos desafios, discussões científicas, orientação e amizade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica do CENA, Prof. Boaventura, Prof. Francisco Krug e Profa. Maria Fernanda pela amizade e colaborações.

Aos amigos e colaboradores da Universidade do Porto, Prof José Luiz F.C. Lima e Profa. Marcela Segundo pelo apoio, orientação e amizade.

Aos colaboradores do Instituto de Química da Universidade de Campinas em especial aos professores Luis Carlos Dias e Marco Aurélio A. Zezzi pelas discussões científicas.

Ao colega, Eduardo Figueiredo pelas discussões científicas e auxílio.

Aos técnicos do laboratório de Química Analítica do CENA, Fátima, Yolanda e Valdemir, pelo carinho e auxílio em especial a Sheila que não mediu esforços em me ajudar.

As bibliotecárias do CENA, em especial a Marília, pela excelente ajuda.

Às secretárias da pós-graduação, Neuda, Claúdia e Regina pelo auxilio.

Aos amigos do laboratório, Paula, Evandro, Mário e Silvia pelas discussões diárias, colaborações científicas e pessoais, apoio e amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química Analítica do CENA, Carla, Gláucia, Rejane, Janete, Milton, Alfredo, Dário, Quienly e Lidiane, pela amizade e ajuda sempre disponível, pelo estimulo e pelas conversas tão animadas no café.

À minha amiga Ana Cristi, pelo apoio confortante, carinho, amizade durante todos estes anos, paciência e compreensão nos bons e maus momentos e pelas discussões científicas e pessoais que me fizeram crescer muito. Cristi, você foi essencial para que eu chegasse até aqui, não há palavras que expressem minha gratidão, muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos Tatiana e Fábio pela amizade, pelos ótimos momentos vividos, por todo apoio e carinho que vocês sempre transmitiram. Tati agradeço a Deus pela tua amizade e por todos os momentos vividos, muito obrigada!

Ás minhas amigas Denise, Paula Pinto, Paula Gervásio e Sara que, apesar da distância, sempre me incentivaram com palavras de amizade estimulo e carinho.

À minha amiga Simone pela amizade preciosa, respeito, carinho e alegria transmitida. Si, obrigada pelo conforto e estimulo nos momentos difíceis, pelas risadas e por me deixar participar da vida destas crianças lindas.

Aos amados João Pedro e Maria Eduarda que na simplicidade de criança, me ensinaram que a vida é feita de pequenas atitudes de amor e que um sorriso sincero vale muito mais que qualquer tesouro.

As amigas Nádia e Joseane pela amizade e carinho, pelas conversas intermináveis e pelos excelentes momentos vividos.

Àminha amiga Noemi pelas orações, pelo carinho e amor, pela presença constante, por se importar e interceder pela minha vida e pela linda amizade. Noemi, você é uma benção de Deus na minha vida, obrigada minha irmãzinha por tudo!

Aos queridos e amados amigos Gustavo, Junior, Ricardo, Epaphras, Marcela, Jerusha, Gian, Esther e Thiago pela amizade, compreensão, orações, conversas mais que animadas, pela paciência e apoio incondicional. Aos amados irmãos e amigos da Igreja Metodista Betânia, por todo amor, carinho, incentivo, conforto, amizade e companheirismo transmitidos. Pelas orações e aconselhamentos, por não me deixarem desistir nunca. Muito mais que amigos vocês foram uma família para mim, amo vocês!

Aos meus pais Valdir e Raquel e aos meus irmãos Junior e Vagner pelo amor, pelos conselhos, pela paciência, por acreditarem e investirem em mim e nos meus sonhos. Amo muito vocês!

À todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho, muito obrigada.

"Quem não compreende um olhar tampouco compreenderá uma longa explicação."

RESUMO

GRASSI, V. Polímeros molecularmente impressos (MIPs) como extratores
em fase sólida em sistemas de análises em fluxo. 2008. 179f. Tese
(Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São
Paulo, Piracicaba, 2008

Polímeros molecularmente impressos (MIPs) se afiguram como materiais promissores a serem empregados em extração em fase sólida devido à boa seletividade apresentada por eles. A seletividade dos MIPs está diretamente relacionada ao reconhecimento pelo polímero de uma molécula de interesse, a qual foi empregada previamente como molde no processo de sua síntese. MIPs apresentam como características o fácil preparo, o baixo custo, a possibilidade de síntese em ambientes adversos, e a resistência química na presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos bem como resistência física a altas temperaturas e pressões.

Neste trabalho, a exploração de MIPs como extratores para separação em fase sólida (SPE) em sistemas de análises em fluxo foi realizada, sendo suas características e desempenho avaliados em relação às determinações espectrofotométricas de catecol, ácico ascórbico e atrazina em amostras de relevãncia ambiental, farmacológica e alimentícia. A possibilidade de separação quiral foi também investigada em relação D e L-ácido ascórbico. Potencialidades e limitações quanto ao emprego dos mesmos em sistemas de análises em fluxo foram observadas e enfatizadas.

ABSTRACT

GRASSI, V. Molecularly imprinted polymers (MIPs) as solid phase extractors in flow systems. 2008. 179f. Thesis (Doctoral) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are promising as material to be used in solid phase extractions due to their high selectivity. MIPs selectivity is directly related to the recognition of a molecule of interest, which was previously employed as template in the synthesis process. The main favorable characteristics of MIPs are the easy preparation, low cost, possibility of synthesis in adverse environments, and chemical resistance in the presence of acids, bases, metal ions, organic solvents as well as the physical resistance to high temperatures and pressures.

In the present work, flow systems with molecularly imprinted polymers as inline solid phase extractors were designed, and their characteristics and efficiencies were assessed in relation to the spectrophotometric determinations of the catechol, ascorbic acid and atrazine in environmental, pharmacological and food samples. Moreover, the feasibility of chiral separation was investigated in relation to D and L-ascorbic acid. Potentialities and limitations of implementing MIPs in flow analysis were highlighted.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de polímeros	
impressos molecularmente	13
Quadro 2. Estruturas químicas de reagentes de ligação cruzada comumente usados em sínteses de MIPs	14
Quadro 3. Estruturas químicas dos iniciadores radicalares usados na síntese de MIPs	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de impressão molecular	10
Figura 2. Polimerização via radical livre do monômero funcional ácido metacrílico com 2,2- azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador radicalar	18
Figura 3. Etapas para extração em fase sólida (manual)	24
Figura 4. Estrutura molecular do catecol	46
Figura 5. Estruturas moleculares dos enantiômeros do AA	49
Figura 6. Estrutura molecular do herbicida atrazina	52
Figura 7. Esquema representativo da síntese de MIP por "bulk"	68
Figura 8. Reação envolvida na determinação de catecol	71
Figura 9. Diagrama de fluxos do sistema inicial para determinação catalítica de catecol	72
Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema para determinação catalítica de catecol empregando MIP como extrator em fase sólida	76
Figura 11. Reação envolvida na determinação de catecol com 4-aminofenol	80
Figura 12. Diagrama de fluxos do sistema inicial para determinação de catecol com 4- aminofenol	81
Figura 13. Diagrama de fluxos do sistema empregado para determinação de catecol com 4-aminofenol empregando MIP	84
Figura 14. Diagrama de fluxos do sistema inicial para determinação espectrofotométrica de AA envolvendo MIP	87
Figura 15. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de (L) AA envolvendo MIP como separador enantiomêrico	89
Figura 16. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de atrazina envolvendo	

MIP-SPE	93
Figura 17. Micrográfias eletrônicas de varredura do polímero não impresso (NIP) e do polímero molecularmente impresso para (L) AA (MIP) com tamanhos de partículas menores que 250µm	96
Figura 18. Micrografias eletrônicas de varredura do polímero não impresso (NIP) e do polímero molecularmente impresso para atrazina (MIP) com tamanhos de partículas menores que 250 µm	97
Figura 19. Influência do pH reacional	98
Figura 20. Influência da vazão	100
Figura 21. Influência do comprimento da bobina reacional B2	101
Figura 22. Influência da alcalinidade e da vazão	102
Figura 23. Influência da concentração de Co ²⁺	103
Figura 24. Influência da concentração de H_2O_2	104
Figura 25. Influência da temperatura	105
Figura 26. Influência do volume de amostra	106
Figura 27. Influência da concentração de NaOH	108
Figura 28. Influência do comprimento da bobina reacional B2 na determinação de catecol com mini-coluna	110
Figura 29. Influência do volume de amostra na determinação de catecol com mini- coluna	111
Figura 30. Influência da concentração de Co ²⁺ na determinação de catecol com mini- coluna	112
Figura 31. Influência da concentração de H ₂ O ₂ na determinação de catecol com mini- coluna	113

Figura 32. Influência da temperatura na determinação de catecol com mini-

coluna	114
Figura 33. Influência da pH da amostra	115
Figura 34. Curva analítica típica da determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo empregando MIP como extrator em fase sólida.	117
Figura 35. Influência da temperatura na determinação de catecol com 4- aminofenol	120
Figura 36. Influência da vazão na determinação de catecol com 4- aminofenol	121
Figura 37. Influência do comprimento da bobina reacional B ₂ na determinação de catecol empregando MIP extrator	122
Figura 38. Influência da concentração de 4-aminofenol	123
Figura 39. Influência do volume da amostra na determinação de catecol com 4- aminofenol	124
Figura 40. Influência do comprimento da bobina reacional B ₂ na determinação de catecol empregando MIP	126
Figura 41. Influência do volume de amostra na determinação de catecol empregando MIP	127
Figura 42. Influência da concentração de 4-aminofenol na determinação de catecol empregando MIP	128
Figura 43. Influência da natureza do eluente na determinação de catecol empreagndo MIP	129
Figura 44. Curva analítica da determinação espectrofotométrica de catecol com 4- aminofenol empregando sistema de análises em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	132
Figura 45. Influência da concentração de 1,10 fenantrolina	135
Figura 46. Influência da concentração de Fe ³⁺	136

Figura 47. Influência da solução matriz	137
Figura 48. Influência da natureza do eluente na determinação de AA	139
Figura 49. Influência do volume da amostra na determinação de AA	140
Figura 50. Influência da concentração de Fe ³⁺ na determinação de AA empregando MIP	141
Figura 51. Influência da concentração de 1,10 fenantrolina na determinação de AA empregando MIP	142
Figura 52. Influência do comprimento da bobina reacional B2 na determinação de AA empregando MIP	143
Figura 53. Curvas analíticas para L- AA e D-AA	144
Figura 54. Estruturas moleculares dos principais interferentes na determinação de AA	146
Figura 55. Curvas analíticas da determinação espectrofotométrica de AA empregando MIP como separador enantiomérico em fase sólida	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos para determinação de catecol empregando MIP como	
extrator em fase sólida	118
Tabela 2. Influência dos agentes de limpeza	130
Tabela 3. Resultados obtidos para determinação de catecol com 4-aminofenol	
empregando mini-coluna de MIP	133
Tabela 4. Sinais analíticos referentes a soluções L e D- AA com concentrações	
diferentes dos isômeros	144
Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de AA empregando MIP como	
separador enantiomérico	148

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Histórico	4
2.2. Polímeros molecularmente impressos (MIPs): conceitos e aspectos gerais envolvidos na síntese.	8
2.3. MIPs em sistemas de análises em fluxo.	22
2.4. Aplicações analíticas	45
2.4.1. Catecol	45
2.4.2. Ácido Ascórbico	47
2.4.3. Atrazina	50
3. MATERIAIS	61
3.1. Reagentes e soluções	61
3.1.1. Soluções empregadas na determinação de catecol	61
3.1.2. Soluções empregadas na determinação de ácido ascórbico	62
3.1.3. Soluções empregadas na determinação de atrazina	63
3.2. Amostras	64
3.3. Reagentes para síntese dos polímeros impressos	65
3.4. Equipamentos e acessórios	65
4. MÉTODOS	67
4.1. Síntese dos polímeros molecularmente impressos	67
4.1.1. Síntese do MIP para determinação de catecol	68
4.1.2. Síntese e caracterização do MIP para determinação de AA	69

SÚMARIO

4.1.3. Sintese e caracterização do MIP para determinação de atrazina	70
4.2. Determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo.	71
4.2.1. Influência do pH reacional	73
4.2.2. Influência da vazão total	74
4.2.3. Influência do comprimento da bobina reacional B ₂	74
4.2.4. Influência do pH do ambiente reacional e da vazão total	74
4.2.5. Influência das concentrações dos reagentes	74
4.2.6. Influência da temperatura	75
4.2.7. Influência do volume de amostra	75
4.2.8. Seletividade analítica	75
4.3. Determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de	
análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	75
análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida 4.3.1. Influência da concentração de NaOH	75 77
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida 4.3.1. Influência da concentração de NaOH 4.3.2. Influência da natureza do eluente 	75 77 77
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	75 77 77 77 77
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	75 77 77 77 77
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	75 77 77 77 77 77 78
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	75 77 77 77 77 77 78 78
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	 75 77 77 77 78 78 78 78 78 78
 análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida. 4.3.1. Influência da concentração de NaOH. 4.3.2. Influência da natureza do eluente. 4.3.3. Influência do comprimento da bobina reacional B₂. 4.3.4. Influência do volume de amostra. 4.3.5. Influência das concentrações dos reagentes. 4.3.6. Influência da temperatura. 4.3.7. Influência do pH da amostra. 4.3.8. Avaliação da retenção pela coluna. 	 75 77 77 77 78

4.3.10. Aplicação	79
4.4. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises em fluxo	80
4.4.1. Influência do pH do ambiente reacional	81
4.4.2. Influência da temperatura	82
4.4.3. Influência da vazão total	82
4.4.4. Influência do comprimento da bobina reacional B2	82
4.4.5. Influência da concentração de 4-aminofenol	82
4.4.6. Influência do volume da amostra	83
4.4.7. Seletividade analítica	83
4.5. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises	
em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	83
4.5.1. Influência do comprimento da bobina reacional B2	84
4.5.2. Influência do volume de amostra	84
4.5.3. Influência da concentração de 4-aminofenol	84
4.5.4. Influência da natureza do eluente	85
4.5.5. Influência da natureza do agente de limpeza	85
4.5.6. Seletividade analítica	85
4.5.7. Aplicação	86
4.6. Determinação de (L) ácido ascórbico empregando MIP como separador	
enantiomérico em fase sólida	86
4.6.1. Estudos preliminares	86
4.6.2. Influência da solução matriz	88

4.6.3. Influência da natureza do eluente	88
4.6.4. Influência do agente de limpeza	89
4.6.5. Influência do volume de amostra	90
4.6.6. Influência da concentração dos reagentes	90
4.6.7. Influência do comprimento da bobina reacional	90
4.6.8. Capacidade de separação enantiomérica do MIP	90
4.6.9. Tempo de limpeza	91
4.6.10. Seletividade analítica	91
4.6.11. Aplicação analítica	91
4.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de	
análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE	92
4.7.1. Influência da natureza do eluente	93
4.7.2. Influência da solução matriz	93
4.7.3. Influência do volume de amostra	94
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1. Síntese e caracterização dos MIPs	95
5.1.1. MIP para determinação de catecol	95
5.1.2. MIP para determinação de AA	95
5.1.3. MIP para determinação de atrazina	97
5.2. Determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de	
análises por injeção em fluxo	98
5.2.1 Influência do pH ambiente reacional	98

5.2.2. Influência da vazão total	99
5.2.3. Influência do comprimento da bobina reacional B2	100
5.2.4. Influência do pH do ambiente reacional e da vazão total	101
5.2.5. Influência das concentrações dos reagentes	102
5.2.6. Influência da temperatura	104
5.2.7. Influência do volume de amostra	105
5.2.8. Seletividade analítica	107
5.3. Determinação de catecol empregando sistema de análises por injeção em	
fluxo e MIP como extrator em fase sólida	107
5.3.1. Influência da concentração de NaOH	108
5.3.2. Influência da natureza do eluente	109
5.3.3. Influência do comprimento da bobina reacional B ₂	109
5.3.4. Influência do volume de amostra	110
5.3.5. Influência das concentrações dos reagentes	111
5.3.6. Influência da temperatura	113
5.3.7. Influência do pH da amostra	114
5.3.8. Avaliação da retenção pela coluna	115
5.3.9. Seletividade analítica	115
5.3.10. Aplicação	116
5.4. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises	
em fluxo	119
5.4.1. Influência do pH reacional	119

5.4.2. Influência da temperatura	119
5.4.3. Influência da vazão total	120
5.4.4. Influência do comprimento da bobina reacional B2	121
5.4.5. Influência da concentração de 4-aminofenol	122
5.4.6. Influência do volume de amostra	123
5.4.7. Seletividade analítica	124
5.5. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises em fluxo e MIP como extrator em fase sólida	125
5.5.1. Influência do comprimento da bobina reacional B2	125
5.5.2. Influência do volume de amostra	126
5.5.3. Influência da concentração de 4-aminofenol	127
5.5.4. Influência da natureza do eluente	128
5.5.5. Influência da natureza dos agentes de limpeza	129
5.5.6. Seletividade analítica	131
5.5.7. Aplicação	131
5.6. Determinação de (L) ácido ascórbico empregando MIP como separador	
enantiomérico em fase sólida	134
5.6.1 Estudos preliminares	134
5.6.2. Influência da solução matriz	136
5.6.3. Influência da natureza do eluente	138
5.6.4. Influência do agente de limpeza	139
5.6.5. Influência do volume de amostra	140

5.6.6. Influência das concentrações dos reagentes	140
5.6.7. Influência do comprimento da bobina reacional	142
5.6.8. Capacidade de separação enantiomérica do MIP	143
5.6.9. Tempo de limpeza da coluna	145
5.6.10. Seletividade analítica	145
5.6.11. Aplicação	147
5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de	
5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE	149
 5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE. 5.7.1. Influência da natureza do eluente 	149 149
 5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE. 5.7.1. Influência da natureza do eluente. 5.7.2. Influência da solução matriz. 	149 149 150
 5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE. 5.7.1. Influência da natureza do eluente. 5.7.2. Influência da solução matriz. 5.7.2. Influência do volume de amostra. 	149 149 150 151
 5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE. 5.7.1. Influência da natureza do eluente. 5.7.2. Influência da solução matriz. 5.7.2. Influência do volume de amostra. 6. CONCLUSÕES. 	149 149 150 151 153

1. INTRODUÇÃO

À medida que a Ciência avança, os protocolos de análises químicas tornam-se cada vez mais eficientes [Guiochon; Beaver, 2004]. Instrumentação e procedimentos analíticos têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados, o que possibilitou um avanço dos sistemas analíticos, permitindo assim a obtenção de menores limites de detecção e redução acentuada no tempo total da análise. Em virtude deste avanço tecnológico, novas vertentes foram surgindo e passaram a ser o alvo das pesquisas na atualidade. Dentre estas, a busca por melhor seletividade bem como a redução na emissão de resíduos merecem destaque.

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande importância para uma melhor determinação de espécies químicas e, consequentemente, para aumentar a confiabilidade dos resultados analíticos. Em virtude disso, o emprego de etapas de separação/ concentração se faz, em muitos casos, necessário. Todavia, devido à complexidade de algumas matrizes, aos baixos teores dos constituintes de interesse e à presença de interferentes em potencial, o desempenho das técnicas de separação/ concentração pode ser prejudicado. Neste contexto, o emprego de polímeros molecularmente impressos (do inglês - "Molecularly Imprinted Polymers" - MIPs) tem demosntrado ser uma eficiente ferramenta analítica com grandes potencialidades para minimizar as referidas limitações nas técnicas de separação/ concentração tradicionalmente empregadas.

MIPs são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa, de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do analito ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização, a molécula molde é removida por dissolução ou evaporação (quando os analitos são

voláteis), revelando sítios de ligação (cavidades) que são complementares em forma e tamanho ao analito. Com esta estratégia, o resultado é uma "memória" molecular no polímero, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo da molécula molde. Isto possibilita a separação da mesma de uma matriz complexa, minimizando a influência dos interferentes em potencial presentes na amostra, bem como contornando possíveis efeitos matriciais. Por apresentarem reconhecimento molecular semelhante aos sistemas seletivos enzima-substrato e/ ou antígeno-anticorpo, estes polímeros também podem ser chamados de polímeros biomiméticos. MIPs apresentam algumas características adicionais quando comparados aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos). Estas vantagens contemplam o fácil preparo, o baixo custo, a possibilidade de síntese em ambientes adversos, nos quais biomoléculas naturais não resistiriam, tais como a presença de ácidos, bases, íons metálicos, solventes orgânicos bem como altas temperaturas e pressões [Haupt; Mosbach, 1999; Pilesky; Alcock; Turner, 2001].

Devido a estas características, MIPs têm sido amplamente empregados em processos de separação/ concentração cromatográfica para melhorar a seletividade analítica e discriminar espécies químicas com estruturas similares ou, ainda, espécies químicas pertencentes à mesma família de compostos (e.g. família das triazinas). No entanto, a automação dos processos de separação não é muito empregada, sendo que as etapas envolvidas na extração são frequentemente realizadas manualmente, o que pode ocasionar erros, dificuldades operacionais, além do consumo em grande escala de reagentes, contribuindo para o aumento na quantidade de resíduos laboratoriais o que não se coaduna com a proposta de Química Limpa tão difundida atualmente.

Neste contexto, os sistemas de análises por injeção em fluxo representam uma importante ferramenta para viabilizar os processos aqui salientados, bem como para diminuir a quantidade de resíduos gerados e para minimizar erros na manipulação dos reagentes e solventes empregados, o que consequentemente diminui o risco de uma possível exposição e contaminação do analista. O emprego de MIPs como separadores em processos de extração em fase sólida em sistemas de análises em fluxo é recente, configurando-se em uma estratégia a ser estudada, avaliada e explorada, sendo este o principal objetivo deste trabalho de Tese. A implementação desta estratégia nos referidos sistemas visa principalmente a melhoraria em robustez bem como uma maior rapidez e uma melhor eficiência no processo de separação. Como técnica de detecção, será empregada a espectrofotometria no UV-Vis.

A utilização desta estratégia é inovadora para compostos enantioméricos, bem como a combinação de MIPs em sistemas de análises em fluxo. A flexibilidade destes sistemas será explorada visando simplicidade operacional e sensibilidade analítica. Como aplicações, serão investigadas as determinações de catecol em águas naturais, águas residuais, medicamentos e extratos de chá verde; de atrazina em águas naturais e em extratos de solos bem como a determinação das espécies D(+) e L(-) do ácido ascórbico em sucos naturais.

3

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão aborda um breve histórico sobre a origem dos polímeros molecularmente impressos, os aspectos mais importantes envolvidos na síntese, a associação de MIPs com sistemas de análises em fluxo bem como o emprego de MIPs para a determinação de catecol e de atrazina.

2.1. Histórico

Acredita-se que a origem dos MIPs está intimamente relacionada aos estudos envolvendo preparo de sílicas para separação cromatográfica [Anderson; Nicholls, 2001]. Existem divergências quanto à sua procedência, uma vez que os primeiros exemplos de impressão molecular em polímeros orgânicos sintéticos só foram relatados no início da década de 70.

Neste sentido, deve-se ressaltar que, no início dos anos 30, Polyakov (1931) [Polyakov, 1931 apud Anderson; Nicholls, 2001, p.2]¹ ao preparar uma série de sílicas para uso em cromatografia, observou que estas apresentavam algumas propriedades de adsorção pouco usuais. Os experimentos realizados por Polyakov consistiam na acidificação de uma solução de silicato de sódio empregando carbonato de amônio como iniciador de polimerização. Após duas semanas, diferentes aditivos (benzeno, tolueno ou xileno) eram acrescentados as sílicas e estas eram levadas à secagem por cerca de 20 a 30 dias. Os aditivos eram então removidos por um demorado processo de lavagem com água quente. Em estudos de adsorção subseqüentes, Polyakov observou que as sílicas preparadas apresentavam uma alta capacidade de retenção frente aos aditivos empregados na polimerização e, consequentemente, uma melhor seletividade.

¹ POLYAKOV, M.V. Adsorption properties and structure of silica gel. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, Heidelberg, v. 2, p. 799-805,1931.

Trabalhos posteriores [Polyakov et al., 1933 apud Alexander et al., 2006, p.107; Polyakov et al., 1937 apud Alexander et al., 2006,p.107]^{2 3} apresentavam maiores detalhes sobre os experimentos realizados. Nestes, os aditivos foram considerados como moldes (do inglês - "templates") que diretamente afetaram a superfície da sílica resultante, causando mudanças estruturais que refletiam a natureza do aditivo, conferindo a esta melhor seletividade

Na mesma época em que Polyakov publicou seu primeiro artigo, a origem da seletividade de anticorpos em sistemas imunológicos estava em grande debate. Uma hipótese sobre a possível formação de anticorpos nos organismos vivos foi apresentada por Breinl e Haurowitz [Breinl; Haurowitz, 1930 apud Alexander, 2006, p.107]⁴ e posteriormente por Mudd [Mudd, 1932]. Neste contexto, Pauling (1940) investigou o reconhecimento de anticorpos por sítios específicos nos antígenos em sistemas imunológicos [Pauling, 1940]. Este propôs que a formação de anticorpos possivelmente ocorria na presença de um antígeno, capturado pela célula, sendo este uma espécie de molde para a formação dos anticorpos. Pauling sugeriu que a estrutura primária de um anticorpo era idêntica à do molde (antígeno), o que em parte explicava a extraordinária seletividade apresentada pelos anticorpos. Mais tarde, Pauling e Campbell (1942) sugeriram que esta seletividade poderia ser comprovada precipitando-se globulina, sob

5

² POLYAKOV, M.V.; STADNIK, P.; PARYCKIJ, M.; MALKIN, I.; DUCHINA, F. On the structure of silica. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, Heidelberg, v. 4, p. 454 - 456, 1933.

³ POLYAKOV, M.V.; KULESHINA, L.; NEIMARK, I. On the dependence of silica gel adsorption properties on the character of its porosity. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, Heidelberg, v.10, p. 100 -112, 1937.

⁴ BREINL, F.; HAUROWITZ, F. Chemical examinations on the precipitate from haemoglobin and anti-haemoglobin serum and comments on the nature of antibodies. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie, Strassburg**, v. 192, p. 45–57, 1930.

condições desnaturantes, na presença de um antígeno e pela subseqüente remoção e re-dissolução desta. A globulina poderia então exibir seletividade pelo antígeno empregado no experimento [Pauling; Campbell, 1942]. Tentativas foram então realizadas com o intuito de se aplicar esta teoria em um sistema inorgânico, mais especificamente em sílicas. Os resultados foram apresentados em 1949 por Pauling em uma palestra onde ele descreveu os resultados obtidos por um de seus estudantes, Dickey [Dickey, 1949]. A metodologia empregada por Dickey era similar àquela realizada por Polyakov mas, neste caso, alaranjado de metila e outros corantes foram usados como moldes no começo do processo de polimerização com silicato de sódio e ácido acético, outros ácidos orgânicos foram ainda empregados como agentes acidificantes. Dickey observou que a sílica preparada na presença de um dos quatro corantes apresentava maior seletividade a este corante mesmo quando os demais corantes estavam presentes. Em outras palavras, Dickey demonstrou que alguns adsorventes sólidos sintéticos poderiam se moldar em torno de uma espécie química de interesse (molde), resultando em cavidades seletivas apenas para a espécie química usada na fabricação da sílica.

Na década de 50, a seletividade quiral dos enantiômeros dos ácidos mandélico e canforsulfônico foram demonstradas por Curti e colaboradores (1951; 1952) empregando sílicas impressas como fase estacionária de uma coluna cromatográfica [Curti; Colombo,1951; Curti; Colombo,1952 apud Alexander et al., 2006, p.108]^{5,6}. Estudos similares foram relatados pelo grupo de Klabunovskii

⁵CURTI,R.;COLOMBO,U. Active sites in stereoselective adsorbents as models of drug receptors and enzyme actives sites. **Chimica e l'Industria**, Milão, v.23, p.103,1951.

⁶ CURTI,R.;COLOMBO,U. Chromatography of stereoisomers with 'tailor made' compounds. Journal of the American Chemical Society, Washington, v.74, p.3961-3961, 1952.

(1963) [Klabunovskii et al., 1963 apud Alexander et al., 2006, p.108]⁷, porém, o trabalho mais notável foi apresentando pelo grupo de Patrikeev. Neste, uma "espécie de bactéria" era incubada na sílica numa etapa anterior ao processo de secagem, sendo a sílica então aquecida até secura e avaliada [Patrikeev; Smirnova; Maksimova, 1962 apud Alexander et al., 2006, p.109]⁸. Patrikeev e colaboradores observaram que esta sílica impressa apresentava uma maior capacidade de fornecer moldes para a "espécie de bactéria" empregada relativamente às outras sílicas de referência utilizadas para a mesma finalidade e posteriormente, verificaram que a mesma apresentava enantioseletividade [Patrikeev et al.,1960 apud Alexander et al., 2006, p.109]⁹. Um procedimento para produção de uma enzima sintética com MIP foi ainda relatado por este mesmo grupo, o qual empregou o termo MIP em vários sentidos.

Diversos trabalhos foram relatados a partir das primeiras descobertas realizadas por Polyakov. Após duas décadas de intensa investigação na área, verificou-se entretanto uma diminuição nos estudos envolvendo a impressão molecular de sílicas concomitantemente com a introdução dos primeiros trabalhos de polímeros orgânicos molecularmente impressos. Em 1972, Takagishi e Klotz [Takagishi; Klotz, 1972 apud Andersson; Nicholls, 2001, p.16]¹⁰ demonstraram que a ligação de pequenas moléculas a um polímero orgânico em meio aquoso podia ser melhorada introduzindo-se grupos hidrofóbicos, e que as ligações

7

⁷ KLABUNOVSKII, E.I.; AGRONOMOV, A.E.; VOLKOVA, L.M.; BALANDIN, A.A. Absorption of racemic and (+)-2-butanol on stereospecific silica gels. **Izvestiya Akademii Nauk Respubliki Kazakhstan, Seriya Khimicheskaya**, Russian, p.228-234, 1963.

⁸ PATRIKEEV, V.; SMIRNOVA, Z.; MAKSIMOVA, G. Some biological properties of specifically formed silica. **Doklady Akademii Nauk SSSr**, Russian, v.165, p.707-709, 1962.

⁹ PATRIKEEV, V.; BALANDIN, A.; KLABUNOVSKII, E. MARDASZEW, J.; MAKSIMOVA, G. selectivity of an adsorbent produced in the presence of bacteria with respect to optical isomers. **Doklady Akademii Nauk SSSr**, Russian, v.132, p.850-852, 1960.

¹⁰ TAKAGISHI, T.; KLOTZ, I. M. Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. **Biopolymers**, Weinheim, v. 11, p. 483-491, 1972.

formadas pela adição deste grupos se diferenciavam daquelas apresentadas por um polímero hidrofílico. Os autores relataram ainda que a introdução de um reagente de ligação cruzada (do inglês - "cross-linker") restringia a mobilidade da polimérica, levando à melhoria na capacidade de cadeia adsorcão. Posteriormente, Wulff e Sarhan [Wulff; Sarhan, 1972 adup Andersson; Nicholls, 2001, p.16]¹¹ descreveram a copolimerização do ácido D-glicérico e divinilbenzeno com uma subseqüente hidrólise do glicerato. Os autores observaram que o polímero resultante apresentava impressões com reconhecimento quiral para o ácido D-glicérico. A partir de então, a aceitação desta nova estratégia de separação foi crescente, resultando em avanços nas técnicas de polimerização, incluindo melhorias nos materiais poliméricos, o que possibilitou um crescimento no número aplicações analíticas [Wulff; Vietmeier; Poll, 1987; Andersson; Mosbach, 1990; Whitcombe; Vulfson, 2001].

2.2. Polímeros molecularmente impressos (MIPs): conceitos e aspectos gerais envolvidos na síntese

MIPs são polímeros sintéticos que apresentam alta seletividade a uma molécula de interesse. Em geral, são facilmente sintetizáveis, podendo ser moldados de acordo com sua utilização, sendo sua síntese em geral pouco onerosa. Apresentam características vantajosas de estabilidade, robustez, seletividade, resistência a altas temperaturas e pressões e inércia química a ácidos, bases e solventes orgânicos. Em função destas características, e dada sua alta seletividade, estes polímeros têm sido bastante empregados no preparo

¹¹ WULFF, G.; SARHAN, A. Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. Angewandte Chemie, Weinheim, v. 84, p.364, 1972.

de amostras atuando como adsorventes em técnicas de separação tais como cromatografia líquida de alta eficiência [Hwang; Lee, 2002], eletroforese capilar [Nilsson et al., 1994] eletrocromatografia capilar [Suedee et al.,1999], cromatografia em camada delgada [Kriz; Mosbach, 1995], bem como em extração em fase sólida (SPE do inglês -"solid phase extraction") [Andersson, 2000] e em micro extração em fase sólida [Koster, 2001], sendo ainda muito empregados nas áreas biológica, farmacológica e alimentícia [Martin-Steban, 2001; Ramström et al.,2001; Kandimalla; Ju, 2004; Hilt; Byrne, 2004; Xu; Zhu; Chen, 2004; Whitcombe; Vulfson, 2001].

A seletividade dos MIPs está diretamente relacionada ao reconhecimento pelo polímero de uma molécula de interesse, a qual foi empregada previamente como molde no processo de sua síntese. O processo de impressão molecular é geralmente realizado com a mistura de um monômero funcional [Haupt, 2001] com a molécula de interesse (analito), a qual serve de molde para as cavidades tridimensionais a serem impressas no polímero. Neste processo, podem ocorrer interações reversíveis entre os grupos funcionais ligantes da molécula molde e os grupos funcionais do monômero empregado na síntese. Após esta etapa, um reagente de ligação cruzada e um iniciador radicalar são adicionados para estabilizar as ligações e iniciar a polimerização. A combinação e escolha dos reagentes para síntese de MIPs devem ser criteriosamente avaliadas para cada analito, de forma a minimizar algumas características indesejáveis, como a formação de polímeros pouco porosos com baixa eficiência de separação devido à formação de poucos sítios ativos [Tarley; Sotomayor; Kubota, 2005]. Após a formação do MIP, o molde é removido, deixando as cavidades tridimensionais

9

vazias com seus respectivos sítios de reconhecimento ativos para serem ligados à espécie química em que foi moldada (Figura 1).



Figura 1. Representação esquemática do processo de impressão molecular. Adaptado de He et al., 2007.

A seletividade dos MIPs depende fundamentalmente do processo de síntese e, conseqüentemente, das variáveis envolvidas: proporções molares entre a molécula molde e monômero funcional, tipo e quantidade de solvente, quantidades do reagente de ligação cruzada e do iniciador radicalar, tempo e processo de polimerização. Um bom conhecimento de equilíbrio químico entre os compostos envolvidos, da teoria de reconhecimento molecular e de termodinâmica são importantes para que seja obtido um MIP com elevado número de cavidades [Katz; Davis, 1999]. Desta forma, a otimização dos parâmetros envolvidos na síntese é essencial para a confecção de MIPs. Relativamente a moléculas molde para as quais ainda não existe um protocolo de síntese, há a necessidade de se conhecer profundamente todas as variáveis envolvidas e suas interdependências

[Spivak, 2005]. De fato, a escolha do analito, monômero funcional, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar são de extrema importância na síntese de MIPs.

A estrutura molecular da molécula molde (analito) determina o tipo de monômero funcional a ser utilizado na síntese, já que as ligações químicas entre ambos é que fundamenta o reconhecimento molecular. O analito deve apresentar grupos funcionais capazes de interagir fortemente com o monômero, afim de formar uma espécie de "complexo estável" entre eles. Este deve ser quimicamente inerte sob as condições de polimerização e estável sob condições de síntese (temperatura ou radiação UV).

O solvente tem como função principal a solubilização da molécula molde bem como a agregação, em uma só fase, de todas as substâncias envolvidas na polimerização não interferindo na interação analito-monômero. Além disto, a natureza e o volume do solvente podem influenciar as características morfológicas dos MIPs, uma vez que ele é responsável pelo grau de porosidade dos mesmos. Polímeros pouco porosos e com pequena área superficial apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular, basicamente devido à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos. Solventes apolares e com baixa constante dielétrica tem sido os mais indicados para a síntese [Martin-Steban, 2001]. A escolha de um solvente porogênico que não interfira na interação analito-monômero e que garanta uma morfologia adequada do polímero não é tarefa fácil. Para que os MIPs apresentem características desejáveis quanto à seletividade, é fundamental que haja um estudo apurado do tipo e/ou composição dos solventes empregados na síntese [Tarley; Sotomayor; Kubota, 2005]. Os solventes geralmente usados são: acetonitrila, tolueno, dimetilsulfóxido, metanol, clorofórmio, dentre outros.

O monômero funcional determina o tipo de ligação nos sítios impressos do polímero. Sua escolha depende da natureza do analito, ou seja, o monômero deve corresponder à funcionabilidade da molécula molde e as suas interações devem ser fortes o suficiente para realizar a formação dos sítios de ligação, mas também, fracas o suficiente para permitir a retirada do molde de maneira a não destruir as cavidades de reconhecimento formadas. Como a interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio, quantidades superiores de monômero em relação à molécula molde (geralmente 4:1 mol/ mol) devem ser empregadas com o intuito de se deslocar o equilíbrio para uma maior formação de complexos analito-monômero [Martin-Steban, 2001, Tarley; Sotomayor; Kubota, 2005]. Misturas de monômeros funcionais também podem ser usadas para prover cavidades mais específicas no polímero; entretanto, co-polimerização e complexação do molde durante a síntese podem ocorrer [Cormack; Elorza, 2004]. Desta forma, a escolha do monômero funcional ou de uma mistura de monômeros deve ser cuidadosa [Karim et al., 2005]. O Quadro 1 apresenta as estruturas moleculares dos principais monômeros funcionais empregados na síntese de MIPs bem como o algumas interações destes com o analito.

Quadro 1. Monômeros funcionais comumente empregados na síntese de polímeros impressos molecularmente. Fonte : Sellerger e Hall, 2001

Monômero funcional	Estrutura química	Interação com o analito
Ácido acrílico	OH	lônica e ponte de hidrogênio
Ácido metacrílico	ОН	lônica e ponte de hidrogênio
Ácido p-vinilbenzóico	OH	lônica e ponte de hidrogênio
Ácido acrilamidosulfônico	NH SO ₃ H	lônica
Amino metacrilamida	NH NR ₂	lônica
4-vinilpiridina	N	lônica, ponte de hidrogênio e transferência de carga
2-vinilpiridina	N	lônica, ponte de hidrogênio e transferência de carga
4-vinilimidazol	NH	lônica, ponte de hidrogênio e coordenação de metais
1-vinilimidazol	N	lônica, ponte de hidrogênio e coordenação de metais
Acrilamida	NH ₂ O	ponte de hidrogênio
O agente de ligação cruzada é o reagente que realiza a união dos monômeros funcionais para a formação do polímero. Um dos reagentes mais utilizados é o etileno glicol dimetacrilato, que desempenha diversas funções, tais como: controlar a morfologia da matriz polimérica (macro porosa, gel, micro-gel), estabilizar as ligações impressas (ligações molde-monômero funcional) e conferir estabilidade mecânica ao polímero. Este reagente é geralmente colocado em excesso (cerca de 80%), e seu caráter funcional deve corresponder ao do monômero funcional, principalmente quando são empregadas misturas de monômeros [Cormack; Elorza, 2004]. O Quadro 2 ilustra as estruturas moleculares dos principais reagentes de ligação cruzada usados em sínteses de MIPs.



Quadro 2. Estruturas químicas de reagentes de ligação cruzada comumente usados em sínteses de MIPs. Adaptado de Comarck e Elorza, 2004

O iniciador radicalar é, por sua vez, o reagente que fornece radicais livres na polimerização. Através da sua decomposição térmica ou fotolítica, os primeiros radicais são formados. A polimerização então se inicia quando estes interagem com as moléculas do reagente de ligação cruzada e seu término ocorre após o fechamento de toda a cadeia polimérica. O controle da polimerização é basicamente ditado pela velocidade de formação destes radicais, pelo ajuste de temperatura/ radiação UV e pela composição química dos compostos envolvidos [Sellergren; Hall, 2001]. A estabilidade da temperatura é muito importante para se obter um polímero bem estruturado. Variações bruscas na temperatura podem acarretar a formação descontrolada de radicais, bem como interferir na quantidade de cavidades impressas comprometendo o desempenho dos MIPs. O iniciador radicalar mais empregado tem sido o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN), porém outros podem ser utilizados como o azo-bis-iso-dimetilvaleronitrila (ABDV) e o ácido 4,4'-azo-bis(4-ciano pentaenóico) (Quadro 3) sendo sua escolha dependente da temperatura de síntese a ser empregada e do analito



Quadro 3. Estruturas químicas dos iniciadores radicalares usados na síntese de MIPs. Fonte : Tarley; Stomayor e Kubota, 2005.

Como a síntese dos MIPs requer um controle rígido dos parâmetros envolvidos, a falta de conhecimento da interdependência destes parâmetros pode gerar polímeros com poucos sítios de ligação. A vasta literatura sobre MIPs disponível atualmente, descreve uma série de procedimentos envolvidos antes e depois da síntese bem como teorias e fundamentos potencialmente úteis quando novos polímeros são almejados [Cormack; Elorza, 2004; Sellergren; Hall, 2001; Ye; Mosbach, 2001; Qiao et al., 2006; Whitcombe; Vulfson, 2001; Ekberg; Mosbach,1989; Spivak, 2005; Katz; Davis,1999].

Neste sentido, a busca por estratégias que facilitem os procedimentos experimentais de síntese e a posterior interpretação dos resultados resultou no emprego de ferramentas quimiométricas envolvendo experimentos de otimização univariada que levam em consideração a influência de diferentes parâmetros de síntese como a variação dos monômeros funcionais [Ramstrom et al.,1993], as frações molares dos reagentes envolvidos [Baggiani et al., 2004], as condições de síntese [Pérez-Moral; Mayes, 2004; Fireman-Shoresh; Avnir; Marx, 2003], etc. Procedimentos envolvendo quimiometria e análise combinatória dos parâmetros envolvidos na formação de MIPs também tem sido relatados [Davies; de Biasi; Perrett, 2004; Rosengren et al., 2005; Lanza; Sellergren, 2004] sendo considerados, atualmente, os mais promissores com relação à síntese de MIPs para novas moléculas molde. O emprego destas ferramentas quimiométricas possibilita uma maior simplicidade operacional, um menor tempo de experimentação e uma melhor interpretação das variáveis interdependentes. A aplicação do planejamento fatorial multivariado para interpretação da influência das variáveis de síntese tem sido, no entanto, pouco relatada, porém esta se

afigura como uma alternativa promissora e eficiente relativamente aos procedimentos morosos de otimização univariada.

No que diz respeito aos métodos empregados na síntese de MIPs, a polimerização pelo método "bulk" tem sido a mais utilizada em virtude da simplicidade de sua execução [Qiao et al., 2006]. Nesta, a polimerização é realizada em um sistema homogêneo onde todos os reagentes (monômero, analito, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar) são misturados em uma ampola e as reações ocorrem sob atmosfera de argônio ou de nitrogênio, uma vez que a presença de oxigênio retarda a formação de radicais livres [Cormack; Elorza 2004]. Após a mistura de todos os reagentes envolvidos, a ampola é selada e aquecida (ou foto-irradiada) durante um determinado intervalo de tempo (cerca de 24h). O bloco polimérico formado é então triturado até a granulometria desejada, a qual é obtida pelo emprego de peneiras de malhas específicas. Sínteses mais complexas compreendem a formação de esferas de polímeros impressos por expansão em multi-etapas (do inglês- "multi-step swelling") [Haginaka; Kagawa, 2002], por suspensão [Pang et al., 2005], por precipitação [Li; Stover, 2000], sobre superfícies modificadas de suportes sólidos [Quaglia et al.,2001] ou ainda nos poros de sólidos como sílica e resinas [Plunkett; Arnald, 1995; Yilmaz et al., 2002]. Suas vantagens e desvantagens têm sido amplamente discutidas [Ye; Mosbach, 2001; Whitcombe; Vulfson, 2001; Alexander, 2006; Spivak, 2005; Cormack; Elorza 2004; Ansell, 2005]

O mecanismo na reação via formação de radicais livres, empregado na polimerização em "bulk", é constituído de três etapas distintas [Sellergren; Hall, 2001]. A primeira etapa consiste na formação de radicais livres pela quebra da molécula do iniciador radicalar (Figura 2); a segunda etapa (propagação) segue

com a subseqüente transferência de radicais livres para o reagente de ligação cruzada, ligando os monômeros e, por fim, a última etapa se constitui no término da síntese quando toda a cadeia polimérica está formada [Ye; Mosbach, 2001].



Figura 2. Polimerização via radical livre do monômero funcional ácido metacrílico com 2,2- azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador radicalar. Fonte : Sellerger e Hall. 2001.

A síntese dos polímeros deve ser realizada especificamente para cada substância de interresse, uma vez que as cavidades são dependentes da estrutura tridimensional da molécula usada como molde, como já enfatizado. Estas cavidades são formadas por meio de ligações químicas entre o analito e o monômero funcional [Qiao et al.,2006] e estas ligações são o princípio da impressão molecular no polímero, o qual pode apresentar ligações covalentes reversíveis, ligações não-covalentes, ligações eletrostáticas ou de van der Waals ou ainda, por meio de interações com o núcleo de um metal [Tarley, Sotomayor, Kubota,2005].

Quando os MIPs são formados por ligações covalentes, observa-se uma maior dificuldade em se retirar o molde após a polimerização. Isto se deve à

natureza destas ligações, que são consideradas ligações fortes. Devido a isto, os sítios de ligação geralmente ficam indisponíveis após a retirada do molde. Novas ligações são estabelecidas, inativando as cavidades anteriormente formadas. Outro inconveniente é o número limitado de moléculas compatíveis com essa metodologia, a qual pode ser empregada somente para moléculas pertencentes à classe dos álcoois, aldeídos, cetonas, aminas ou ácidos carboxílicos [Whitcombe; Vulfson, 2001].

Desde a sua concepção, a impressão não-covalente [Spivak, 2005], que explora ligações não-covalentes entre o monômero funcional e a molécula molde [Ekberg; Mosbach, 2001], tem sido a mais estudada e mais aplicada. Isto se deve à versatilidade das interações não-covalentes formadas, tais como pontes de hidrogênio e ligações iônicas (íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido - dipolo induzido) [Whitcombe; Vulfson, 2001]. Além disto, a cinética de ligação é bastante rápida e a quebra das ligações para a retirada do molde é realizada de maneira simples. Algumas limitações, no entanto, têm sido observadas quanto à formação heterogênea dos sítios de ligação que se dá em função da natureza fraca das ligações não-covalentes [Ye; Mosbach, 2001].

Para contornar as limitações oriundas das impressões covalentes e nãocovalentes, um procedimento que associa às características vantajosas de ambas as impressões foi desenvolvido sendo denominado "sacrificial spacer" [Whitcombe; Vulfson, 2001]. Esse procedimento utiliza um monômero funcional que se liga à molécula molde por meio de ligações covalentes, mas que é facilmente retirado por clivagem hidrolítica, liberando CO₂ após a polimerização. Os grupos remanescentes no sítio formado após a hidrólise são capazes de se religar à molécula molde por meio de interações não-covalentes. Assim, as

interações covalentes entre o monômero funcional e a molécula molde só ocorrem na etapa de síntese, possibilitando ligações de caráter não-covalente para as cavidades de reconhecimento molecular impressas no polímero.

Dentre todas as etapas envolvidas no preparo e no emprego de MIPs, a caracterização dos polímeros após a síntese é, sem dúvida, aquela mais difícil de ser realizada, uma vez que os processos de impressão são realizados em nível molecular e os polímeros formados são insolúveis [Cormack; Elorza, 2004]. A caracterização química pode envolver micro análise elementar de carbono, hidrogênio, nitrogênio, cloro, etc, porém este método permite apenas a verificação de co-polímeros, mas não permite a determinação de pequenas guantidades das moléculas molde. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier também pode ser explorada para verificação de ligações químicas nos MIPs [Cormack; Elorza, 2004]. Para a caracterização morfológica, onde se verifica o tamanho e a quantidade dos poros distribuídos na área superficial, técnicas como porosimetria com sorção de nitrogênio, experimentos com solventes e microscopia por varredura eletrônica podem ser empregados [Sellergren; Hall, 2001]. Porém, o reconhecimento molecular do analito pelos MIPs foi considerado por muito tempo como um dos parâmetros mais difíceis de ser verificado. No entanto, em recentes trabalhos envolvendo ressonância magnética nuclear, foi possível verificar a formação de ligações dos monômeros funcionais ao redor da molécula molde [Yoshida et al., 2000]. Estudos envolvendo espectrofotometria no UV-Vis e diferenças de temperatura na eluição em HPLC (avaliação termodinâmica) também tem sido relatados [Lu et al., 2003].

A automação destes processos se torna um importante aliado à simplicidade e robustez. Consequentemente, novos equipamentos para este fim

tem sido desenvolvidos [Takeuchi et al., 1999; Villoslada; Takeuchi, 2005]. Nestes, mini-MIPs são formados *in situ* por meio do emprego de sistemas semiautomáticos dotados de programas computacionais com análise combinatória para variação dos parâmetros e realização das etapas de síntese. Esta estratégia permite uma seleção dos polímeros formados antes de serem usados como extratores em fase sólida, o que minimiza a duração e os custos da síntese, gerando ainda bibliotecas virtuais com os resultados obtidos pelas variações das substâncias interdependentes usadas na síntese. A mecanização nesta etapa tem se apresentado promissora, principalmente visando a fabricação de MIPs comerciais.

A automação tem demonstrado outros benefícios quanto ao emprego de MIPs como extratores de fase sólida. A implementação de SPE em sistemas de análises em fluxo é amplamente recomendada quando se necessita uma eficiente separação/ concentração do analito e ao mesmo tempo um tratamento da amostra, sendo exemplificada nas mais diversas matrizes através de diferentes extratores em fase sólida [Tarley; Arruda, 2005; Silva et al., 1998; Pereira, 2004]. Uma das ferramentas analíticas que permite essa flexibilidade consiste nos sistemas de análises em fluxo.

O sistema de análises em fluxo é um excelente gerenciador de soluções, o que facilita a consecução das etapas de separação/ concentração, condicionamento e eluição, possibilitando o controle total dos procedimentos analíticos envolvidos, a minimização no consumo de reagentes (eventualmente tóxicos), o aumento da freqüência analítica e uma maior flexibilidade operacional. A possibilidade de se aplicar diferentes substratos sólidos para SPE em linha torna este sistema bastante eficaz para a implementação de MIPs [Murray, 2001].

A exploração de MIP-SPE nestes sistemas ainda é escassa e, geralmente, as etapas de condicionamento do polímero e de separação/ concentração dos analitos são usualmente realizadas de maneira manual pelo analista, sendo apenas a etapa de eluição e transporte ao detector realizado em linha.

Considerando-se as características favoráveis do emprego de MIPs, e aquelas dos analisadores em fluxo, pode-se inferir que a união destas duas estratégias se afigura como promissora.

2.3. MIPs em sistemas de análises em fluxo.

A extração em fase sólida é uma das estratégias mais empregadas quando a amostra apresenta analitos em baixas concentrações e complexidade de matriz. Sua ampla utilização pode ser confirmada pelo grande número de artigos publicados e aplicações nas mais diversas áreas (4901 artigos segundo pesquisa na Web of Science, 2008). A versatilidade desta estratégia está relacionada aos diferentes materiais que compõem a fase sólida e à sua aplicabilidade relativamente ao sistema de detecção. De acordo com o objetivo da análise química, a extração em fase sólida pode apenas separar ou concentrar o analito, reter as espécies químicas interferentes ou "limpar" a amostra por meio de processos separativos como, por exemplo, a exclusão por tamanho. Geralmente a "limpeza" da amostra ocorre simultaneamente com outro processo, uma vez que a amostra é obrigatoriamente "filtrada" quando atravessa uma fase sólida.

Este processo remonta ao início dos anos 50, quando surgiu a necessidade de se obter uma amostra mais "limpa" para análises em sistemas de detecção com pouca seletividade ou, ainda, a necessidade da concentração do analito para técnicas de detecção de baixa sensibilidade [Liska, 2000]. SPE teve

início na separação de compostos orgânicos de amostras de águas por membranas poliméricas [Dressler, 1979] e, desde então, o aperfeiçoamento desta estratégia tem sido crescente, principalmente com relação ao preparo de amostras [Liska, 2000].

Dentre as diversas aplicações da SPE podem ser citadas: retirada de matéria orgânica de amostra de águas previamente à separação por cromatografia líquida de alta eficiência [Liska; Krupcik; Leclercq, 1989], separação e/ou concentração de espécies químicas para melhoria em seletividade e sensibilidade na detecção espectrofotométrica [Lobinski; Marczenko, 1992], separação de impurezas em baixos teores [Keil; Dahmen; Volmer, 1999], etc. Dependendo do procedimento analítico envolvido, os materiais para extração em fase sólida podem ser incorporados dentro de mini-colunas [Poole; 2003], em membranas [Hauser; Litten,1994], em discos [Pons; Forteza; Cerda, 2005], nas paredes de tubos [Anthemidis; Zachariadis; Stratis, 2001], em microesferas renováveis [Wang; Chen; Wang, 2006] ou em cartuchos [Masque; Marce; Borrrull, 2001]. Estes materiais são geralmente acomodados em mini-colunas, as quais são inseridas antes do detector ou de outro componente do processo analítico. Estas mini-colunas podem ser constituídas de vidro, tubos de polietileno, acrílico ou até aço inox, dependendo da sua aplicação [Camel, 2003].

SPE pode ser realizada manualmente inserindo-se o material da fase sólida em seringas, de modo a se obter um preenchimento eficaz das colunas sem espaços vazios. As soluções são então aspiradas ou inseridas na seringa, de modo a passarem homogeneamente pela fase sólida. As etapas de retenção e eluição são realizadas por diferenças na constituição ou na concentração das soluções que fluem através da mini-coluna, e compreendem basicamente quatro etapas, como ilustrado na Figura 3: a) condicionamento e lavagem da coluna (passagem de uma solução que prepara a fase sólida para a extração); b) passagem da amostra pela coluna para retenção do analito ou dos interferentes em potencial; c) lavagem da coluna (retirada do excesso de amostra e/ou interferentes matriciais); d) eluição (passagem da solução eluente que retira o analito ou interferentes. Após a etapa de eluição, o ciclo se inicia inserindo-se a solução de recondicionamento, o que torna o material da coluna pronto para ser novamente empregado.



Figura 3. Etapas para extração em fase sólida (manual). As etapas a, b, c, d representam as etapas de condicionamento da coluna, passagem da amostra, lavagem da coluna e eluição do analito, respectivamente.

Limitações na SPE manual estão relacionadas com a ineficiência no preenchimento da coluna, diferenças na vazão e conseqüentemente na pressão exercida durante a eluição ou retenção, grande volume usado na lavagem, dentre outras. Cartuchos disponíveis comercilmente podem ainda ser usados, porém estes apresentam um tempo de vida útil relativamente baixo [Camel, 2003].

Com a automação da química analítica e conseqüentemente a mecanização das etapas do processo analítico, muitos sistemas foram desenvolvidos objetivando simplicidade e rapidez nas análises químicas. Um dos principais sistemas automatizados desenvolvidos para a melhoria e simplificação

das análises químicas foi o sistema de análises por injeção em fluxo [Ruzicka; Hansen, 1975]. Neste sistema, as soluções reagentes são conduzidas no interior de tubos de pequeno diâmetro interno e posteriormente misturadas à amostra no decorrer de um percurso analítico sendo, o produto resultante da reação, monitorado em um detector. Este sistema é simples, eficiente e aplicável a muitos detectores. O sistema de análises em fluxo se desenvolveu a partir da necessidade de um maior gerenciamento das etapas analíticas e complexidade das metodologias, gerando o sistema de análises por injeção següencial [Ruzicka; Marshall, 1990] e o sistema explorando multi-comutação [Reis et al., 1994]. Estes sistemas permitiram, por meio de componentes comutadores, uma maior flexibilidade no direcionamento das soluções envolvidas (reagentes e amostra), e uma maior versatilidade nos módulos de análises. Assim, procedimentos envolvendo o preparo de amostra, o desenvolvimento de reações químicas e a detecção do analito puderam ser conduzidos em um único sistema de análises em fluxo. Diversas estratégias de preparo de amostra [Fang, 1999; Arruda, 2007] e técnicas de detecção [Wang; Hansen, 2005] tem sido exploradas, resultando em sistemas simples e rápidos, o que tornou estes sistemas excelentes ferramentas analíticas nos dias atuais.

A extração em fase sólida tem sido amplamente explorada nos sistema de análises em fluxo [Zagatto; Dias, 2006] implementando-se mini-colunas empacotadas com materiais sólidos nos módulos de análise. Esta estratégia tem sido considerada primordial quando há a necessidade de um tratamento prévio da amostra antes da detecção, como filtração, concentração do(s) analito(s) ou separação de interferentes. SPE se tornou mais rápida, mais simples e eficiente, já que todas as condições são otimizadas e reprodutíveis. As mesmas etapas

envolvidas na SPE manual são realizadas na SPE em linha; entretanto, a minicoluna possui dimensões menores, o que resulta em menor massa de fase sólida. A eficiência da SPE em linha é dependente da vazão e da constituição das soluções envolvidas, da geometria da mini-coluna e, principalmente, do empacotamento da fase sólida. Limitações como variações na pressão hidrodinâmica da coluna e do sistema, caminhos preferenciais do fluxo, efeitos de expansão das partículas na coluna, dentre outras, podem ser ocasionadas pela falta de eficácia na etapa de preenchimento, ou mesmo de operação da minicoluna [Zagatto; Dias, 2006].

A composição da amostra e, principalmente, do material sólido empregado como extrator se constituem no principal fator de eficiência em SPE. Os materiais mais empregados em colunas empacotadas para SPE em linha são as resinas poliméricas de troca-iônica [Schieffer; Wheeler; Cimino, 1984] e cartuchos C-18 de sílica [Mottaleb; Abedin; Islam, 2003], mas alternativas úteis como as espumas de poliuretano [de Jesus et al.; 1998; Lemos et al., 2005], filtros de cigarro [Yan; Li; Jiang, 2003], discos extratores [Cerda; Estela,2005], fibras ou tiras de PTFE [Zachariadis et al.,2002; Wang et al,2004], fulereno (C-60) [Silva et al.,1998], casca de arroz [Tarley; Ferreira; Arruda, 2004] tem sido propostas. Novos materiais têm sido estudados e aplicados, sempre objetivando uma elevada eficiência na retenção dos compostos de interesse [Liska, 2000; Camel, 2003; Poole, 2003].

A eficiência na retenção de um analito em fase sólida envolve processos físico-químicos, como a troca de cátions ou ânions em coluna de troca iônica, adsorção de metais por reagentes complexantes específicos impregnados no material sólido, sorção de espécies químicas em um adsorvente sólido, etc.

O desenvolvimento de técnicas de separação/ concentração em sistemas de análises em fluxo é uma extensão lógica que complementa o advento dos sistemas de análises por injeção em fluxo [Fang, 1993]. Os métodos de separação/ concentração nestes sistemas exibem algumas características favoráveis quando comparados aos métodos manuais. Em geral eles apresentam uma maior eficiência no processamento das amostras e, consequentemente, menor tempo operacional, menor consumo de amostra e reagente, maior reprodutibilidade analítica, menor possibilidade de contaminação, possível melhora em seletividade, dentre outras características [Fang, 1993].

Apesar de os sistemas de análises em fluxo já terem sido amplamente empregados em conjunto com técnicas de separação/ concentração sua associação com MIPs é recente.

A exploração de SPE nos analisadores em fluxo faz uso de mini-colunas preenchidas com o material sólido específico para a separação/ concentração do analito. Com relação aos MIPs, o mesmo procedimento pode ser utilizado, preenchendo-se a mini-coluna com o polímero triturado e peneirado com granulometria desejada. Como alternativa para a implementação de MIPs em analisadores em fluxo, pode-se optar, ainda, pela sua exploração como sensores ópticos (do inglês "optotrodo") em mini-colunas ou celas de fluxo que são preenchidas por MIPs e inseridas no sistema de detecção [Henry; Cullen; Piletsky, 2005; Alexander et al., 2006].

As primeiras aplicações de MIP como sensor óptico foram descritas para determinação amperométrica de morfina [Kriz; Mosbach,1995] e aminoácidos [Kriz et al., 1995] empregando moldes impressos em agarose e em fibras ópticas respectivamente. As vantagens observadas no uso de MIPs como sensores

associada à robustez dos sistemas de análises por injeção em fluxo foram enfatizadas nos referidos trabalhos.

Apsesar de o emprego de MIPs empacotados dentro de celas de fluxo como extratores de fase sólida em linha ter sido amplamente relatado, as medidas de transmitância são, no entanto, dificultadas devido a limitações como transparência, uniformidade e estabilidade mecânica das partículas. Neste contexto, detecções piezo-elétricas e/ou fotoquímicas quimio e (e.g. bioluminescente, fluorimétricas) têm sido preferidas. Estas técnicas são mais compatíveis com a acomodação de polímeros impressos dentro das celas de fluxo. Em geral, o reagente é injetado ao invés da amostra devido à instabilidade e rápida decomposição química dos reagentes envolvidos nas reações fotoquímicas.

Um dos primeiros sistemas de análises em fluxo aplicando MIP como sensor óptico em linha foi empregado na determinação fluorimétrica de flavonol em óleo de oliva [Suárez-Rodriguez; Diaz-Garcia, 2000]. Esta substância foi selecionada tanto por sua importância nos alimentos quanto pela sua capacidade de emitir fluorescência (elétrons π do anel aromático). O sistema era bem simples e apresentava apenas uma linha de fluxo. A amostra (150 µL) era inserida em um fluxo transportador constituído pela mistura de hexano/ clorofórmio (70:30 v/v) e conduzida até a cubeta de fluxo (25 µL) empacotada com 20 mg de MIP. Foram realizados experimentos envolvendo variações na polaridade da solução transportadora, avaliações referentes à síntese do polímero e à preparação do sensor, bem como a capacidade de distinção entre outros flavonóides bastante similares ao analito. O "sensor fluorescente" proposto permitiu a obtenção de resultados com boa reprodutibilidade, demonstrando também a viabilidade na

determinação de flavonol em amostras hidrofóbicas sem nenhum tratamento prévio. Limitações quanto a cavidades vazias que não interagiam com o analito e consequentemente não emitiam fluorescência foram também relatadas. Com o objetivo de maximizar o reconhecimento molecular, o mesmo grupo de pesquisa estudou a síntese de um MIPs para determinação de cloranfenicol (um antibiótico de amplo espectro) empregando cinco diferentes monômeros funcionais [Suárez-Rodriguez; Diaz-Garcia, 2001]. Primeiramente os MIPs foram preparados e empregados como fase estacionária em sistema HPLC de maneira a selecionar o MIP com melhor reconhecimento molecular para o analito. Após esta etapa, um sistema de análises em fluxo em linha única foi projetado e conectado a cubeta de fluxo empacotada com o respectivo MIP. Um marcador fluorescente foi adicionado ao fluxo transportador com o objetivo de avaliar a capacidade de saturação dos sítios de ligação. A vazão do sistema se mostrou como um importante parâmetro no reconhecimento molecular, uma vez que altas vazões prejudicavam a eficiência de interação entre o analito e os sítios de ligação e vazões baixas comprometiam a freqüência analítica. Em virtude disto, 0,25 mL min⁻¹ foi selecionado resultando em uma fregüência analítica de seis amostras por hora. Para se evitar uma excessiva pressão hidrodinâmica na cubeta de fluxo, a bomba peristáltica foi colocada depois do sistema de detecção de maneira a aspirar as soluções.

Grande parte dos trabalhos envolvendo MIPs como "sensores ópticos" em linha empregam detecção quimioluminométrica. Estudos iniciais sobre a preparação de polímeros com propriedades quimioluminescentes foram conduzidos por Lin e Yamada [Lin; Yamada, 2000] para determinação de dansil-Lfenilalanina. O método explorava a reação de decomposição do peroximonosulfato de potássio (KHSO₅) em presença de Co²⁺ e dos compostos dansil e pireno. Um sistema de análises em fluxo foi projetado para a consecução da reação. Neste, um volume fixo de amostra (100 µL) era inserido em uma mini-coluna localizada em frente a um tubo fotomultiplicador. Após a passagem da amostra pela coluna, um fluxo de água era empregado para retirar o excesso de amostra do polímero. Uma mistura contendo KHSO₅/ CoSO₄ passava então pela mini-coluna, onde reagia com a fenilalanina, previamente aderida, gerando a emissão quimioluminescente. A coluna era novamente condicionada deixando as cavidades poliméricas disponíveis para a próxima amostra. Um aspecto decisivo para o bom desempenho do método foi a otimização do tempo de limpeza da coluna. Os autores observaram que, quando o tempo de limpeza era longo, perdas do analito eram notadas. No entanto, a duração da etapa de limpeza da coluna deveria ser suficiente para a retirada dos possíveis interferentes que também se aderiam ao polímero. Um intervalo de tempo de 4 minutos foi então fixado.

Um MIP foi proposto ainda por Lin e Yamada [Lin; Yamada, 2001] visando avaliar a habilidade de reconhecimento da 1,10-fenantrolina e sua atividade catalítica. A reação tinha início com a formação do íon radical superóxido pela decomposição do peróxido de hidrogênio. Este radical reagia com 1,10fenantrolina emitindo um sinal quimioluminescente. No sistema de análises em fluxo, um MIP formado pelo complexo ternário entre 4-vinilpiridina - Cu(II)- 1,10fenantrolina na proporção de 2:1:1 (mol /mol /mol) foi empacotado dentro de uma mini-coluna localizada ao lado de uma válvula fotomultiplicadora. Estudos acerca do reconhecimento molecular e da decomposição da molécula molde foram realizados. No entanto, limitações foram observadas com relação à síntese do MIP com reagentes quimioluminescentes, bem como a decomposição incompleta da molécula molde impressa no polímero e a necessidade de sucessivas e elaboradas etapas de limpezas. Em função destas desvantagens, sistemas alternativos envolvendo o desenvolvimento de reações químicas previamente ao sensor polimérico foram propostas.

Uma vez que os sistemas de análises por injeção em fluxo apresentam como características uma maior flexibilidade e uma janela de tempo reprodutível, as reações podem ocorrer antes do "sensor" polimérico (MIP-sensor). Isto foi demonstrado na determinação quimioluminométrica de epinefrina um importante transmissor neural [Du; Shen; Lu, 2003]. Neste, 50,0 mg do MIP de epinefrina foi empacotado em uma mini-coluna (4,0 mm d.i. x 5 cm comprimento), conectada ao sistema de análises por injeção em fluxo. Inicialmente a amostra era inserida continuamente para retenção do analito no MIP, depois a bomba peristáltica era desligada e, através do acionamento de uma segunda bomba peristáltica, um fluxo de água passava pela mini-coluna para remoção da amostra residual não ligada. Uma solução composta por luminol e hexacianoferrato (II) de potássio era imediatamente inserida no percurso analítico e transportada para a mini-coluna onde reagia com a epinefrina já ligada ao polímero. Um sinal guimioluminescente proporcional à concentração do analito ligado era então monitorado. O método foi validado para amostras de soro sangüíneo e apresentou boa seletividade e nenhuma deterioração do polímero impresso durante a detecção. Esta estratégia possibilitou a exploração de diversas reações quimioluminométricas envolvendo MIPs como "sensores ópticos" em linha, demonstradas pela determinação dos fármacos clenbuterol [Zhou et al., 2004], salbutamol [Zhou et al., 2005], norfloxacina [He et. al. 2005], brucina [Liu et al., 2005], indometacin [Nie et al.,

2005], tetraciclina [Xiong et al., 2006a], hidralazina [Xiong et al., 2006b], e isoniazida [Xiong et al., 2007].

Uma nova alternativa para o reconhecimento molecular de anticorpos empregando ELISA foi proposta por Surugiu e colaboradores (2001) empregando MIP imobilizado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) [Surugiu et al., 2001]. Neste, um filme polimérico foi formado em volta de um capilar de vidro o qual foi acoplado em um sistema de análise por injeção em fluxo em frente a um tubo fotomutiplicador. O analito impregnado no MIP reagia com a enzima *Tabacco peroxidase* e luminol gerando um sinal quimioluminescente proporcional ao teor de 2,4-D na amostra. A automação possibilitou o emprego de um maior volume de amostra bem como o monitoramento de várias mini-colunas, acopladas simultânea ou sequencialmente.

Dificuldades no preparo de MIPs em pequenas superfícies e em conseguir um maior reconhecimento molecular são talvez as principais razões do porque MIPs são usualmente colocados fora do detector. Neste sentido, a determinação fluorimétrica indireta de alumínio foi possível pela interação com o reagente Morin o qual foi empregado como molécula molde no preparo de MIP [Al-Kiady; Badía; Díaz-Garcia, 2002]. Um sinal fluorescente foi obtido pela inserção de 500 µL de amostra em um fluxo transportador com vazão de 0,45 mL min⁻¹ o qual passava por uma mini-coluna acoplada no percurso analítico. A vazão foi um importante parâmetro, uma vez que um compromisso entre a aderência do alumínio no polímero e as etapas de eluição e amostragem era almejado. As condições experimentais foram otimizadas visando uma melhor sensibilidade com mínimo tempo de residência. Parâmetros como pH e força iônica influenciaram nas etapas de eluição e ligação do analito no polímero. Para um melhor reconhecimento

molecular, as amostras e as soluções-padrão foram preparadas em acetonitrila. Problemas associados com o índice de refração foram, então, contornados.

A viabilidade do uso de MIP com fosforescência à temperatura ambiente foi demonstrada na determinação de fluoranteno em amostras de água [Sanchez-Barragan et al., 2005]. A impressão de um átomo pesado permitiu a indução de fosforescência à temperatura ambiente através da liberação de oxigênio pelo analito adsorvido nos MIP. Um MIP não-covalente foi preparado empregando tetra-iodo-bisfenol A como um precursor polimérico e fluoranteno foi empregado como molde. As partículas de MIP foram empacotadas dentro de uma cubeta de fluxo onde uma solução de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ou de acetonitrila (solução regeneradora) era inserida em um fluxo transportador (água) por meio do acionamento de duas válvulas de injeção de seis vias. Um procedimento semelhante foi proposto por Salinas-Castillo e colaboradores (2005) para a determinação de fluoranteno [Salinas-Castilho, et al., 2005]. Esta determinação apresentou boa seletividade e baixo limite de detecção sendo facilmente adaptada para a determinação de outros HPAs.

Uma vez que HPAs apresentam um comportamento luminescente muito similar entre si, um sensor óptico seletivo para determinação de benzo(α)pireno (BaP) em amostras de água, usando MIP para o reconhecimento do analito foi desenvolvido [Traviesa-Alvarez et al., 2007]. A detecção foi baseada na intensa emissão fosforescente do analito à temperatura ambiente. Um MIP não covalente foi sintetizado usando BaP como molécula molde. Diferentes compostos de halogenato difenol A foram avaliados como precursores na polimerização, os quais possibilitavam a impressão de um átomo pesado, requerido para indução de fosforescência do analito à temperatura ambiente no MIP. O tamanho das

partículas poliméricas foi avaliado entre 80 e 300 µm e melhores resultados foram obtidos quando partículas entre 200 - 250 µm eram empregadas. Observou-se que, quando partículas de diâmetros reduzidos eram utilizadas, a eficiência de regeneração do polímero para a amostra seguinte era comprometida e um aumento na pressão hidrodinâmica do sistema de análises em fluxo era notado. Melhor seletividade foi alcançada com relação às principais espécies interferentes e o sistema de análises em fluxo forneceu resultados concordantes com os procedimentos manuais. Além disso, MIPs sol-gel para naficilina foram sintetizados e empacotados em celas de fluxo [Guardia; Badía; Díaz-Garcia, 2007]. A estratégia apresentou baixa reatividade para antibióticos similares mesmo em um regime de fluxo constante, com rápida e eficiente interação entre o analito e os sítios de reconhecimento envolvidos. Uma quantidade de naficilina foi adicionada à amostra de leite desnatado e recuperações entre 97 e 106 % foram obtidas, sendo o limite de detecção estimado como 3.3×10^{-5} mol L⁻¹.

Uma vez que uma redução no tempo de análise e um menor consumo de reagentes são características almejadas, sistemas miniaturizados de análise por injeção em fluxo têm sido propostos. Neste contexto, Zang e colaboradores (2005) descreveram o emprego de um sistema de análises em fluxo em um "chip" empregando uma micro-coluna polimérica para determinação de clenbuterol [Zhang et al., 2005] . Para a fabricação do sistema, microcanais foram confeccionados em um "chip" de polimetil metacrilato com auxílio de um feixe de laser. O MIP sintetizado foi acomodado em uma cela de fluxo posicionada em frente a um tubo fotomutiplicador. A reação entre o analito, permanganato de potássio, formaldeído e uma mistura de polifosfato e Tween 20 foi empregada

para avaliação do polímero. Verificou-se que o sensor apresentava alta seletividade e sensibilidade, podendo ser empregado para determinação quantitativa de traços de clenbuteron (ng mL⁻¹) em urina de animais. Nesta mesma linha de pesquisa, He e colaboradores (2006) descreveram a confecção e o emprego de um MIP-sensor miniaturizado para determinação de terbutalina em soro sanguíneo [He et al., 2006a]. A cela do "micro-sensor" foi preenchida com cerca de 2 mg de MIP. Primeiramente, uma solução contendo o analito passava pelo "micro-sensor", de maneira a promover a ligação entre o MIP e a terbutalina. Após esta etapa, o "micro-sensor" era limpo para retirada do analito adsorvido em sítios não específicos. Soluções de luminol e de hexacianoferrato (II) de potássio eram então inseridas no "micro-sensor", onde reagiam com a terbutalina ligada gerando um sinal analítico proporcional à concentração desta na amostra. Parâmetros como vazão, volume de amostra e reagentes, tempo de limpeza bem como o tempo de vida do sensor e a seletividade analítica foram avaliados. O sensor respondeu linearmente na faixa de concentração de 8,0 a 100 ng mL⁻¹, permitindo a obtenção de um limite de detecção de 4,0 ng mL⁻¹ e de uma boa seletividade. Ainda neste contexto, um sistema microfluídico integrado a sensores recobertos com filmes molecularmente impressos foi projetado para determinação de colesterol, testosterona e progesterona [Huang et al., 2006]. Os filmes de MIPs foram sintetizados para cada analito, sendo os sensores alinhados em um microsistema de análises em fluxo visando a determinação seqüencial dos analitos. A técnica de detecção utilizada foi a ressonância plasmônica de superfície (do inglês- surface plasmon resonance - SPR). O sistema empregava válvulas pneumáticas e bombas miniaturizadas para o transporte de uma quantidade precisa de amostra pelos múltiplos microcanais até a região de

detecção contendo os sensores poliméricos. Uma vez que os sinais analíticos em SPR são proporcionais ao número de moléculas aderidas ao MIP, a vazão se afigurou como um importante parâmetro a ser controlado, e esta influenciava na quantidade de moléculas retidas no polímero. O sistema possibilitou a determinação de moléculas com alta sensibilidade, seletividade e com mínimo consumo de amostra quando comparado a SPR .

Com relação ao emprego de MIPs em processos envolvendo sensores piezoelétricos, Ebarvia e colaboradores (2004) propuseram um sistema de análises por injeção em fluxo para determinação de cafeína empregando sensor de cristal de guartzo recoberto com filme polimérico [Ebarvia; Binag; Sevilla III, 2004]. O sensor foi fabricado com uma mistura de MIP (previamente preparado e macerado), cloreto de polivinil (PVC) e tetrahidrofurano. Uma pequena alíquota desta mistura (10 µL) foi gotejada no centro do eletrodo e espalhada para a formação de um filme. No sistema, a amostra aspirada em linha única passava pelo sensor onde o analito se ligava às cavidades tridimensionais do MIP causando mudanças na freqüência ressonante do cristal, proporcional à concentração de cafeína na amostra. Para obter uma maior estabilidade do sensor, e consequentemente, melhores resultados, a estratégia de parada da amostra [Ruzika; Hansen 1988] foi empregada devido à baixa cinética de difusão e de ligação da cafeína no MIP. Dez minutos foram suficientes para estabilidade da freqüência o que resulto em uma boa precisão (d.p.r = 17 %, n = 3). A sensibilidade do método foi de aproximadamente 24 Hz/ In (mg mL⁻¹) sendo o limite de detecção estimado como 3,76 x 10⁻¹¹ mg mL⁻¹. Interferentes em potencial não foram observados, o que demonstra que o MIP foi altamente seletivo para cafeína, porém o sistema não foi empregado em análises de

amostras reais. Subseqüentemente [Ebarvia; Binag; Sevila II, 2005], os autores descreveram um procedimento de preparo do MIP e do cristal de guartzo semelhante ao anteriormente descrito, porém com algumas alterações na composição dos reagentes empregados na formação do filme polimérico. Ester policianoacrilato foi empregado no lugar de PVC anteriormente empregado. As medidas foram feitas utilizando a estratégia de parada da amostra. Quanto ao desempenho do sensor, observou-se que este era afetado por parâmetros como: natureza do agente imobilizante, espessura do filme e pH. O método, no entanto, apresentou uma sensibilidade de 53 Hz/ln (mg mL⁻¹) e um limite de deteccão maior (5,9 x 10⁻¹¹ mg mL⁻¹) que o anteriormente relatado, um melhor desempenho e uma ampla faixa de aplicação (1,0 x 10⁻⁹ - 1,0 mg mL⁻¹) bem como uma boa precisão (d.p.r = 9 %, n = 3). Ainda neste contexto, os autores propuseram a formação de um sensor recoberto por um filme polimérico preparado pela eletrodeposição galvanostática de polipirrol (um polímero condutor) em uma solução tamponada contendo cafeína à temperatura ambiente [Ebarvia; Cabanilla; Sevilla, 2005]. A polimerização eletroquímica foi conduzida empregando-se um eletrodo de ouro acoplado a um cristal de quartzo(anodo) e a uma barra de carbono (catodo). Após a polimerização, a cafeína empregada como molde era removida da matriz polimérica por sucessivas lavagens com água. O sensor, no entanto, apresentou um desempenho pior, relativamente aos anteriormente descritos pelo grupo de pesquisa, tomando-se como base de comparação o aumento do limite de detecção (4,66 x 10⁻⁶ mg mL⁻¹), apesar da maior sensibilidade (255 Hz/ln; mg mL⁻¹) obtida. Ainda interferências ocasionadas por compostos com estruturas análogas à cafeína (teofilina e xantina) foram observadas. O sensor apresentou um tempo de vida relativamente curto tendo seu

desempenho comprometido depois de três mensurações. Cabe ressaltar que o sistema de análises em fluxo era idêntico àqueles descritos para a mesma finalidade.

Amostras de extratos café e folhas de chá foram analisadas por um procedimento similar ao empregado por Ebarvia e colaboradores, utilizando-se um piezo-sensor modificado [Zougagh; Rios; Valcárcel, 2005]. O sistema de análises por injeção em fluxo permitia a separação e a detecção de cafeína e empregava, além do sensor piezelétrico, uma membrana líquida de separação conectada à válvula de injeção. Primeiramente uma solução diluída de ácido sulfúrico era inserida no sistema para o estabelecimento da linha base. Após esta etapa, a válvula mudava de posição e 0,5 mL de amostra eram inseridos e digigidos à membrana onde ocorria a separação da cafeína. Esta era então transportada para o sensor onde o sinal analítico era monitorado. Para avaliação da seletividade do método, compostos com estruturas similares à cafeína (ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico, xantina e teofilina) foram avaliados. Observou-se que as interferências causadas por estas substâncias eram drasticamente reduzidas quando o "MIP-sensor" era empregado. O método apresentou boa seletividade e precisão (d.p.r. = 5%, n = 10) sendo linear na faixa de 10 a 1000 ng mL⁻¹. A freqüência analítica foi de 4 amostras por hora e o limite de detecção, de 5,5 ng mL⁻¹.

Uma das principais limitações dos sensores piezoelétricos envolvendo filmes de MIPs está relacionada à estabilidade e controle da espessura do filme formado. Visando contornar estas limitações, Piacham e colaboradores (2005) propuseram a síntese de um filme ultrafino de MIP diretamente sobre a superfície do eletrodo, e posteriormente seu emprego em sistema de análises por injeção em fluxo [Piacham, et al., 2005]. (S)-propanolol foi utilizado como molde. Antes da polimerização, um foto-iniciador era covalentemente acoplado a uma monocamada auto-organizada de alcanodiol com terminal carboxílico aderido a uma superfície de ouro. A superfície previamente tratada foi então usada para promover uma polimerização impressa empregando uma solução diluída do analito, um monômero funcional e um reagente de ligação cruzada. Com este procedimento, foi possível a obtenção de um filme polimérico com 50 nm de espessura onde detecção seletiva da molécula molde em um sensor piezelétrico podia ser facilmente realizada. Quando o sistema de análises em fluxo foi utilizado, o sensor apresentou um tempo curto de resposta (<1 min) e uma separação quiral do analito em soluções aquosas com concentrações maiores que 0.38 mM. Um procedimento semelhante foi descrito por Wu e Syu (2006) na confecção de um "MIP-sensor" para separação e determinação de bilirrubina [Wu; Syu, 2006]. Um filme polimérico de 150 nm foi sintetizado sobre o eletrodo de ouro empregando foto-irradiação UV no processo de formação do MIP. O "sensor" foi acoplado a um sistema de análises em fluxo, o que possibilitou um menor tempo de análises com baixo consumo de amostra (100 µL) e de reagentes. O MIP podia ser reutilizado devido à facilidade na execução da etapa de recondicionamento. O "sensor" polimérico também apresentou melhor seletividade para o analito de interesse na presença de substâncias com estruturas similares a este. Alternativas de síntese foram desenvolvidas para produção de MIPs com maior seletividade e estabilidade mecânica [Henry; Cullen; Piletsky, 2005].

Preparo de amostras explorando MIP em linha tem sido uma das aplicações mais promissoras relativamente aos sistemas de análises em fluxo. Diferentemente do uso de MIPs como foto ou piezo sensor, os polímeros impressos podem ser explorados como extratores em fase sólida atuando como absorventes para separação/ concentração do analito ou de interferentes em potencial. Nesta conjuntura, as espécies são seletivamente separadas no MIP, e etapas de limpeza, eluição e recondicionamento do polímero são conduzidas.

A simplicidade da exploração simultânea do preparo de amostra e separação / concentração do analito nos sistemas de análises em fluxo permitiu o desenvolvimento de metodologias mais simples relativamente a HPLC.

Neste contexto, um sistema de análises por injeção em fluxo foi desenvolvido para determinação de β -estradiol depois da concentração deste em uma mini-coluna contendo MIP [Bravo; Fernández; Durand, 2005]. Inicialmente, uma alíquota da amostra (500 µL) era inserida na mini-coluna por meio de uma válvula de injeção para retenção do analito no MIP. Em seguida, uma solução eluente (H₂O/acetonitrila 50 % v/v) era empregada para extrair o analito retido. Após esta etapa, a zona de amostra estabelecida era conduzida até o detector, onde um sinal fluorimétrico, proporcional à concentração de β -estradiol, era monitorado. Esta abordagem possibilitou a combinação de uma instrumentação simples e de baixo custo como dos sistemas de análises em fluxo, à alta seletividade dos MIPs e a sensibilidade dos detectores fluorimétricos. O método apresentou menor limite de detecção (1,12 µg L⁻¹) e uma maior freqüência analítica (10 amostras h⁻¹) quando comparado às técnicas cromatográficas.

Um sistema similar foi proposto para separação e quantificação fluorimétrica de carbaril em águas de rio [Sánchez- Barragán et al., 2007]. Duas etapas de eluição foram empregadas para aumentar a seletividade, e a estratégia abriu novas possibilidades em relação a outros compostos fluorescentes. A regeneração do polímero para subseqüentes injeções da amostra foi facilitada

pelo sistema de análises em fluxo e o MIP empregado apresentou boa estabilidade por mais de 4 meses. Detectores eletroquímicos foram também utilizados para determinação de carbaril empregando sistemas de análise por injeção em fluxo [Hantash et al., 2007]. Estratégias de separação / concentração foram realizadas com microesferas de MIP empacotadas em uma mini-coluna, a qual era inserida entre a válvula de injeção e o detector potenciométrico, um eletrodo de pH. Depois do reconhecimento molecular, carbaril era eluído e mudanças nos valores de pH, ocasionados pela desprotonação do carbaril em meio alcalino foram mensuradas. O método foi aplicado a amostras de plasma sanguíneo de ratos e os resultados foram concordantes com aqueles explorando a metodologia empregada pelo USA Food and Drung Administration (FDA) [US FDA, 2001]

O sistema de análises em fluxo torna-se particularmente atrativo quando o desenvolvimento de uma reação química envolvendo a retenção do analito no MIP é requerida. Este procedimento é usualmente empregado em quimioluminescência, onde o analito pode ser detectado durante ou após a etapa de eluição e a determinação de metformina [He et al., 2006] foi empregada para ilustrar este propósito. Um sistema versátil foi proposto para consecução das etapas de introdução da amostra, extração/ concentração de metformina e eluição com uma mistura de reagentes. A solução eluente era composta por espécies oxidantes (polifosfato cúprico/ peróxido de hidrogênio) que reagiam com o analito adsorvido no MIP. Os radicais hidroxíla formados durante a decomposição do analito reagiam então com Rodamina B gerando um sinal quimioluminescente. O sistema proposto se afigurou como uma excelente alternativa para análises de rotina sendo aplicado a amostras de soro sanguíneo.

Uma válvula de injeção de oito vias foi utilizada para acomodar uma minicoluna empacotada com MIP, na alca de amostragem, para separação em linha de tetraciclina [Xiong et al., 2006a]. Neste sistema, após a etapa de amostragem, uma solução transportadora (acetonitrila / HNO₃, 4:1 v/v) era empregada para eluição da tetraciclina, a qual reagia posteriormente com Ce(IV) e Rodamina B gerando um sinal quimioluminescente. Efeitos de interferência foram observados na presença de oxitetraciclina, uma substância com estrutura análoga à tetraciclina, os quais foram minimizados empregando-se uma eluição intermediária com 3% (v/v) de ácido acético. Boas porcentagens de recuperação (97 - 107%) foram obtidas em relação a amostras de peixe. Um sistema similar foi empregado na determinação de pazufloxacino em urina humana [Yang et al., 2007]. MIP foi empacotado em um tubo de vidro. Depois da eluição, pazufloxacino reagia com Ce(IV) e com sulfito de sódio em uma cubeta de fluxo resultando em um intenso sinal quimioluminescente. Substâncias similares encontradas na urina não interferiram na reação, demonstrando que o MIP pode ser empregado como um extrator seletivo para este analito.

Um sistema de análises em fluxo explorando injetor-comutador para determinação amperométrica de cloroguaiacol em águas naturais foi proposto por Tarley e colaboradores em 2006 [Tarley; Segatelli; Kubota, 2006]. O polímero impresso com este composto foi inserido em uma das vias do injetor-comutador e após a etapa de concentração, o injetor era comutado e um volume fixo da solução eluente era transportado para a mini-coluna digirindo o analito em direção ao detector. Os principais parâmetros envolvidos foram otimizados aplicando fatoriais fracionários e planejamento Doehlert. O sistema apresentaou um fator de concentração de 110,1. A etapa de limpeza foi limitante para a freqüência de

amostragem, e os resultados demonstraram simplicidade, rapidez, seletividade e sensibilidade da metodologia proposta.

Reacões espectrofotométricas pouco seletivas podem ser aplicadas quando MIPs promovem seletividade ao método. Com isto, procedimentos mais simples e mais baratos podem ser projetados, como o sistema de análises em fluxo para a determinação de catecol explorando uma reação não específica como a redução do permanganato de potássio [Figueiredo et al., 2007]. Válvulas solenóide de três vias foram usadas para injeção da amostra e dos reagentes possibilitando rapidez e completo controle de todas as etapas analíticas. A separação do analito foi realizada através do acoplamento de uma coluna contendo MIP-catecol ao sistema de análises em fluxo. O sistema compreendia sete válvulas solenóide que gerenciavam a inserção de amostra no MIP, as etapas de limpeza e eluição do analito e o desenvolvimento reacional. Uma solução 0.01% (m/v) de permanganato de potássio foi empregada como reagente sendo o Mn (VII) reduzido a Mn (II) pelo catecol. A seletividade foi avaliada relativamente a compostos similares ao catecol, e apenas 4-cloro-3-metilfenol apresentou interferência se ligando também aos sítios do MIP. Limitações quanto à complexidade da matriz (coloração) foram superadas com a inserção de uma segunda coluna contendo C-18 juntamente com um NIP sintetizado com ácido metacrílico. Parâmetros tais como as vazões de extração e eluição e comprimento da bobina reacional foram otimizados bem como a concentração dos reagentes envolvidos. O método foi comparado com HPLC e diferenças significativas ao nível de 95% não foram encontradas. Boas figuras de mérito foram verificadas, mostrando que uma reação química não específica pode ser empregada em adição com específicos extratores sólidos. Estratégias mais simples envolvendo

MIPs para limpeza da amostra ou concentração do analito de interesse foram relatadas para procedimentos em linha com detecção voltamétrica de pirimicarbe em águas [Mena et al., 2002] e de cloranfenicol e sulfametazina em leite [Mena et al., 2003; Prada et al., 2005].

Um MIP foi desenvolvido empregando ferroprotoporfirina IX (Hemin) e ácido metacrílico como monômeros funcionais e 4-aminofenol como molécula molde [Santos et al., 2007]. O Hemin localizado nos sítios de ligação das cavidades poliméricas catalisava a reação de oxidação de 4-aminofenol por peróxido de hidrogênio. Cerca de 35 mg do polímero foram empacotados em uma mini-coluna onde os sítios de ligação eram ativados passando-se uma solução de peróxido de hidrogênio que oxidava Fe³⁺ do Hemin para Fe⁴⁺. As amostras eram injetadas em um fluxo transportador o qual confluía com uma solução de H₂O₂. Esta mistura passava então pelo MIP onde 4-aminofenol sofria oxidação ativando, assim os sítios de ligação do polímero, resultando em um produto monitorado amperometricamente. Amostras de águas de rio foram processadas e boa seletividade foi obtida em relação a outras espécies interferentes. Recuperações entre 96 e 111% foram verificadas. Um importante fator foi a área superficial do MIP e sua porosidade, que foram consideradas mais relevantes do que a uniformidade e empacotamento das partículas. Pode-se inferir que a natureza irregular das partículas de MIP torna-se menos relevante quando o polímero tem uma grande área superficial.

Finalmente, é importante enfatizar que o número de aplicações envolvendo MIP como extrator em fase sólida em sistemas de análises em fluxo ainda é escasso. Devido à limitação em seletividade causada pela retenção preferencial de substâncias interferentes com estruturas químicas e/ ou grupos funcionais similares aos do analito, estudos aprofundados com respeito à síntese do polímero e a formação dos sítios de ligação devem ser conduzidos, visando a obtenção de separações mais específicas para espécies de interesse, especialmente em relação a detectores menos seletivos.

Menor custo, portabilidade, simplicidade, rapidez na análise, baixo consumo de reagentes e amostra dentre outros, são características atrativas apresentadas pelos sistemas de análises em fluxo, o que fazem destes sistemas uma importante alternativa quando comparado aos tradicionais métodos de separação em fase sólida muitas vezes empregada.

2.4. Aplicações analíticas

2.4.1. Catecol

Catecol (1,2- dihidroxibenzeno) e seus derivados são polifenois naturais que ocorrem amplamente em frutas, vegetais, chá verde, tabaco e em alguns medicamentos como anti-sépticos. O catecol, também conhecido como pirocatecol, é um benzenodiol (fórmula química, C₆H₆O₂; Figura 4). Apresenta como características físico-químicas: coloração branca, com peso molecular de 110.1 g/mol, pontos de fusão e de ebulição de 105 °C e de 245.5 °C ,respectivamente, solubilidade em água de 43 g/100 mL. Os compostos pertecentes a família do catecol desempenham funções antioxidantes, antiviróticas, ajudam no florescimento de plantas e também afetam algumas atividades enzimáticas. Os derivados de catecol podem afetar o sabor de chás e tabacos, e a qualidade destes produtos pode ser melhorada alterando-se a concentração desses compostos fenólicos [Sun et al., 2000]. O catecol é ainda empregado na indústria fotográfica, na produção de borracha, de tintas especiais,

de antioxidantes para borrachas e óleos lubrificantes, em tingimento, em formulações farmacêuticas, dentre outras [Clayton; Clayton, 1981 apud Eškinja; Grabarić; Grabarić, 1995]¹².

Catecol é facilmente absorvido pelo trato gastrintestinal causando vaso constrição, degeneração dos tubos renais, podendo ainda acarretar uma elevação na pressão sanguínea, uma diminuição na freqüência de pulsação e um aumento na concentração de açúcar no sangue podendo ainda aumentar as chances de ocorrência de um câncer ou de doenças neuro degenerativas [Greyson, 1981 apud Eškinja; Grabarić; Grabarić, 1994]13. Devido à sua toxicidade, seu monitoramento é de extrema importância, uma vez que ele pode causar sérios efeitos em organismos aquáticos, além de causar alterações mutagênicas e carcinogênicas em seres humanos [Jagetia, Aruna, 1997].



Figura 4: Estrutura molecular do catecol.

Um extrator polimérico baseado na tecnologia de impressão molecular foi sintetizado e aplicado na extração seletiva de catecol em amostras de água com subseqüente determinação por voltametria de pulso diferencial (do inglês - "differential pulse voltammetry" - DPV) [Tarley; Kubota, 2005]. Um polímero não-covalente foi preparado pelo processo de polimerização em "bulk" usando catecol

¹² CLAYTON, G. D.; CLAYTON, F. E. (Ed.) Patty's industrial hygiene and toxicology. New York: Wiley, 1981, vol 2.A

¹³ GREYSON, M. (Ed) Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemial Technology. . New York:Wiley,1981, v. 13.

e 4 - vinilpiridina como molécula molde e monômero funcional, respectivamente. O efeito das vazões e de variáveis químicas associadas ao processo de SPE foram investigadas e otimizadas através de fatorial fracionário bem como palnejamento Doehlert. O estudo da seletividade foi realizado, empregando-se soluções-padrão mistas contendo catecol e outros compostos com estruturas guímicas similares a este (4-cloro-2-metoxifenol, 4-aminofenol, 2-cresol, 2-metoxifenol e 4-cloro-2metoxifenol). Realizou-se ainda um estudo definição da melhor solução de limpeza a ser empregada e, para isto, metanol, tetrahidrofurano, acetonitrila, diclorometano e clorofórmio foram avaliados, sendo este último selecionado. Recuperações maiores que 95% foram obtidas na extração de catecol em presença de compostos fenólicos com estruturas similares, sendo a metodologia aplicada na determinação de catecol em efluentes de indústrias de papel e em águas naturais. Posteriormente, um sistema de análises em fluxo visando a determinação amperométrica de cloroguaiacol (composto derivado do catecol) em águas naturais empregando MIP foi proposto por este mesmo grupo de pesquisa [Tarley; Segatelli; Kubota, 2006] (ver item 2.3.2).

Ainda neste contexto, a síntese e o emprego de um MIP para extração em fase sólida de catecol visando sua determinação espectrofotométrica em amostras de bebidas empregando sistema de análises em fluxo foi proposta por Figueiredo e colaboradores [Figueiredo et al., 2007] conforme descrito no item 2.3.2.

2.4.2. Ácido ascórbico

Ácido ascórbico (AA) comumente chamado de vitamina C é uma substância solúvel em água composta pela mistura de dois enantiômeros, a saber, L e D-AA, que participa de numerosos eventos biológicos e bioquímicos tais como transporte de elétrons, hidroxilações e catabolismo oxidativo de aminoácidos aromáticos [Yebra-Biurrun, 2000]. A sua principal função é a hidroxilação do colágeno, a proteína fibrilar que dá resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. Além disso, é um poderoso antioxidante, sendo usado para transformar radicais livres de oxigênio em formas inertes. É também usado na síntese de algumas moléculas que servem como hormônios ou neurotransmissores e auxilia na prevenção do escorbuto, uma doença que tem como primeiros sintomas hemorragias nas gengivas, inchaço, dores nas articulações, feridas que não cicatrizam e pouca segurança na fixação dos dentes e que é provocada por carências graves de vitamina C [Wikipedia, 2007].

AA se encontra presente em uma série de alimentos (principalmente em vegetais e frutas) na forma de L-AA (Figura 5), porém apresenta pouca estabilidade química tendo sua atividade diminuída ou até mesmo perdida nos processos de armazenamento, preparo e cozimento de alimentos. A vitamina C é ainda altamente sensível a luz, temperatura, calor, sal, pH, íons metálicos, oxigênio, enzimas, dentre outros sendo que sua rápida degradação resulta em uma limitação para uma eficiente determinação quantitativa de L e D-ácido ascórbico por métodos convencionais de análises [Liao et al., 2001].

Acido eritórbico (ácido isoascórbico ou D-AA, Figura 5) é um estereoisômero do L-AA que difere deste somente na posição relativa do hidrogênio e das hidroxilas no quinto átomo de carbono da molécula. Devido à sua forte propriedade redutora, o ácido eritórbico tem aplicações tecnológicas similares ao L-AA como antioxidante solúvel em água, sendo frequentemente usado como aditivo em alimentos processados [Fidler et al., 2004]. Entretanto ele apresenta apenas 80% da bioatividade da forma L-AA [Liao et al., 2001], sendo

sua atividade antiescorbútica um vigésimo daquela apresentada pelo L-AA [Fidler et al.,2004].



Figura 5. Estruturas moleculares dos enantiômeros do AA.

Ambos os isômeros do AA são frequentemente empregados como suplemento alimentar na indústria de alimentos, bem como antioxidantes. Na indústria farmacêutica e alimentícia, a determinação ou o monitoramento da quantidade de AA total é particularmente importante, sendo que o desenvolvimento e o emprego de um método simples, rápido, seletivo e automático para análises de rotina são altamente necessários [Zenki; Tanishita; Yokoyama, 2004]. Neste sentido, algumas técnicas analíticas têm sido propostas para esta determinação em diferentes matrizes e em diferentes quantidades. Métodos convencionais podem processar um número limitado de amostras por causa do tempo requerido nas etapas de extração, reação e análise, como é o caso do método padrão da AOAC [AOAC, 1995] e o método descrito pela Farmacopéia Britânica [British Pharmacopeia, 1988]. Outros métodos ainda apresentam limitações quanto ao preparo de amostra e à sensibilidade analítica [Yebra-Biurrun, 2000]. Neste sentido, os sistemas de análises por injeção em fluxo se afiguram como uma excelente ferramenta analítica para minimizar os problemas relacionados aos métodos manuais de análise acima mencionados. A literatura aponta diversos procedimentos de análises em fluxo para determinação
de AA [Yebra-Biurrun, 2000], porém, nenhum deles permite a separação enantiomérica de AA. Neste contexto, o emprego de MIPs se apresenta como uma estratégia analítica com grandes potencialidades para separação e quantificação dos estereoisômeros do AA uma vez que, até o hoje, nenhum trabalho foi relatado com respeito ao uso de MIP para separação enantiomérica e determinação de AA.

2.4.3. Atrazina

A agricultura utiliza diversos compostos químicos que atuam como pesticidas. A atrazina, nome comum do 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-striazina (fórmula química, $C_8H_{14}CIN_5$; Figura 6) é um composto sintético, registrado em 1958 pela empresa CIBA-GEIGY. Ela é um herbicida da família das striazinas, na qual se incluem os compostos que apresentam, na sua estrutura química, um anel aromático hexamérico, simétrico, com três átomos de carbono e três átomos de nitrogênio em posições alternadas. Apresenta como características físico-químicas o fato de ser um sólido branco com ponto de ebulição entre 171-174 °C, solubilidade em água igual a 33 mg L⁻¹ (22°C; pH7) e pressão de vapor de 0,039 mPa (25°C). È encontrada comercialmente com seguintes nomes; Atrazina Nortox 500SC, Atrazina 500 Coyote, Gesaprim, Herbitrin 500 BR, Posmil, Primoleo, Proof, Siptran 500 SC, Primaiz, Primestra, Extrazin, Herbimix, Primatop e Triamex. Este herbicida está ainda classificado como um agente tóxico, um desregulador hormonal [Friedmann, 2002] e um agente carcinogênico da classe C, na qual estão incluídos compostos potencialmente cancerígenos para o homem [Biradar; Rayburn, 1995].

Em anos recentes as triazinas têm sido amplamente empregadas para controle de ervas daninhas em várias culturas, mas devido aos seus resíduos persistentes, as triazinas podem permanecer nestas culturas, resultando em contaminações ambientais, o que pode ser prejudicial à saúde humana. Isto levou alguns paises a restringirem o uso destes compostos e a estabeleceram limites máximos para a sua ocorrência em águas [Cacho et al.,2003].

A atrazina é um herbicida seletivo utilizado no controle pré e pósemergência de plantas infestantes de diversas culturas agrícolas, nomeadamente milho, sorgo e cana de açúcar [Anvisa, 2008] e, à semelhança do que se verifica para outras s-triazinas, atua por inibição da fotossíntese, em particular ao nível do fotossistema II, conduzindo ao bloqueio do transporte eletrônico. As plantas sensíveis à atrazina sofrem clorose (amarelecimento das folhas) oque conduz à necrose dos tecidos. Nas espécies tolerantes à atrazina, como é o caso do milho, o herbicida é eficientemente metabolizado a formas não tóxicas [Prade; Huber; Bieseler, 1998]. O seu uso intensivo e sua mobilidade nos solos têm contribuído para que este seja um dos pesticidas mais frequentemente detectados em águas de superfície e subterrâneas, quer na Europa [van Maanen et al., 2001; Cerejeira et al., 2003], quer nos Estados Unidos [Boyd, 2000]. No Brasil, a utilização deste herbicida tem sido muito acentuado, principalmente devido às extensas culturas de cana-de-açúcar [Javaroni; Landgraf; Rezende, 1999]. A atrazina pode ser lixiviada pela ação da chuva contaminando rios, lagos, mananciais de água potáveis ou ainda águas subterrâneas, como lençóis freáticos, podendo assim comprometer a água consumida pela população [dos Santos, 2006]. Segundo Dean e colaboradores (1996), da guantidade de atrazina aplicada à lavoura, apenas 1% desta funciona efetivamente no controle de pragas enquanto os 99%

restantes ficam potencialmente disponíveis para mover-se em diferentes compartimentos ambientais tais como o solo, águas residuais e subterrâneas [Dean; Wade; Barnabas, 1996]. Nos EUA e Europa a atrazina tem sido encontrada em níveis superiores ao permitido (3,0 µg L⁻¹ nos EUA e 0,1 µg L⁻¹ na Europa) em águas de lençóis freáticos. No Brasil, o valor máximo permitido para a ocorência de atrazina em águas naturais é de 2,0 µg L⁻¹ segundo critério estabelecido pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357 [Brasil, 2005].



Figura 6. Estrutura molecular do herbicida atrazina.

Normalmente, a determinação de atrazina e de outras triazinas é realizada empregando-se técnicas cromatográficas [Garbellini et al.,2007; Pozzebon; Queiroz; Jardim, 2003; Cacho et al., 2003; Kesari; Gupta, 1998]. No entanto, o grande número de substâncias presentes na amostra, e as baixas concentrações dos analitos de interesse normalmente presentes são fatores limitantes na quantificação das triazinas. A inclusão de etapas prévias para "limpeza" da amostra visando a retirada de componentes matriciais, bem como etapas de concentração do analito normalmente se faz necessária, e uma das estratégias mais utilizadas para esta finalidade é a extração por fase sólida. SPE apresenta algumas vantagens relativamente a outros processos de separação, uma vez que uma grande variedade de extratores e solventes pode ser empregada em diferentes aplicações. Recentemente, MIPs têm sido empregados como extratores sólidos visando aumentar a seletividade dos processos envolvendo SPE, uma vez que estes apresentam resistência química a uma grande variedade de solventes orgânicos bem como uma alta seletividade ao analito de interesse em torno do qual o MIP é sintetizado [Haupt, 2001;Cormack; Elorza, 2004].

Com respeito à determinação de atrazina, um dos primeiro trabalhos empregando o preparo de MIP foi realizado por Muldoon e Stanker [Muldoon; Stanker, 1995]. A síntese foi realizada pela técnica de "bulk em banho térmico a 60 °C por 23h sendo que 1,0 g de atrazina foi empregada na síntese. Alguns parâmetros como a capacidade de reconhecimento da atrazina pelo polímero e a seletividade do mesmo com relação à propazina, ametrina, dietilatrazina e dialquilatrazina foram realizadas. Os autores observaram que a atrazina se ligava mais ao MIP do que no controle (NIP), e que a quantidade de atrazina ligada não aumentava linearmente com a quantidade de polímero empregada na análise. Inferiram ainda que as características de impressão eram altamente reprodutíveis e que os polímeros poderiam ser utilizados para consecução da técnica de ensaio por inibição competitiva de sorbentes molecularmente impressos (do inglês "competitive inhibition molecularly imprinted sobert assay" - cMIA) uma vez que o MIP confeccionado para atrazina apresentou sensibilidade similar ao de outros analitos para os quais cMIAs podiam ser desenvolvidos.

Neste mesmo ano, Matsui e colaboradores [Matsui et al., 1995] descreveram o preparo de um polímero seletivo para atrazina. A síntese foi realizada pela técnica de "bulk" empregando radiação ultravioleta, banho térmico a 0ºC e ácido metacrílico como monômero funcional. As características de ligação do MIP foram realizadas pela análise "Scatchard" a qual demonstrou a presença de dois sítios de ligações no polímero formado. A afinidade induzida e a seletividade foram examinadas cromatograficamente e os autores observaram que o MIP apresentava uma capacidade de retenção 60 vezes maior do que o polímero não impresso (NIP) de mesma composição química. A seletividade foi avaliada comparando-se a capacidade de retenção do MIP frente à atrazina e a outros compostos da família da 1,3,5-triazinas, bem como a outros herbicidas e pesticidas com estruturas não definidas. Foi possível constatar que a atrazina apresentou maior retenção do que os demais compostos da mesma família e a retenção dos demais pesticidas e herbicidas foi menor ou igual a 1% quando comparada à retenção da atrazina. Estudos visando o reconhecimento do mecanismo de formação do polímero envolveram ressonância magnética nuclear (NMR). O polímero ainda se ligou mais fortemente ao analito em presença de solventes orgânicos.

Em 1996, Siemann e colaboradores [Siemann; Andersson; Mosbach, 1996] também confeccionaram um MIP para determinação de atrazina. Eles avaliaram a possível aplicação deste MIP para separação cromatográfica de triazinas bem como para métodos imunológicos. O MIP ainda foi avaliado como adsorvente para remoção seletiva de compostos tóxicos em tratamento de água.

Um MIP foi empregado para extração em fase sólida de atrazina e processos de limpeza para minimização dos efeitos de matriz dos extratos de bife de fígado [Muldoon; Stanker, 1997]. Para tanto um polímero não impresso foi empregado na etapa de limpeza. A capacidade de ligação do polímero em clorofórmio foi de 19 µmol por grama de atrazina. Extratos de bife de fígado purificados e não purificados foram analisados por HPLC com fase reversa e por ELISA. O emprego de MIP como extrator em fase sólida proporcionou uma melhor

precisão e redução no limite de detecção (0,005 mg L⁻¹) para HPLC. As recuperações para a determinação cromatográfica foram de 88,7% quando MIP como separador em fase sólida foi empregado na purificação dos extratos e 60,9% para extratos não purificados (sem emprego de MIP). Para ELISA, as recuperações foram de 92,8% para extratos purificados pelo polímero e 79,6% para extratos não purificados.

Posteriormente, Matsui e colaboradores [Matsui; Kubo; Takeuchi, 1998] realizaram estudos para melhorar as características de retenção e discriminação de atrazina frente a outros compostos [Matsui et al., 1995]. Três diferentes tipos de monômeros funcionais e seis solventes foram avaliados e dentre estes, os MIPs sintetizados com ácido metacrílico (MAA) e solventes menos polares tais como m-xileno e mesitileno apresentaram melhores capacidades de retenção e seletividade.

Sergeyeva e colaboradores [Sergeyeva et al., 1999] empregaram a técnica de preparo de MIP para confeccionar um sensor condutimétrico para atrazina. Para tanto, uma membrana molecularmente impressa com este analito foi sintetizada. Uma vez que estabilidade mecânica e flexibilidade eram características desejáveis na membrana a ser formada, acrilato de oligouretano foi adicionado juntamente com MAA e trietilenoglicol dimetacrilato (TEDMA) na confecção do MIP. A síntese desta membrana se diferenciou das demais sínteses até aqui descritas no que tange à quantidade de atrazina empregada (20 mg) e no tempo de síntese (30 min). Uma cela eletroquímica foi então confeccionada colocando-se a membrana polimérica entre dois eletrodos de platina, sendo a mudança na condutividade elétrica da membrana proporcional à concentração de atrazina. Os autores observaram que a membrana apresentou melhor resposta

analítica para o analito do que para compostos análogos como triazina, simezina e prometrina. O tempo de resposta se mostrou dependente da espessura da membrana, variando entre 6 e 15 min. O efeito da proporção de monômeros funcionais e da concentração do reagente porogênico empregados na síntese do MIP também foram avaliados sendo a melhor proporção de monômeros funcionais a de 85:15 (m/m) TEDMA/acrilato de oligouretano misturada com 30% (v/v) do reagente porogênico (clorofórmio). O sensor preparado com membrana molecularmente impressa possibilitou a determinção de atrazina a concentrações abaixo de 5 nmol L⁻¹ sendo a sensibilidade do mesmo constante durante um período de 6 meses. No ano seguinte, Matsui e colaboradores [Matsui; Fujiwara; Takeuchi, 2000] prepararam um polímero receptor para atrazina empregando moléculas de trietilmelanina (TEM), tri-isopropilmelanina (TPM) e tributilmelanina (TBM) como possíveis moldes no lugar da atrazina. Os MIPs preparados foram comparados ao MIP empregando atrazina como molécula molde. A retenção de atrazina e outros herbicidas da mesma família pelos polímeros molecularmente impressos foi investigada por cromatografia líquida e todos os MIPs sintetizados foram capazes de reter as espécies químicas testadas, porém o mesmo não foi observado nos respectivos NIPs (branco). O polímero no qual TEM foi empregado como molde exibiu o maior fator de retenção para atrazina bem como para os demais herbicidas testados, porém, este fator de retenção foi menor do que o do MIP de atrazina.

Em 2003, Shoji e colaboradores [Shoji; Takeuchi; Kubo, 2003] empregaram o conceito de impressão molecular para confeccionar um sensor químico de atrazina. O MIP bem como seu respectivo NIP foram preparados diretamente sobre a superfície dos eletrodos de ouro de uma balança de cristal de guartzo. Após o preparo, o eletrodo foi lavado com uma mistura de metanol/ ácido acético para retirada do analito e imerso em uma solução de 0,1 mol L⁻¹ LiCl/ dimetilsulfóxido. A redução eletroquímica da atrazina foi realizada em 0.1 mol L⁻¹ KCI sendo os sinais analíticos obtidos por um voltâmetro acoplado a um computador. A seletividade do sensor foi avaliada empregando-se moléculas com estruturas semelhantes à do analito. Os resultados foram concordantes com outros trabalhos empregando MIPs deste analito o que permitiu concluir que o eletrodo modificado com MIP pode ser aplicado para determinação de atrazina na faixa de 1 a 10 µmol L⁻¹. Novos trabalhos envolvendo o preparo de MIPs de atrazina foram realizados pelo grupo de pesquisa de Takeuchi [Takeuchi et al., 2004]. Neste, um polímero molecularmente impresso para atrazina foi preparado usando uma combinação de MAA e 2- sulfoetil metacrilato (SEMA) o qual funcionava como uma enzima sintética que se ligava à atrazina bem como a outros herbicidas da família da 6-clorotriazina convertendo-os em compostos menos tóxicos. A escolha destes reagentes como monômeros funcionais foi baseada em suas habilidades em formar pontes de hidrogênio complementares com a atrazina e por atuarem como uam espécie de ácido catalítico para substituição nucleofílica aromática de atrazina com grupos MeOH. O comportamento das ligações no MIP foi examinado injetando-se herbicidas da família das triazinas e outros pesticidas dentro de uma coluna empacotada com o MIP. Observou-se uma forte afinidade do polímero impresso em se ligar às triazinas sendo os demais pesticidas fracamente retidos, o que comprova a seletividade do polímero preparado.

Dois anos mais tarde, Lavignac e colaboradores [Lavignac; Brain; Allender, 2006] sintetizaram e avaliaram cromatograficamente um MIP de atrazina sob

condições de equilíbrio e de não equilíbrio. Eles observaram que, sob ambas as condições, o MIP apresentou boa seletividade ao analito, verificando-se também, que a afinidade e a seletividade apresentavam uma interdependência com a concentração inicial de atrazina empregada no preparo do polímero. Os autores concluíram que este efeito estava associado à formação de um complexo atrazina-atrazina durante a fase de pré-polimerização e durante o re-ligamento, e que o polímero demonstrou melhoras na afinidade pela atrazina quando as condições do ambiente reacional favoreciam a formação deste complexo. Neste mesmo ano, D'Agostino e colaboradores (2006) descreveram o preparo e o emprego de uma membrana molecularmente impressa, sem macroporos, para determinação potenciométrica de atrazina [D'Agostino et al., 2006]. A membrana foi formada diretamente no terminal de um pequeno tubo de Teflon que era preenchido com uma solução de uma composição constante colocada em contato com um eletrodo de referência interno, como em uma cela potenciométrica clássica empregada em eletrodos seletivos a íons. O íon ativo foi a atrazina protonada positivamente e, para a formação desta espécie, a determinação foi conduzida sob pH menor que 1,8, onde a atrazina era predominantemente monocondições, protonada. Nestas 0 potencial da membrana aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração de atrazina. O tempo de resposta foi menor que 10 segundos, e o sensor pode ser usado por mais do que 2 meses sem comprometimento nas medidas. Neste contexto, Prasad e colaboradores (2007) descreveram o preparo de um "MIP-sensor" visando a determinação potenciométrica de atrazina em águas de subsolo [Prasad et. Al, 2007]. Partículas do polímero de atrazina foram dispersas no plastificante di-n-octil-ftalato e então embutidas em uma matriz de cloreto de polivinila. O "sensor" respondeu à atrazina na faixa de pH entre 2,5 e 3,0 para uma ampla faixa de trabalho (0,0001-10 mmol L⁻¹) com um limite de detecção de 0,1 mg L⁻¹. O sensor apresentou um tempo de resposta relativamente curto (c.a 32 min) e alta seletividade com relação a outras importantes classes de pesticidas e herbicidas.

Uma membrana polimérica específica para atrazina foi obtida pelo método de polimerização *in situ* usando o princípio de interpenetração de redes poliméricas. [Sergeyeva et al., 2007]. Acrilato de oligouretano foi empregado na síntese, de maneira a conferir maior mobilidade à membrana. Após a retirada da atrazina do polímero, os autores observaram a formação de macroporos no mesmo, e de sítios específicos para atrazina na cadeia polimérica. A membrana foi empregada para SPE de triazinas em soluções aquosas e apresentou como característica o fato de poder reter soluções aquosas de atrazina na faixa de 10⁻⁸ a 10⁻⁴ mol L⁻¹. A seletividade foi avaliada em relação a outras triazinas; a membrana mostrou uma maior afinidade para a molécula empregada como molde.

Em relação à determinação de outros compostos pertencentes à família das triazinas, um MIP empregando atrazina como molécula molde foi sintetizado empregando-se polimerização por suspensão. O MIP foi avaliado na determinação de simazina pelo processo clássico de extração por fase sólida [Matsui et al., 1997] sendo o extrato analisado por HPLC. O MIP foi capaz de concentrar simazina cerca de 56 vezes com uma recuperação de 91%. O emprego de MIP para determinação de triazinas tem sido amplamente relatado [Matsui et al., 2007; Takeuchi, Fukuma, Matsui, 1999, Bjarnason, Chimuka, Ramströn, 1999; Ferrer et. Al, 2000; Pogorelova et. al, 2002, Cacho, et al., 2003; Cacho, et al., 2004; Hu et al., 2007; Breton et al., 2007; Jenkins; Yin; Jensen, 2001] porém nestes, diferentes

espécies de triazinas (simazina, prometrina, ametrina, propazina, terbutilazina) são empregadas como molécula na síntese do MIP.

3. MATERIAIS

Os equipamentos, reagentes e acessórios empregados na execução do presente trabalho, foram disponibilizados pelo Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho" do Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

3.1. Reagentes e soluções

Para o desenvolvimento dos diversos procedimentos analíticos descritos neste trabalho, as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água destilada/ desionizada.

3.1.1. Soluções empregadas na determinação de catecol.

* Solução-padrão 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹ de pirocatecol. Preparada diariamente
pela dissolução de 11 mg de pirocatecol em 100 mL de água.

* Soluções-padrão 2,00 - 8,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de pirocatecol. Preparadas diariamente a partir da diluição de uma solução 1,00 x 10⁻³ mol L⁻¹ de pirocatecol em 50 mL de água.

* Soluções-padrão 2,00 - 8,00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de pirocatecol. Preparadas diariamente a partir da diluição de uma solução 1,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de pirocatecol em 50 mL de água.

* Soluções 0,05 e 0,025 % (v/v) H_2O_2 . Preparadas diariamente por diluições sucessivas de H_2O_2 a 30 % (v/v) em 100 mL de água.

* Soluções 1,0 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ Co²⁺. Preparadas a partir de sucessivas diluições de uma solução estoque 1000 mg L⁻¹ Co (como CoSO₄.7H₂O) em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃.

 * Soluções 0,01 e 0,025 mol L⁻¹ de 4-aminofenol. Preparadas diariamente pela dissolução de 218 e 546 mg, respectivamente, de 4-aminofenol em 200 mL de água.

* Soluções 0,1 e 0,001 mol L⁻¹ HNO₃. Preparadas a partir da diluição de 50 mL de uma solução 1,0 mol L⁻¹ HNO₃ e 5,0 mL de uma solução 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ em 500 mL de água.

* Solução 1,0 mol L⁻¹ NaOH. Preparadas misturando-se 132 ml de 2,0 mol
L⁻¹ NaOH e completando-se o volume para 250 ml com água.

Para se avaliar a seletividade dos MIPs de catecol, foram preparadas soluções de espécies químicas potencialmente interferentes (4-cloro-3-metilfenol, 4-aminofenol e 2-cresol), nas concentrações de 6,00 x 10^{-3} ; 6,00 x 10^{-4} e 6,00 x 10^{-5} mol L⁻¹. Soluções mistas nas proporções de 1:1 e 1:10 de catecol (6,00 x 10^{-4} e 6,00 x 10^{-5} mol L⁻¹) com estas espécies químicas foram também preparadas.

3.1.2. Soluções empregadas na determinação de ácido ascórbico.

* Solução 0,125 e 0,06 % (m/v) de 1,10-fenantrolina. Preparada pela dissolução de 0,125 g e 0,06 g de 1,10-fenantrolina em 100 mL de 0,006 mol L $^{-1}$ HCl.

* Soluções 25,0 e 50,0 mg L⁻¹ Fe³⁺. Preparada a partir de sucessivas diluições de uma solução estoque 1000 mg L⁻¹ Fe (como FeCl_{3.} $6H_2O$) em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃.

* Solução-tampão acetato/ácido acético. Preparada misturando-se 100 ml
de acetato de amônio a 0,2 mol L⁻¹ com 100 ml de ácido acético a 0,2 mol L⁻¹.

* Solução-padrão 100,0 mg L⁻¹ de ácido ascórbico levógiro (L-AA).
Preparada diariamente pela dissolução de 10 mg L - AA em 100 mL de água.

* Soluções-padrão 2,50 - 20,00 mg L⁻¹ AA em 30% DMSO. Preparadas diariamente adicionando-se os volumes correspondentes de uma solução de 50,0 mg L⁻¹ AA para o preparo de cada solução-padrão mais 7,5 mL de DMSO e completando-se o volume até 25 mL com água.

Para avaliação da capacidade de separação enantiomérica do MIP foram preparadas soluções-padrão mistas de D-AA e L-AA em dimetilsulfóxido 30% (v/v) nas seguintes concentrações: (2,5: 2,5), (2,5: 5,0), (5,0: 2,5), (10,0: 5,0) e (5,0: 10,0) mg mL⁻¹ D- AA:L-AA.

A seletividade analítica dos MIPs de ácido ascórbico foi avaliada empregando-se soluções contendo alguns dos principais excipientes encontrados nas amostras de suplementos vitamínicos e bebidas, a saber: solução 0,25 % (m/v) de ácido cítrico, solução 0,25% (m/v) de sacarose, solução 0,25% (m/v) de polietilenoglicol e solução 0,025% (m/v) de sorbitol.

3.1.3. Soluções empregadas na determinação de atrazina

* Solução-padrão 100,0 mg L⁻¹ de atrazina (AT). Preparada pela dissolução
de 10 mg AT em 100 mL de acetonitrila.

* Soluções-padrão 2,50 - 10,00 mg L⁻¹ AT. Preparadas a partir da diluição da solução 100,0 mg L⁻¹AT em 25 mL de acetonitrila.

- Acetonitrila
- * Ácido acético glacial
- Metanol
- * Clorofórmio
- Acetato de etila

3.2. Amostras

Para a determinação de catecol, amostras de águas naturais foram coletadas em diferentes locais da cidade ao longo do rio Piracicaba e aremazenadas em frascos de polietileno de 500 mL. Amostras de resíduos provenientes de uma indústria de papel, e do medicamento Parklen[®] contendo nominalmente 250 mg de levodopa e 25 mg carbidopa, (substâncias pertencentes à família do catecol) bem como de extratos de chá verde e de mate foram ainda analisadas.

Os comprimidos empregados para a determinação de catecol foram pesados e uma relação entre a massa total e a massa das substâncias ativas contidas no mesmo foi estabelecida. A massa de comprimido que deveria ser pesada para obtenção da massa desejada foi então calculada. Os comprimidos foram pulverizados em cápsula de porcelana e posteriormente homogeneizados. A massa de interesse foi então pesada e dissolvida em 100 ml de água. A retirada dos excipientes insolúveis contidos foi feita através do processo de filtragem.

Relativamente às amostras de chás, primeiramente os extratos foram obtidos imergindo-se cerca de 7,0 g de erva em 100 mL de água aquecida. Após a extração, uma alíquota de 5 mL do extrato foi diluída em 25 mL de água e a esta solução foram adicionadas 2,0 e 6,0 x 10⁻⁴ catecol para determinação catalítica e 2,0 e 6,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de catecol para a reação envolvendo 4-aminofenol.

Para determinação de L-AA, suplementos vitamínicos de diferentes marcas (Cebion[®], Cewin[®], Ceglen[®], Nogripe[®]) forram adquiridos no comércio local. Inicialmente, os comprimidos foram pesados e uma relação entre a massa total e

a massa de vitamina C contida no mesmo foi estabelecida. A massa de comprimido que deveria ser pesada para obtenção da massa desejada de vitamina C foi então calculada. A seguir, os comprimidos foram pulverizados em cápsula de porcelana e as massas de interesse, anteriormente calculadas, foram pesadas e dissolvidas em 100 ml de água. Para retirada dos excipientes insolúveis contidos em alguns suplementos as soluções foram filtradas.

Amostras de sucos naturais foram também analisadas. Estas foram preparadas extraindo-se o suco de diferentes frutas em recipientes de vidro. Uma alíquota de 10 mL foi transferida para balão volumétrico de 100 mL o qual foi completado com água. Os sucos foram filtrados com uma pequena quantidade de celite para minimização da coloração. Ressalte-se que todas as amostras eram preparadas e analisadas no mesmo dia das determinações.

3.3. Reagentes para síntese dos polímeros impressos

Os reagentes utilizados as sínteses dos MIPs foram: 4-vinilpiridina (monômero funcional), etileno glicol dimetacrilato (reagente ligação cruzada), 2,2' – azobisisobutironitrila (iniciador radicalar), pirocatecol, D-AA e L-AA, atrazina (moléculas molde). Solventes utilizados: acetonitrila, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), clorofórmio e acetato de etila.

3.4. Equipamentos e acessórios

Os sistemas de análises em fluxo eram constituídos por uma bomba peristáltica com rotação variável, de fabricação Ismatec, modelo IPC-08, provida de tubos de bombeamento de Tygon® de diferentes diâmetros internos; um injetor-comutador operado manualmente [Krug, Bergamin, Zagatto,1986] e um espectrofotômetro Femto, modelo 432 equipado com cubeta tubular de 30 µL de

volume interno e 10 mm de passo ótico, o qual era conectado a um registrador potenciométrico Kipp & Zonen, modelo 111. O sistema de análises em fluxo com multicomutação, empregado na determinação de atrazina, era composto de quatro válvulas solenóide de três vias de fabricação da NResearch, modelo 161T031 interligadas a um microcomputador provido de uma interface PCL-711 Advantech sendo as mesmas operadas através de um programa desenvolvido em Quick Basic 4.5. Ainda, um detector espectrofotométrico multicanal de fabricação Ocean Optics, modelo USB2000-UV-VIS foi empregado.

Tubos de Teflon® de 0,8 mm de diâmetro interno foram empregados para confecção de alças de amostragem, bobinas de reação (diâmetro de enrolamento igual a 1,5 cm) e linhas de transmissão.

Foram também empregadas junções e conectores de acrílico bem como materiais e equipamentos de uso rotineiro em laboratórios de Química Analítica, tais como balança analítica, banho termostatizado, capela, sistema desionisador de água, vidrarias, dentro outros.

Para separação das partículas dos MIPs, peneira de aço inox com malha específica de 250 μm foi utilizada.

As mini-colunas empregadas para separação/ concentração em linha de catecol, AA e AT foram preparadas preenchendo-se um tubo de borosilicato de 6,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno com cerca de 75 mg MIP para catecol, 100 mg MIP para AA e 200 mg MIP para AT. Lã de vidro foi colocada nas extremidades das colunas para evitar perdas do material durante as operações dos sistemas.

Ainda uma lâmpada de UV de 366 nm e 20 Watts de potência foi empregada na síntese do MIP de atrazina.

4. MÉTODOS

A seguir, são descritos os procedimentos analíticos empregados para síntese dos polímeros molecularmente impressos, os métodos para determinação de catecol, ácido ascórbico e atrazina bem como os sistemas analíticos utilizados para execução do presente trabalho. Os estudos realizados para otimização das condições dos sistemas analíticos a serem propostos, bem como as reações químicas envolvidas são também descritas neste item.

4.1. Síntese dos polímeros molecularmente impressos

O processo de síntese selecionado para a confecção dos MIPs, empregados no presente trabalho foi por "bulk" [Pérez-Moral; Mayes, 2004] devido à sua simplicidade operacional. Neste processo, ilustrado na Figura 6, todos os reagentes (molécula molde, monômero funcional, solvente, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar) eram inseridos em uma ampola de vidro, os reagentes sólidos eram dissolvidos agitando-se levemente os reagentes líguidos e a seguir, argônio era purgado dentro da solução por 10 min para retirada de oxigênio. A extremidade da ampola era selada com uma tampa para se evitar a entrada do ar e se manter um ambiente de argônio dentro da mesma. A ampola era então inserida em um banho termostatizado contendo silicone líquido ou óleo mineral a uma temperatura de 60 ºC ou exposto à radiação ultravioleta. Após 24 h, a ampola era quebrada e o polímero formado era triturado em almofariz e peneirado (até granulometria desejada) para depois ser inserido na mini-coluna. Em simultâneo, era realizada a síntese do NIP (do inglês "non-imprinted polymer") sem a presença da molécula molde. Este polímero é fundamental para estudos de verificação do reconhecimento molecular, e deve ser feito sempre em simultâneo a um MIP.



Figura 7: Esquema representativo da síntese de MIP por "bulk". Onde, Δt (h) representa duração da síntese e hv ou T representam o tipo de energia aplicada (radiação ultravioleta ou temperatura).

Após o preenchimento da mini-coluna com uma quantidade definida de MIP, a molécula molde era totalmente retirada do polímero passando-se uma solução eluente. Nesta etapa, necessitava-se coletar a solução eluída e monitorar a presença da molécula molde. Com isto, o MIP estava pronto para uso no sistema de análises em fluxo.

4.1.1. Síntese do MIP para determinação de catecol

O MIP empregado na determinação espectrofotométrica de catecol foi preparado e gentilmente cedido por Figueiredo e colaboradores [Figueiredo et al, 2007] sendo a síntese baseada no procedimento descrito por Tarley e Kubota [Tarley; Kubota, 2005].

Para confecção deste MIP de catecol, dissolveram-se 2,0 mmol de catecol em 11,0 mL de acetronitrila dentro de uma ampola de 30 mL; em seguida, adicionaram-se 8,0 mmol de 4-vinilpiridina, 40 mmol de dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) e 1,5 mmol de 2,2' - azobisisobutilnitrila (AIBN). Um fluxo de argônio foi então passado por *ca* 10 mim dentro da ampola, de modo a conferir uma atmosfera isenta de oxigênio. A mistura foi resfriada e a ampola selada. A polimerização foi conduzida a 60 °C em um banho de silicone durante 24 h. Após este período, a ampola foi quebrada e o polímero triturado mecanicamente em um almofariz. Partículas \leq 100 µm foram selecionadas passando-se o polímero pulverizado por peneira de malha específica.

Procedeu-se então à retirada do catecol do polímero sintetizado para obtenção das micro-cavidades. Para tanto, 0,70 g do polímero foram colocados em cartucho, o qual foi submetido à lavagem com uma mistura de metanol/ ácido acético (4:1, v/v) até retirada quantitativa do catecol, confirmada através de medidas amperométricas. O polímero foi então seco a 60 °C e armazenado à temperatura ambiente.

4.1.2. Síntese e caracterização do MIP para determinação de AA

Inicialmente dois MIPs foram sintetizados empregando dimetilsufóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF). Estes solventes foram empregados uma vez que AA se mostrou insolúvel em acetonitrila e em outros solventes testatos. Para tanto, 2,0 mmol de AA foram dissolvidos em 10,0 mL DMF ou DMSO dentro de uma ampola de 80 mL. Em seguida, adicionaram-se 8,0 mmol de 4-vinilpiridina, 40 mmol EGDMA e 1,5 mmol AIBN. Um fluxo de argônio circulava continuamente dentro das ampolas de modo a conferir uma atmosfera isenta de oxigênio. A ampola foi selada após a adição de todos os reagentes e a polimerização foi conduzida a 60 °C em um banho de silicone durante 24 h. Após este período, a ampola foi resfriada e quebrada. Os MIPs foram triturados mecanicamente com um almofariz e as partículas, com a granulometria desejada, foram separadas

através da passagem do polímero pulverizado por peneira de aço inox de malha específica (250 μm).

Após a síntese a caracterização morfológica do MIP e do NIP de L-AA foi realizada. A avaliação da área superficial do MIP e do NIP foi efetuada visando obter informações sobre a porosidade e a geometria dos polímeros. Estes foram submetidos ao um processo de recobrimento à base de carbono e posteriormente analisados em um microscópio eletrônico de varredura de fabricação Jeol, modelo JMS-5600LV.

4.1.3. Síntese e caracterização do MIP para determinação de atrazina

O MIP visando a determinação de atrazina foi sintetizado segundo procedimento descrito por Matsui e colaboradores (1995) [Matsui et al., 1995].

Em uma ampola de vidro de 80 mL, dissolveram-se 360 mg AT em 25,0 mL de clorofórmio. Em seguida, 575 mg de ácido metacrílico, 9,35 g EGDMA e 120 mg AIBN foram adicionados à mistura. Um fluxo de argônio foi então passado por *ca* 10 mim através da ampola de modo a conferir uma atmosfera isenta de oxigênio. A mistura foi resfriada e a ampola selada. A polimerização foi conduzida a 10 °C em um banho de gelo durante 24 h sendo a fonte de radiação uma lâmpada de UV (20 W, 366 nm). Após este período, a ampola foi quebrada. Os MIPs foram triturados mecanicamente em almofariz até obtenção de partículas menores que do que 250 µm obtidas pela passagem do polímero pulverizado por peneira de aço inox.

A caracterização morfológica do MIP e NIP de atrazina foi realizada em procedimento semelhante ao descrito para o MIP de AA (item 4.1.2.)

4.2. Determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo.

A reação para determinação de cobalto proposta por Alexiev e Angelova (1980) [Alexiev; Angelova, 1980] foi empregada para determinação de catecol no presente trabalho. Esta foi escolhida em função da sua simplicidade e alto coeficiente de absorptividade molar do produto formado.

A reação envolve a oxidação de catecol por peróxido de hidrogênio, em meio alcalino, com formação de o-benzoquinona (Figura 8), sendo a reação catalisada por Co²⁺. O composto formado é monitorado a 490 nm.

Com relação à determinação de catecol, os principais parâmetros referentes ao método foram estudados visando sua implementação em um sistema de análises em fluxo. Para isto, foram estudados o dimensionamento físico do sistema, a natureza e concentração dos reagentes e a temperatura do ambiente reacional.



Figura 8. Reação envolvida na determinação de catecol.

O sistema analítico, representado na Figura 9, foi empregado para se investigar as reações químicas envolvidas na determinação de catecol. Neste sistema, a amostra era aspirada preenchendo uma alça de amostragem cujo volume era definido pelo comprimento e diâmetro interno da mesma (100 cm, *ca* 500 μL).



Figura 9. Diagrama de fluxos do sistema inicial para determinação catalítica de catecol. L = alça de amostragem (100 cm $\approx 500 \ \mu$ L); A = amostra (> 6,0 mL min⁻¹); T = solução transportadora (0,001 mol L⁻¹ HNO₃; 4,8 mL min⁻¹); D = detector (490 nm); R₁ = 1,00 mg L⁻¹ Co²⁺ (0,48 mL min⁻¹); R₂ = 1,00 mol L⁻¹ NaOH (0,48 mL min⁻¹); R₃ = 0,05% (v/v) H₂O₂ (0,48 mL min⁻¹); C = descarte; B₁ e B₂ = bobinas de mistura e de reação (50 e 150 cm); IC = injetor-comutador, com especificação da posição alternativa (área hachureada).

Quando a parte central móvel do injetor-comutador era deslocada para a posição alternativa, o volume selecionado de amostra era inserido no fluxo transportador. À medida que a zona de amostra estabelecida se deslocava no percurso analítico, ela sofria um processo contínuo de dispersão (e eventuais diluições) o que permitiu a consecução das etapas inerentes ao método analítico proposto. Esta recebia por confluência os reagentes requeridos e, a seguir, percorria a bobina de reação e passava pelo detector, onde era monitorada espectrofotometricamente. A passagem da amostra processada pelo detector resultava em um sinal analítico transitório registrado sob forma de pico cuja altura era proporcional ao teor de catecol na amostra.

O dimensionamento do sistema da Figura 9 objetivou a maximização da sensibilidade e velocidade analítica, sem que houvessem perdas em

repetibilidade. Considerou-se então o compromisso entre vazões e comprimento da bobina de reação, com a velocidade analítica, com a dispersão das amostras, com o tempo de reação e com a pressão hidrodinâmica do sistema. As vazões dos reagentes confluentes foram fixadas de forma a causarem baixas diluições da amostra nos pontos de confluência, e a do fluxo transportador foi definida de forma a inferir uma velocidade analítica compatível com a reação e não aumentar a pressão interna do sistema, o que poderia dificultar sua operação. O sistema foi dimensionado ainda para prover condições adequadas de mistura e tempo de residência compatível com a cinética da reação.

Visando a obtenção das melhores condições para o desenvolvimento reacional no sistema de análises em fluxo, as condições especificadas por Alexiev [Alexiev, Angelova, 1980], relacionadas a pH reacional, concentração de reagentes e temperatura foram reavaliadas. Parâmetros físicos tais como comprimento da bobina reacional, e vazão das soluções envolvidas foram também estudados.

4.2.1. Influência do pH reacional

Os estudos preliminares para se avaliar a influência do pH no desenvolvimento da reação foram conduzidos no sistema da Figura 9. As variações em pH do meio reacional foram inicialmente obtidas empregando-se soluções tamponantes (R_3) de tetraborato de sódio e $Na_2HPO_4(0,1 \text{ mol } L^{-1})$ previamente ajustadas em pH-metro de maneira a conferir valores de pH na faixa de 9 a 12,5. Duas faixas diferentes de pH foram inicialmente avaliadas. A primeira compreendia soluções de tetraborato de sódio com valores de pH variando entre 9,2 e 11,5. A segunda compreendia soluções de fosfato de sódio com valores de pH na faixa entre 11,5 e 12,5.

Nestes experimentos soluções-padrão de 2,50; 5,00 e 10,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol foram inseridas em triplicata no sistema. Como fluxo transportador, foi empregada uma solução 0,001 mol L⁻¹ HNO₃. A solução processada era coletada em frascos de 20 mL e o seu pH determinado potenciometricamente para verificação dos valores de pH em linha.

4.2.2. Influência da vazão total

Para se avaliar o efeito deste parâmetro no desenvolvimento reacional, variou-se a rotação da bomba peristáltica de maneira a prover vazões totais (soma das vazões individuais dos reagentes envolvidos) entre 2,1 e 8,3 mL min⁻¹.

4.2.3. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

Uma vez que o tempo médio de residência da amostra pode ser modificado em função das dimensões da bobina B₂, a influência do comprimento desta foi estudada variando-se este parâmetro de 25 a 200 cm.

4.2.4. Influência do pH do ambiente reacional e de vazão total

Para avaliação simultânea destes parâmetros, uma solução de 1,0 x10⁻³ mol L⁻¹ de catecol, bem como soluções de 0,1 a 3,0 mol L⁻¹ NaOH foram empregadas. Vazões de 2,1 a 10,4 mL min⁻¹ foram avaliadas para cada solução de NaOH.

4.2.5. Influência das concentrações dos reagentes

Diferentes concentrações de Co^{2+} (0,00; 0,01; 0,10; 1,00 e 10,0 mg L⁻¹) foram avaliadas em R₁. O efeito da variação da concentração de peróxido de

hidrogênio foi também avaliado empregando-se como reagente R_2 soluções 0,00 a 0,10 % (v/v) H_2O_2 .

4.2.6. Influência da temperatura

A temperatura do meio racional foi variada com a finalidade de se verificar a sua influência sobre a sensibilidade do método proposto. Para isso, imergiu-se a bobina reacional B₂ em um banho termostatizado, variando-se a temperatura do mesmo no intervalo de 25 a 45 °C. Após cada ajuste de temperatura, um tempo para estabilização térmica do sistema era requerido (*ca* 5 minutos). Maiores temperaturas não foram estudadas para se evitar a liberação de eventuais bolhas de ar que comprometeriam o monitoramento espectrofotométrico.

4.2.7. Influência do volume de amostra

Para se avaliar a influência do volume da amostra, o comprimento da alça de amostragem foi variado de 25 a 200 cm de maneira a conferir volumes de amostra no intervalo de 125 a 1000 µL.

4.2.8. Seletividade analítica

Para avaliação deste parâmetro as soluções descritas no item 3.1.1 foram empregadas.

4.3. Determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida

Os experimentos foram conduzidos empregando-se o sistema da Figura 10 onde se acoplou uma mini-coluna contendo MIP de catecol em uma das extremidades do injetor-comutador. Neste sistema, um volume de amostra era previamente selecionado por meio de uma alça de amostragem (320 cm, ca 1600 μ L). A comutação do injetor permitia que o volume da amostra selecionado fosse conduzido para o interior da mini-coluna polimérica (CP) por um agente de limpeza (SL) durante um tempo previamente estabelecido de 3 minutos e, após este intervalo tempo, o injetor era comutado e a mini-coluna inserida no fluxo eluente (E). A zona eluída recebia então por confluência os reagentes R₁, R₂ e R₃, sendo posteriormente monitorada espectrofotometricamente a 490 nm. Foram avaliadas as influências de diversos parâmetros tais como a alcalinidade do ambiente reacional, o comprimento da bobina reacional B₂, a concentração dos reagentes envolvidos, o volume de amostra e a capacidade de retenção da coluna.



Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema para determinação catalítica de catecol empregando MIP como extrator em fase sólida. L = alça de amostragem (320 cm \approx 1,6 mL); A = amostra (> 2,0 mL min⁻¹); E = solução transportadora (0,1 mol L⁻¹ HNO₃; 2,5 mL min⁻¹); D = detector (490 nm); R₁ = 0,10 mg L⁻¹ Co²⁺ (0,16 mL min⁻¹); R₂ = 0,025 % (v/v) H₂O₂ (0,16 mL min⁻¹); R₃= 1,0 mol L⁻¹ NaOH (0,23 mL min⁻¹); SL = agente de limpeza (água; 2,0 mL min⁻¹); C = descarte; B₁ e B₂ = bobinas de mistura e de reação (50 e 100 cm); IC = injetor-comutador, com especificação da posição alternativa (área hachureada), CP = mini-coluna de polímero molecularmente impresso (75 mg MIP).

4.3.1. Influência da concentração de NaOH

Para avaliação deste parâmetro três soluções (1,0; 1,5 e 2,0 mol L⁻¹ NaOH) foram empregadas como reagente R₃. Soluções com concentrações menores que 1,0 mol L⁻¹ NaOH apresentaram valores de pH no ambiente reacional relativamente baixos (< 3,0) e não puderam ser empregadas no presente estudo uma vez que a reação tem seu desenvolvimento em ambientes bastante alcalinos (> 11,0).

4.3.2. Influência da natureza do eluente

Para consecução do presente estudo, água e soluções 0,1 mol L⁻¹ HCl, 0,1 mol L⁻¹ HNO₃, 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄, 0,1 mol L⁻¹ HClO₄, 0,1 mol L⁻¹ HOAc e 0,1 mol L⁻¹ 1 agua regia e foram empregadas.

4.3.3. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

O comprimento da bobina reacional foi estudado objetivando-se um melhor ajuste do tempo de residência da amostra no sistema e, para tanto, o comprimento da bobina B₂ (Figura 10) foi variado de 25 a 150 cm.

4.3.4. Influência do volume de amostra

O volume de amostra se apresenta como uma importante variável nos sistemas de análises em fluxo, principalmente quando estes envolvem etapas de concentração/ separação em linha. Através da variação do volume injetado podese obter uma estimativa do funcionamento da coluna no sistema, uma vez que, uma boa eficiência da coluna se dá quando o sinal analítico cresce linearmente com o aumento do volume de amostra. O volume de amostra foi então avaliado e, para tanto, o comprimento da alça de amostragem foi variado de 80 a 320 cm de maneira a conferir volumes de amostra no intervalo de 400 a 1600 μL.

4.3.5. Influência das concentrações dos reagentes

No presente estudo, as concentrações de Co^{2+} e H_2O_2 foram variadas nas faixas de 0,01 a 10,0 mg L⁻¹ Co^{2+} e 0,01 a 0,1 % (v/v) H_2O_2 .

4.3.6. Influência da temperatura

O presente estudo foi conduzido imergindo-se a bobina reacional B₂ em banho de termostatizado de maneira a conferir temperaturas entre 10 e 45 °C.

4.3.7. Influência do pH da amostra

Para avaliação deste parâmetro na retenção de catecol pelo MIP, soluções padrão contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ de catecol foram preparadas de maneira a conferirem valores de pH na faixa de 1,0 a 5,0.

4.3.8. Avaliação da retenção pela coluna

Para avaliação da retenção (R) da coluna polimérica, dez injeções de uma solução contendo 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ catecol foram realizadas. Na etapa de concentração, o fluxo após a coluna era coletado, durante o tempo em que a amostra passava pela coluna de MIP. O volume coletado foi então medido sendo equivalente a 49 mL. Procedeu-se então à determinação de catecol nesta solução, sendo o cálculo da capacidade de retenção realizado conforme equação abaixo:

$$R = \frac{C_{Aus} - C_{MIP}}{C_{Aus}} * 100$$

Onde:

 C_{Aus} = concentração de catecol no frasco coletor após 10 injeções da amostra sem passagem pelo MIP = (C. V_{col} n)

C = concentração de catecol na solução padrão $(1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$.

 V_{col} = Volume no frasco coletor após 10 injeções da amostra (49 mL).

n = número de injeções da amostra (10).

 C_{MIP} = concentração de catecol no frasco coletor após passagem pelo MIP, medida experimentalmente (3,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹).

4.3.9. Seletividade analítica

Para avaliação deste parâmetro as soluções descritas no item 3.1.1 foram empregadas.

4.3.10. Aplicação

As amostras empregadas para validação do presente método são descritas no item 3.2

Testes de adição/ recuperação foram realizados e, para tanto, adicionou-se alíquotas de soluções com concentração de 2,0 e 6,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol em todas as amostras. A porcentagem de recuperação referente ao sistema proposto foi então avaliada.

As estimativas das principais figuras de mérito do procedimento proposto, tais como precisão analítica, freqüência analítica, consumo de reagentes e desvio padrão dos resultados, para a determinação de catecol foram realizadas. Ainda, os limites de detecção e quantificação do método analítico proposto foram calculados com base no intervalo de confiança da curva analítica sendo os limites de detecção e quantificação neste caso definidos como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 95% de confiança [Ribeiro, et al, 2008].

A curva analítica do referido método foi obtida processando-se soluçõespadrão na faixa de 2,00 - 10,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, num total de seis injeções para cada solução sendo, a estimativa do desvio padrão relativo empregado para expressar a precisão do método proposto.

4.4. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises em fluxo.

A reação para determinação de catecol com 4-aminofenol proposta por Magna e colaboradores [Magna et al., 2003] foi empregada no presente trabalho, visando aumentar a sensibilidade analítica e contornar a forte interferência apresentada pelo 4-aminofenol na reação de catecol descrita por Alexiev e Angelova.

Nesta reação, catecol reage com 4-aminofenol, em meio alcalino, dando origem ao complexo azul de indofenol, o qual é monitorado espectrofotometricamente a 565nm (Figura 11).





Com relação à determinação de catecol com 4-aminofenol, os principais parâmetros envolvidos - pH do ambiente reacional, vazão total do sistema, temperatura, concentrações dos reagentes, comprimento da bobina reacional, volume da amostra - foram avaliados para melhor compreensão da reação e otimização do sistema de análises em fluxo a ser proposto.

O sistema analítico representado pela Figura 12 foi empregado para se investigar as reações químicas envolvidas, sendo que a operação deste sistema foi semelhante à descrita no item 4.2.



Figura 12. Diagrama de fluxos do sistema inicial para determinação de catecol com 4-aminofenol. L = alça de amostragem (100 cm \approx 500 µL); A = amostra (> 2,0 mL min⁻¹); T = solução transportadora (0,1 mol L⁻¹ HNO₃; 2,0 mL min⁻¹); D = detector (564 nm); R₁ = 0,01 mol L⁻¹ 4-aminofenol (0,60 mL min⁻¹); R₂ = 1,00 mol L⁻¹ NaOH (0,8 mL min⁻¹); C = descarte; B₁ e B₂ = bobinas de mistura e de reação (50 e 100 cm); IC = injetor-comutador, com especificação da posição alternativa (área hachureada).

4.4.1. Influência do pH do ambiente reacional

Os estudos para avaliar a influência do pH no desenvolvimento da reação foram conduzidos no sistema da Figura 12. Para tanto, soluções tamponantes de ácido bórico (1,0 mol L⁻¹) previamente ajustadas em pH-metro com uma solução de NaOH (1,0 mol L⁻¹), de maneira a conferir valores de pH na faixa de 8 a 10 e

soluções NaOH (1,0 mol L⁻¹) com valores de pH na faixa de 11 a 13 foram empregadas.

4.4.2. Influência da temperatura

A avaliação deste parâmetro foi realizada conforme procedimento descrito no item 4.2.6.

4.4.3. Influência da vazão total

Para avaliação do efeito da velocidade de propulsão dos fluídos sobre o desenvolvimento reacional, variou-se a rotação da bomba peristáltica de maneira a prover vazões totais entre 1,7 e 5,1 mL min⁻¹.

4.4.4. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

A influência do comprimento da bobina reacional foi estudada na faixa de 50 a 200 cm. Este parâmetro se afigura de extrema importância na otimização dos sistemas em fluxo, pois através dele podem-se obter informações importantes quanto ao tempo médio de residência da amostra bem como o intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação.

4.4.5. Influência da concentração de 4-aminofenol

Para avaliar o efeito da concentração de 4-aminofenol, soluções na faixa de 1,00 x 10⁻⁴ a 2,50 x 10⁻² mol L⁻¹ deste reagente, foram empregadas em R₁ (Figura 12). Soluções com concentrações maiores que 2,50 x 10⁻² mol L⁻¹ não puderam ser preparadas e testadas devido à solubilidade do 4-aminofenol.

4.4.6. Influência do volume de amostra

Para se avaliar a influência do volume da amostra, o comprimento da alça de amostragem foi variado de 25 a 200 cm de maneira a conferir volumes de amostra no intervalo de 125 a 1000 µL.

4.4.7. Seletividade analítica

A seletividade analítica foi avaliada empregando-se as soluções descritas no item 3.1.1 com exceção das soluções de 4-aminofenol. Estas não foram aqui empregadas devido ao fato de este reagente ser a base da reação em foco.

4.5. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises em fluxo e MIP como extrator em fase sólida.

Os estudos foram conduzidos empregando-se o sistema da Figura 13 sendo o procedimento semelhante ao descrito no item 4.3.

As influências de diversos parâmetros tais como o comprimento da bobina reacional B₂, o volume de amostra, a concentração de 4-aminofenol, o tipo de eluente a ser empregado, a natureza do agente de limpeza foram avaliados no sistema da Figura 13. Em seguida, a seletividade analítica do método bem como os limites de detecção e quantificação foram estimados.



Figura 13. Diagrama de fluxos do sistema empregado para determinação de catecol com 4-aminofenol empregando MIP. L = alça de amostragem (320 cm \approx 1,5 mL); A = amostra (> 2,0 mL min⁻¹); E = solução transportadora (0,1 mol L⁻¹ HNO₃; 2,0 mL min⁻¹); D = detector (565 nm); R₁ = 0,025 mol L⁻¹ 4-aminofenol (0,6 mL min⁻¹); R₂= 1,0 mol L⁻¹ NaOH (0,8 mL min⁻¹); SL = agente de limpeza (água; 2,0 mL min⁻¹); C = descarte; B₁ e B₂ = bobinas de mistura e reação (50 e 100 cm); IC = injetor-comutador, com especificação da posição alternativa (área hachureada), CP = mini-coluna de polímero molecularmente impresso (75 mg MIP).

4.5.1. Influência do comprimento da bobina reacional B2

O comprimento da bobina B₂ (Figura 13) foi variado de 100 a 200 cm com o objetivo de verificar a dependência da reação com o tempo, uma vez que o aumento no comprimento da bobina reacional ocasiona um aumento no tempo de residência da amostra e consequentemente no intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação.

4.5.2. Influência do volume de amostra

A influência do volume de amostra foi conduzida analogamente ao item 4.3.4.

4.5.3. Influência da concentração de 4-aminofenol

No presente estudo, a concentração de 4-aminofenol foi variada na faixa de $1,00 \times 10^{-3}$ a 25,0 x 10 $^{-3}$ mol L⁻¹.

4.5.4. Influência da natureza do eluente

Cinco soluções diferentes, a saber, água, 0,1 mol L⁻¹ HOAc, 0,1 mol L⁻¹ HCl, 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄ e 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ foram empregadas no presente estudo objetivando-se encontrar o melhor eluente para o catecol retido no MIP empregado.

4.5.5. Influência da natureza do agente de limpeza

A etapa de limpeza constitui um importante aspecto a ser avaliado quando MIPs são empregados como separadores sólidos. O intuito desta é extrair as espécies interferentes ligadas ao polímero por interações não específicas, sendo que a espécie de interesse não deve ser co-eluída. Para realização deste estudo, soluções 2,0 e 10,0 % (v/v) de metanol ou de acetonitrila foram empregadas. Água também foi avaliada como possível agente de limpeza no presente estudo.

Uma solução-padrão contendo $6,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ catecol bem como soluções contendo $6,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ 2-cresol e solução mista na proporção de 1:10 (m/m) catecol: 2-cresol foram utilizadas.

4.5.6. Seletividade analítica

A seletividade analítica do método proposto foi avaliada empregando-se soluções de 4-cloro-3-aminofenol e 2-cresol nas concentrações de 6,0 x 10^{-5} e 6,0 x 10^{-4} mol L⁻¹. Soluções mistas de catecol (6,0 x 10^{-5} mol L⁻¹) com ambas as espécies interferentes em potencial, também foram avaliadas, nas proporções de 1:1 e 1:10 (m/m) catecol: interferente.
4.5.7. Aplicação

Após o dimensionamento do sistema, a curva analítica foi estabelecida e as amostras de águas, medicamentos e extratos de chás, foram analisadas de forma a serem estimadas as principais figuras de mérito do procedimento proposto, tais como precisão analítica, freqüência analítica, limites detecção e de quantificação.

4.6. Determinação de L-ácido ascórbico empregando MIP como separador enantiomérico em fase sólida

Visando a separação e determinação espectrofotométrica de L-AA empregando MIP, o sistema de análises por injeção em fluxo descrito por Mortatti e colaboradores [Mortatti et al., 1982] para determinação de ferro foi adaptado e empregado acoplando-se uma mini-coluna de MIP em uma das extremidades do injetor comutador (Figura 14). Esta adaptação foi possível, uma vez que a reação empregada por Mortatti e colaboradores envolvia a redução de íons Fe³⁺ por AA e posterior reação entre íons Fe²⁺ e 1,10-fenantrolina, com formação do composto colorido ferroína [Fe(fen)₃²⁺], o qual é monitorado espectrofotometricamente a 510 nm.

4.6.1. Estudos preliminares

Um estudo preliminar foi realizado para definição das melhores concentrações de 1,10 fenantrolina (R_1) e de Fe³⁺ (R_3). Para tanto, soluções na faixa de 0,125 a 1,00% (m/v) e 25 a 200 mg L⁻¹ deste reagentes foram avaliadas previamente ao acoplamento do MIP.

Para o acoplamento da mini-coluna de MIP, algumas modificações no sistema originalmente proposto por Mortatti e colaboradores precisaram ser

realizadas. Um canal adicional para o agente de limpeza do MIP foi acoplado ao sistema (Figura 14) e a vazão do sistema foi reduzida em 50% com a finalidade de minimizar a pressão hidrodinâmica do sistema devido ao acoplamento da mini-coluna.



Figura 14. Diagrama de fluxos do sistema inicial para determinação espectrofotométrica de AA envolvendo MIP. L = alça de amostragem (160 cm \approx 0,8 mL); A = amostra (1,25 mL min⁻¹); E = solução transportadora (0,1 mol L⁻¹ HNO₃; 1,25 mL min⁻¹); D = detector (510 nm); R₁ = 0,125 % 1,10 fenantrolina (m/v) (0,5 mL min⁻¹); R₂= solução tampão 0,1 mol L⁻¹ AcO/ HAc (0,5 mL min⁻¹) ; R₃ = 50 mg L⁻¹ Fe³⁺ (0,5 mL min⁻¹) ; SL = agente de limpeza (água; 1,25 mL min⁻¹); C = descarte; B₁ ,B₂ e B₃ = bobinas de mistura e de reação (25; 50 e 100 cm); IC = injetor-comutador, com especificação da posição alternativa (área hachureada), CP = mini-coluna de polímero molecularmente impresso (100 mg MIP).

Neste sistema, foram avaliadas as influências de diversos parâmetros tais como solução matriz das soluções-padrão e da amostra, natureza do eluente e solução de limpeza, volume de amostra, concentrações dos reagentes (Fe³⁺ e fenantrolina) e comprimento da bobina reacional. A capacidade do MIP em separar os enantiômeros do AA, bem como as estimativas das principais figuras de mérito do método proposto foram avaliadas após o processamento das amostras.

4.6.2. Influência da solução matriz

Uma vez que os MIPs têm maior afinidade pelo analito quando este se encontra no mesmo solvente empregado na síntese, quatro soluções matrizes foram avaliadas no presente estudo, a saber, água e soluções contendo 30; 50 e 70% (v/v) DMSO. Para tanto, soluções-padrão de L-AA na faixa de 0,0 - 80,0 mg L⁻¹ foram preparadas nestas soluções matrizes, e o sistema de análises por injeção em fluxo, representado pela figura 14, foi empregado na consecução do estudo. Ainda, para melhor avaliar a influência destas soluções matriciais nas interações específicas e não específicas do MIP com AA, o mesmo estudo foi também realizado no respectivo NIP sendo, este último, considerado como uma espécie prova ou de branco do polímero.

4.6.3. Influência da natureza do eluente

Para seleção do eluente a ser empregado, quatro diferentes soluções, a saber, 0,1 mol L⁻¹ HOAc, 0,1 mol L⁻¹ HCl e 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ foram avaliadas. Água também foi avaliada como possível eluente.

Após a realização do estudo visando a seleção do melhor eluente, um segundo sistema de análises por injeção em fluxo (Figura 15) foi proposto. Neste, uma solução tampão composta por 0,1 mol L⁻¹ ácido acético/ acetato de sódio era empregada como solução eluente



Figura 15. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de (L) AA envolvendo MIP como separador enantiomêrico. L = alça de amostragem (160 cm \approx 0,8 mL); A = amostra (1,25 mL min⁻¹); E = solução transportadora (solução tampão 0,1 mol L⁻¹ AcO/ HAc 1,25 mL min⁻¹); D = detector (510 nm); R₁ = 0,06 % 1,10 fenantrolina (m/v) (0,5 mL min⁻¹); R₂ = 25 mg L⁻¹ Fe³⁺ (0,5 mL min⁻¹) ; SL = agente de limpeza (água; 1,25 mL min⁻¹); C = descarte; B₁ = bobinas de mistura e de reação (100 cm); IC = injetor-comutador, com especificação da posição alternativa (área hachureada), CP = mini-coluna de polímero molecularmente impresso (100 mg MIP).

4.6.4. Influência do agente de limpeza

Como ressaltado no item 4.5.5, a etapa de limpeza constitui-se em um importante aspecto a ser avaliado quando MIPs são empregados. A solução de limpeza tem por objetivo extrair as espécies interferentes ligadas ao polímero por interações não específicas, bem como retirar o excesso de amostra da minicoluna polimérica. Cabe ressaltar que a solução de limpeza não deve co-eluir o analito nem causar qualquer tipo de influência na determinação deste. Para realização deste estudo, soluções de 0,0 a 70% (v/v) DMSO foram empregadas como possíveis agentes de limpeza do MIP.

4.6.5. Influência do volume de amostra

O volume de amostra foi avaliado conforme procedimento descrito no item 4.3.4

4.6.6. Influência da concentração dos reagentes

Três diferentes concentrações de Fe³⁺ (12,5; 25,0 e 50,0 mg L⁻¹ Fe³⁺) foram empregadas (Figura 15) para se avaliar o efeito deste reagente no sinal analítico, referente à determinação de AA em sistema de análises por injeção em fluxo empregando mini-coluna polimérica. O efeito da variação da concentração de 1,10-fenantrolina foi também avaliado e, para tanto, soluções com 0,3 -1,2 % (m/v) deste reagente foram empregados em R₂.

4.6.7. Influência do comprimento da bobina reacional

Visando um melhor dimensionamento físico do sistema, bem como melhores condições de mistura, o comprimento do reator B₁ foi avaliado. Reatores de 50; 100; 150 e 200 cm de comprimento com diâmetro de enrolamento igual a 1,5 cm foram empregados no presente estudo.

4.6.8. Capacidade de separação enantiomérica do MIP

No presente estudo, soluções 0,00 - 20,0 mg L⁻¹ de L-AA e D-AA foram preparadas em 30% (v/v) DMSO. Soluções mistas destes enantiômeros foram também preparadas, conforme descrito no item 3.1.2., e analisadas empregandose o sistema de fluxo ilustrado na figura 15.

4.6.9. Tempo de limpeza da coluna

Três intervalos de tempo e duas soluções-padrão de AA, a saber, 2:00; 2:30 e 3:00 min e 5,00 e 15,00 mg L⁻¹ (L) AA foram empregados no presente estudo, sendo o mesmo realizado tanto para o MIP como para o respectivo NIP com o objetivo de verificar se as interações entre analito-MIP e analito-NIP alteravam em função deste parâmetro.

4.6.10. Seletividade analítica

Para o presente estudo as soluções descritas no item 3.1.2 foram empregadas. Estas continham alguns dos principais excipientes encontrados em suplementos para vitamina C, os quais podem ser considerados como interferentes em potencial.

4.6.11. Aplicação analítica

Após a otimização dos parâmetros envolvidos no dimensionamento do sistema de análises por injeção em fluxo visando a separação enantiomérica de L-AA e D-AA, as amostras de suplementos vitamínicos e sucos naturais foram analisadas e comparadas com a metodologia oficial [AOAC, 1995]. A curva analítica foi estabelecida pela injeção das soluções-padrão na faixa de 2,5 a 20,0 mg L⁻¹ AA (n= 6) e os limites de detecção e quantificação foram estimados com base em parâmetros da curva analítica. As estimativas da precisão analítica, freqüência analítica e desvio padrão dos resultados da reação em foco foram ainda realizadas.

4.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE.

A determinação espectrofotométrica de atrazina em amostras de águas naturais e extratos de solo empregando MIP como extrator em fase sólida em sistemas de análises por injeção em fluxo multicomutado (Figura 16) foi baseada na propriedade que este analito tem de absorver radiação ultravioleta. O monitoramento foi conduzindo na faixa de 220 a 260 nm através do emprego de um espectrofotômetro multicanal de fabricação Ocean Optics, modelo USB2000-UV-VIS, o qual permitia o monitoramento simultâneo em quatro comprimentos de onda.

Neste sistema, a amostra era bombeada para a mini-coluna polimérica (CP) através do acionamento da válvula V₂, a qual permanecia ligada durante um intervalo de tempo de 2 min. Após este período, a válvula V₂ era desligada e uma solução de limpeza fluía pela mini-coluna polimérica, através do acionamento de V₃, durante 3 min. As válvulas V₃ e V₄ eram então desligadas, sendo a válvula V₁, correspondente ao eluente, acionada. Neste instante o analito era eluído do MIP e a zona de amostra formada era monitorada espectrofotometricamente na faixa de comprimento de onda de 220-260 nm. Cabe ressaltar que a alíquota de amostra e reagentes em sistemas de análise por injeção em fluxo com multicomutação é proporcional à vazão de bombeamento e ao intervalo de tempo em que as válvulas permanecem acionadas. A influência de alguns parâmetros como natureza da solução matriz das soluções-padrão, natureza do eluente e volume de amostra foram avaliadas visando a determinação espectrofotométrica de atrazina em águas naturais e em extratos de solo.



Figura 16. Diagrama de fluxos do sistema para determinação de atrazina envolvendo MIP-SPE. V₁, V₂, V₃ e V₄ = válvulas solenóide de três vias; A = amostra (1,00 mL min⁻¹); E = solução eluente (metanol; 1,00 mL min⁻¹); D = detector (220-260 nm); SL= agente de limpeza (acetonitrila; 1,00 mL min⁻¹); C = descarte/ coleta; B₁ = bobinas de mistura e reação (50 cm); CP = mini-coluna de polímero molecularmente impresso (140 mg MIP).

4.7.1. Influência da natureza do eluente

Visando selecionar o eluente para a determinação em foco, os seguintes solventes e misturas de solventes foram empregados: metanol, ácido acético glacial, metanol/ ácido acético (4:1, v/v), acetonitrila, acetonitrila/ água (98:2, v/v) e acetonitrila/ ácido acético (94:6, v/v).

4.7.2. Influência da solução matriz

Quando MIPs são empregados em SPE, um importante parâmetro a ser avaliado é a natureza da solução matriz onde amostras e soluções-padrão são preparados. Isto se deve ao fato da interação do analito com MIP ser mais eficiente quando este se encontra no mesmo solvente empregado na síntese ou em outro solvente com polaridade bem próxima a este. No presente estudo, três solventes foram avaliados como possíveis soluções matrizes, a saber: clorofórmio, acetato de etila e acetonitrila.

4.7.3. Influência do volume de amostra

A influência do volume de amostra foi avaliada variando se o tempo de passagem das soluções padrão pela coluna polimérica entre 10 e 300 s (\approx 0,2 - 5,0 mL).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são descritos os resultados obtidos para no presente trabalho.

5.1. Síntese e caracterização dos MIPs

5.1.1. MIP para determinação de catecol

Relativamente ao MIP empregado na determinação de catecol, a caracterização morfológica do mesmo não foi realizada pelos autores.

5.1.2. MIP para determinação de AA

A síntese do MIP para determinação de AA foi realizada sem maiores problemas empregando metodologia descrita no item 4.1.2.

Quando DMF foi empregado como solvente verificou-se a formação de precipitado no ambiente da sintese, o que inviabilizou o seu emprego. Somente o MIP sintetizado com DMSO foi avaliado no presente trabalho.

Uma síntese alternativa foi avaliada visando a obtenção de um MIP em condições mais brandas no que tange a temperatura. Para tanto, o banho térmico a 60 °C foi substituído por um banho a 15 °C e uma lâmpada de UV (366 nm, 20 W) foi empregada como fonte de irradiação. Nestas condições, porém não houve formação do MIP. Optou-se então por empregar banho térmico para favorecer a formação do polímero.

Após a polimerização, a caracterização morfológica do MIP sintetizado para L-AA e do respectivo NIP foi realizada. Quanto à análise da superfície do MIP e do NIP de L-AA, podem-se observar irregularidades na geometria e na superfície de ambos os polímeros (Figura 17). Este comportamento irregular é característico de MIPs sintetizados pelo método "bulk", uma vez que as partículas são obtidas pela pulverização do bloco polimérico formado. A análise das irregularidades da superfície dos polímeros também permite concluir que estas apresentarm boa porosidade, sendo maior para o MIP do que para o NIP (Figura 17), o que resulta em apenas uma conclusão parcial deste parâmetro. Ressalte-se ainda que, no NIP, o analito não é empregado na síntese e que as interações entre monômero funcional, solvente e iniciador radicalar se processam de maneira diferente relativamente as do MIP. As interações que ocorrem no NIP são, em sua maioria, do tipo não específica e não se sabe ao certo quais são os grupamentos químicos formados nos sítios de ligação. Este fator pode, em alguns casos, gerar falsos brancos poliméricos e até comprometer os resultados analíticos, uma vez que o analista não observa diferenças significativas entre os resultados apresentados pelo NIP e pelo MIP ou seja ambos podem apresentar respostas iguais para a retenção do analito.

O MIP para L-AA também apresentou diferenças na coloração e na transparência quando comparado ao respectivo NIP.



Figura 17. Micrográfias eletrônicas de varredura do polímero não impresso (NIP) e do polímero molecularmente impresso para L-AA (MIP) com tamanhos de partículas menores que 250µm.

Após a caracterização, o MIP foi acomodado em uma mini-coluna a qual foi posteriormente acoplada em uma das extremidades do injetor-comutador no sistema de análises por injeção em fluxo a ser empregado.

5.1.3. MIP para determinação de atrazina

A síntese para determinação de atrazina foi realizada segundo procedimento descrito no item 4.1.3. Para avaliação das características morfológicas do MIP e do NIP um microscópio eletrônico de varredura JEOL JMS-5600 LMV foi empregado. Como esperado, as partículas apresentaram um formato irregular (Figura 18) e superfícies porosas, o que se constitui em um importante fator nos processos de interação analito-MIP. O fato de as partículas apresentarem geometrias irregulares não limita o seu emprego como extratores em fase sólida. Desta forma, a aplicação do MIP de atrazina como extrator em fase sólida se torna promissor.





Figura 18. Micrografias eletrônicas de varredura do polímero não impresso (NIP) e do polímero molecularmente impresso para atrazina (MIP) com tamanhos de partículas menores que 0,25 mm.

Diferentemente do MIP sintetizado para L-AA o MIP para atrazina não diferiu do NIP em coloração e transparência.

5.2. Determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo.

A reação catalítica descrita por Alexiev (1980) foi implementada no sistema de análises por injeção em fluxo, sendo que os principais resultados obtidos encontram-se descritos a seguir.

5.2.1. Influência do pH do ambiente reacional

O pH do ambiente reacional se mostrou um parâmetro importante no desenvolvimento reacional, pois modificações pronunciadas em sinais analíticos foram observadas em função de sua variação (Figura 19), especialmente sob condições mais alcalinas.



Figura 19. Influência do pH reacional. As barras referentes a diferentes pH correspondem a 2,50; 5,00; $10,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ catecol e as letras a e b se referem às diferentes faixas de pH estudadas. A = altura de pico em absorbância.

Segundo Alexiev, melhor sensibilidade analítica é verificada para valores de pH próximos a 11. Estudos preliminares comprovaram que o sinal analítico aumentava com o aumento do pH até atingir 12,5, onde uma ligeira redução na magnitude do sinal analítico foi observada (Figura 19b). No entanto, experimentos paralelos sobre a variação de pH concomitantemente a estratégia de parada de fluxo revelaram que, para valores de pH maiores que 11,0, a cinética reacional era favorecida sendo o produto da reação rapidamente formado e decomposto. Portanto, no momento da aquisição do sinal analítico apenas parte do produto formado era monitorado, ou seja, o máximo do sinal analítico ocorria antes de sua mensuração. Estudos para melhor se avaliar a cinética reacional foram então conduzidos, os quais envolveram variações da vazão total do sistema e do comprimento da bobina reacional B₂. Nestes experimentos, R₃ era uma solução 0,1 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ previamente ajustadas com NaOH em pH-metro de maneira a proporcionar um ambiente reacional com pH acima de 12,5.

5.2.2. Influência da vazão total

Com relação à influência da vazão total do sistema (Figura 9), observou-se um aumento pronunciado em sensibilidade analítica com o aumento na vazão (Figura 20). A maior vazão (8,3 mL min⁻¹) foi escolhida por propiciar uma maior velocidade analítica e um maior desenvolvimento reacional sem, entretanto, causar uma pressão hidrodinâmica alta o suficiente para romper as ligações entre os componentes do módulo de análises do sistema.



Figura 20. Influência da vazão. As barras referentes às diferentes vazões correspondem a 2,50; 5,00; $10,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.2.3. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

Quando o comprimento da bobina reacional B₂ foi aumentado de 25 a 150 cm, observou-se um aumento na magnitude do sinal analítico (Figura 21), o qual está diretamente associado à cinética reacional envolvida na determinação de catecol. De fato, existe um tempo de residência médio adequado que está associado à máxima sensibilidade. Nesta situação, a taxa de formação de coloração devida à reação envolvida é exatamente compensada pela taxa de degradação do composto colorido formado. Pode-se então concluir que a sensibilidade é fortemente dependente da otimização temporal. Para comprimentos de bobina superiores a 150 cm, um leve decréscimo em sinal analítico foi observado, provavelmente em decorrência da maior dispersão da zona de amostra. A bobina de 150 cm foi então escolhida para continuidade dos estudos. Deve-se aqui salientar que este aspecto está em conformidade com a Figura 19.

Alternativamente, o emprego de menores bobinas reacionais (B₂) só seria possível se o tempo de residência fosse mantido após redução da vazão. Entretanto, testes paralelos revelaram que, para menores bobinas reacionais e baixas vazões, a repetibilidade analítica era comprometida. A perda em repetibilidade não compensava a redução no consumo de reagentes. Desta forma, optou-se pela manutenção da vazão total em 8,3 mL min⁻¹ e do comprimento de B₂ em 150 cm.



Bobina reacional (cm)

Figura 21. Influência do comprimento da bobina reacional B2. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem a 2,50; 5,00; 10,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.2.4. Influência do pH do ambiente reacional e da vazão total

Fixado o comprimento da bobina reacional como 150 cm, e tendo-se verificado que condições bastante alcalinas eram requeridas na reação em foco, procedeu-se uma nova otimização da alcalinidade do ambiente reacional e da vazão total do sistema, conforme descrito no item 4.2.4.

A análise da Figura 22 permite a confirmação dos efeitos discutidos nos itens 5.2.2 e 5.2.3, ou seja, o composto colorido se forma de maneira relativamente rápida (taxa influenciada pela alcalinidade do meio reacional) e é instável, sofrendo decomposição. Existe sempre um valor máximo de sinal analítico que corresponde, na presente situação, a uma solução de 1,0 mol L⁻¹ NaOH e a uma vazão de 6,2 mL min⁻¹.





5.2.5. Influência das concentrações dos reagentes

Com relação aos experimentos envolvendo variações da concentração de Co²⁺ (Figura 23) observou-se que este parâmetro se mostrou pouco influente no método. Verificou-se, entretanto que a concentração de 10,0 mg L⁻¹ correspondeu ao maior sinal analítico. No entanto, visando uma redução na quantidade de reagentes tendo em vista menor geração de resíduos, a concentração 1,00 mg L⁻¹ Co²⁺ foi selecionada. Esta apresentou sinais analíticos apenas 13% menores quando comparados àqueles apresentados pela solução 10,0 mg L⁻¹ Co²⁺ o que é aceitável dentro do objetivo proposto de redução na concentração do resíduo gerado. Observa-se ainda que a reação ocorre mesmo em ausência de Co²⁺

porém, a supressão deste reagente não é recomendada uma vez que, a possível presença deste ânion na amostra afetaria o desenvolvimento reacional o que elevaria este a qualidade de um interferente em potencial.



Figura 23. Influência da concentração de Co²⁺. A figura se refere ao sistema da Figura 9 com $H_2O_2 = 0.05 \%$ (v/v); as barras referentes às diferentes concentrações de Co²⁺ correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

Relativamente aos experimentos envolvendo variação na concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 24), pode-se verificar um aumento na sensibilidade analítica até a concentração de 0,05% (v/v) deste reagente, com uma significante redução no sinal analítico para concentrações maiores. Isto pode estar relacionado à cinética das reações de formação e de degradação do composto colorido envolvido na determinação de catecol (ver itens 5.2.2 e 5.2.3). Ainda a falta de sensibilidade e linearidade apresentada para soluções de H₂O₂ com concentrações inferiores a 0,05% (v/v) pode ser atribuída à falta deste reagente para o melhor desenvolvimento reacional. A concentração de 0,05% (v/v) H₂O₂ foi então selecionada como solução de trabalho.

Cabe ressaltar que para concentrações de H₂O₂ superiores a 0,05% (v/v) uma grande quantidade de bolhas O₂ eram formadas em linha, o que também comprometia a mensuração dos sinais analíticos.



Figura 24. Influência da concentração de H₂**O**₂**.** A figura se refere ao sistema da Figura 9 com 0,1 mg L⁻¹ Co²⁺. As barras referentes às diferentes concentrações de H₂O₂ correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 x10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.2.6. Influência da temperatura

Os resultados obtidos (Figura 25) apontaram uma redução na magnitude do sinal analítico com o aumento da temperatura.

Uma vez que a temperatura influencia a cinética reacional dos métodos catalíticos, e tendo em vista que a reação se mostrou fortemente dependente do tempo, do comprimento da bobina reacional e da vazão, o decréscimo no sinal analítico com o aumento da temperatura indica que houve uma aceleração na cinética da reação com rápida formação do produto, sendo parcialmente decomposto antes do monitoramento, conforme já salientado anteriormente.

Visando a simplicidade operacional do sistema a ser proposto, optou-se por trabalhar ao redor de 25 ℃, temperatura esta mantida por aparelho de ar condicionado.



Temperatura (℃)

Figura 25. Influência da temperatura. As barras referentes às diferentes temperaturas correspondem 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 x 10^{-4} mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.2.7. Influência do volume de amostra

Quanto à variação do volume de amostra introduzido no sistema, constatou-se um aumento no sinal analítico em função do aumento deste parâmetro (Figura 26).



Volume de amostra (uL)

Figura 26. Influência do volume de amostra. As barras referentes aos diferentes volumes correspondem 2,00; 4,00; 6,00; 8,00, e $10,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

Quando o coeficiente de dispersão da amostra atinge uma unidade, pode-se dizer que a amostra não sofre dispersão. Nesta situação, a variação do volume da amostra não altera a altura do sinal analítico, apenas a largura do pico registrado. Entretanto, o coeficiente de dispersão da amostra igual a uma unidade teoricamente nunca é satisfeito, uma vez que os efeitos de dispersão da zona de amostra durante seu transporte através do percurso analítico tendem a ser inevitáveis. Em virtude disto, e considerando-se que volumes excessivos levam a uma redução pronunciada no tempo de limpeza do sistema, não se recomenda o emprego de um volume de amostra injetado que resulte em um sinal analítico equivalente a 87 % do máximo sinal teoricamente atingível [Ruzicka; Hansen, 1988]. Isto corresponde a $3S_{0,5}$ ($S_{0,5}$ = semivolume de amostra, modelo tanques-em-série). Neste sentido, o volume de amostra introduzido no sistema foi

selecionado como 500 μl. Nesta situação, a resposta analítica foi bastante favorável, pois não havia dispersão acentuada da zona de amostra.

5.2.8. Seletividade

A seletividade analítica foi investigada utilizando-se as soluções especificadas no item 3.1.1. Observou-se que somente as soluções contendo catecol/ 2-crezol e catecol/ 4-cloro-3metilfenol nas proporções de 1:10 apresentaram interferências negativas. As soluções contendo 4-aminofenol, no entanto, apresentaram interferência em qualquer proporção. Isto se deve ao fato do 4-aminofenol reagir com o catecol dando origem a um complexo colorido [Magna et al., 2003], o qual interferia na determinação de catecol pelo método proposto.

Para contornar estas interferências e melhorar a seletividade analítica do método, um MIP de catecol foi empregado como extrator em fase sólida, sendo a mini-coluna do MIP acoplada ao sistema de análises por injeção em fluxo, conforme descrito no item 4.3. Os resultados referentes aos estudos do dimensionamento do sistema são relatos abaixo.

5.3. Determinação de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo e MIP como extrator em fase sólida

O sistema foi dimensionado conforme apresentado na Figura 10. Devido ao acoplamento da mini-coluna polimérica, alguns parâmetros anteriormente otimizados tiveram que ser reavaliados. Com relação à vazão total, esta teve que ser reduzida para 3,1 mL min⁻¹ em função do aumento da pressão hidrodinâmica causado pela inclusão da mini-coluna. A natureza da solução transportadora também foi alterada para 0,1 mol L⁻¹ HNO₃, uma vez que estudos preliminares

mostraram que, nesta concentração, a eluição da coluna era mais efetiva. Os demais parâmetros como alcalinidade, concentração dos reagentes, comprimento da bobina reacional, volume da amostra bem como taxa de retenção da coluna foram então avaliados.

5.3.1. Influência da concentração de NaOH

Relativamente ao efeito da alcalinidade no desenvolvimento reacional, pode-se observar uma redução do sinal analítico com o aumento na concentração de NaOH (Figura 27). Este aspecto está associado ao aumento da velocidade das reações químicas envolvidas, conforme já enfatizado nos itens 5.2.2 e 5.2.3 sendo a concentração de 1,0 mol L⁻¹ NaOH definida como solução de trabalho.



Figura 27. Influência da concentração de NaOH. As barras referentes às diferentes concentrações de NaOH, correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.3.2. Influência da natureza do eluente

No que se refere à escolha do eluente a ser utilizado, diferenças significativas nos sinais analíticos e larguras de pico não foram observadas para as soluções de ácidos empregados. No entanto, verificou-se uma redução no sinal analítico acompanhada por um aumento na largura de pico quando água era empregada como eluente. Os resultados permitem inferir que água não se apresenta como um bom eluente para a metodologia proposta. De fato, a natureza das soluções envolvidas bem como a polaridade destas influencia na cinética de interação/ remoção do analito no MIP. Soluções apolares e apróticas são normalmente empregadas na síntese dos MIPs, sendo estas ideais para uma posterior ligação do analito ao polímero. Em contrapartida, soluções polares e próticas constituem-se em bons eluentes para retirada do analito ligado, sendo normalmente empregadas para tal finalidade.

Uma solução 0,1 mol L^{-1} de HNO₃ foi então selecionada para continuidade dos estudos.

5.3.3. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

Uma vez que a reação catalítica para determinação de catecol se mostrou fortemente dependente do tempo disponível para o desenvolvimento reacional, e devido às alterações na natureza da solução transportadora bem como na vazão total, experimentos adicionais envolvendo variações no comprimento da bobina reacional B₂ foram realizados.



Bobina reacional (cm)

Figura 28. Influência do comprimento da bobina reacional B₂ na determinação de catecol com mini-coluna. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x 10^{-4} mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

Quando o comprimento da bobina reacional foi variado de 25 a 150 cm observou-se um aumento do sinal analítico com o comprimento da bobina até o comprimento de 100 cm, decrescendo para comprimentos maiores que este (Figura 28) comportamento este análogo ao discutido no item 5.2.3. Este parâmetro foi então fixado em 100 cm.

5.3.4. Influência do volume de amostra

Quanto à variação do volume de amostra introduzido no sistema, constatou-se um aumento na sensibilidade analítica em função do aumento deste parâmetro (Figura 29).



Volume de amostra (uL)

Figura 29. Influência do volume de amostra na determinação de catecol com minicoluna. As barras referentes aos diferentes volumes de amostra correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\times 10^{-4}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

O aumento linear da absorbância em função do volume de amostra introduzido no sistema comprova que a retenção do catecol pelo MIP é quantitativa. Para volumes superiores a 2000 µL o acréscimo em sinal analítico não era expressivo, provavelmente devido à saturação dos sítios de ligação do MIP (ver também comentários item 5.2.7). O volume de 1600 µL foi então selecionado para continuidade do trabalho tendo em vista o compromisso entre sensibilidade analítica e freqüência analítica.

5.3.5. Influência das concentrações dos reagentes

Quando a concentração de Co²⁺ foi variada de 0,01 a 10 mg L⁻¹ pequenas alterações foram observadas com relação à magnitude do sinal analítico. A concentração de 0,1 mg L⁻¹ foi então selecionada em virtude desta apresentar

uma ligeira melhora em sensibilidade quando comparada às demais concentrações (Figura 30).



Figura 30. Influência da concentração de Co^{2+} na determinação de catecol com minicoluna. As barras referentes às diferentes concentrações de Co^{2+} correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

Relativamente à concentração de peróxido de hidrogênio, constatou-se que a concentração de 0,025 % (v/v) foi a que apresentou melhor resposta analítica, sendo observado um decréscimo em sensibilidade para concentrações de peróxido superiores a esta (Figura 31). Estes resultados são concordantes com os anteriormente apresentados no item 5.2.5 ressaltando-se que, como já exposto a cinética das reações de formação e de degradação do composto colorido envolvido na determinação de catecol é afetada pela concentração deste reagente (ver comentários nos items 5.2.2, 5.2.3 e 5.2.5). A solução de 0,025 % (v/v) foi então selecionada como solução de trabalho.



 H_2O_2 (% v/v)

Figura 31. Influência da concentração de H_2O_2 na determinação de catecol com mini-coluna. As barras referentes às diferentes concentrações de H_2O_2 correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.3.6. Influência da temperatura

Os resultados obtidos na avaliação do efeito da temperatura no desenvolvimento da reação, para o intervalo entre 10 e 45 °C, indicaram pouco ganho em sensibilidade analítica para temperaturas menores que 25 °C (Figura 32). De fato a redução média dos sinais analíticos obtidos a 25 °C e a 10 °C foi de apenas 9 %. Visando uma maior simplicidade instrumental a temperatura de 25 °C foi empregada para estudos subseqüentes.

Cabe salientar que valores de temperatura maiores que 45 °C não foram testados em virtude da maior probabilidade de formação e liberação de bolhas no sistema, além da possível deformação dos tubos de polietileno a partir de 50 °C, e que temperaturas inferiores a 10 °C não foram empregadas em virtude da opacidade causada pela deposição de água condensada na cubeta de fluxo.





Figura 32. Influência da temperatura na determinação de catecol com mini-coluna. As barras referentes às diferentes temperaturas correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; $8,00 e 10,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.3.7. Influência do pH da amostra

Quanto à influência do pH da amostra na retenção de catecol pelo MIP, observa-se um aumento do sinal analítico em função do aumento nos valores de pH até aproximadamente pH=5 (Figura 33). Isto pode ser atribuído às características de interação catecol-polímero. De fato, como neste caso, o MIP interage com o analito de maneira a formar pontes de hidrogênio, e uma vez que o catecol é uma molécula que apresenta um caráter básico, o aumento da concentração hidrogeniônica faz com que haja uma espécie de "competição" entre os hidrogênios dos sítios de ligação do polímero e os da solução contendo catecol, diminuindo assim a interação do analito no polímero. Valores de pH maiores que 5,0 não foram avaliados em virtude da possibilidade de precipitação de compostos, porém pode-se inferir que uma maior quantidade de íons hidroxilas na solução de amostra levaria a uma "competição " entre as hidroxilas presentes na molécula de catecol e as disponíveis na solução.



Figura 33. Influência da pH da amostra. As barras referentes a diferentes pH correspondem a $10,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

Cabe ressaltar ainda que as interações entre MIP e analito são fortemente influenciadas pela polaridade das soluções envolvidas conforme salientado no item 5.3.2

5.3.8. Avaliação da retenção da coluna

A avaliação da retenção da coluna deve sempre ser realizada, especialmente em relação a sistemas que envolvem processos de concentração/ separação em linha. Neste estudo, observou-se que quase todo o catecol presente na solução injetada era retido na coluna de MIP uma vez que 94 % da quantidade de catecol permaneceu retida na coluna.

5.3.9. Seletividade analítica

Para avaliação da seletividade analítica do MIP, soluções de 6,00 x 10^{-3} e 6,00 x 10^{-4} mol L⁻¹ de 4-aminofenol, 4-cloro-3-metilfenol e 2-cresol, foram preparadas e injetadas no sistema proposto na Figura 9. Soluções de 6,00 x 10^{-4}

mol L⁻¹ catecol foram ainda preparadas juntamente com soluções de 6,00 x 10^{-3} e 6,00 x 10^{-4} mol L⁻¹ dos respectivos interferentes em potenciais de maneira a conferir soluções nas proporções 1:1 e 1:10 de catecol : interferente.

Verificou-se que todas as espécies químicas testadas apresentavam interferência na proporção de 1:10. As soluções contendo 4-aminofenol apresentaram interferência em todas as concentrações avaliadas com formação de um complexo colorido de indofenol em presença de catecol. Relativamente ao emprego de MIP visando contornar a interferência causada por este composto, observou-se que esta foi minimizada pelo emprego do polímero, porém não eliminada.

Para contornar esta limitação um novo método analítico foi então testado. Neste o catecol reage em meio alcalino com 4-aminofenol formando um complexo indofenólico, monitorado espectrofotometricamente a 565 nm.

5.3.10. Aplicação

Após estudo da seletividade analítica, a sensibilidade analítica do método proposto foi estimada. Par tanto, uma curva analítica foi obtida (Figura 34), sendo representada como: y = 0,0484 x + 0,0022.

onde: y = altura de pico em absorbância, x = concentração de catecol em 10^{-4} mol L⁻¹, (r > 0,998; n = 4).



Figura 34. Curva analítica típica da determinação espectrofotométrica de catecol empregando sistema de análises por injeção em fluxo empregando MIP como extrator em fase sólida. A figura se refere ao sistema de análises por injeção em fluxo da Figura 10. A = altura de pico em absorbância.

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados como 0,49 $\times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e 0,60 $\times 10^{-4}$ mol L⁻¹ respectivamente, e a freqüência analítica foi de 12 determinações por hora.

As amostras foram analisadas antes e após a adição de 2,00 e 6,00 x 10^{-4} mol L⁻¹ catecol e os resultados obtidos constam na Tabela 1, sendo avaliação da porcentagem de recuperação do método proposto obtida nos três diferentes níveis de concentração (0,0; 2,0 e 6,0 x 10^{-4} mol L⁻¹ catecol). Observa-se que as faixas de recuperação foram inferiores a 20% (89,8 - 104,8 %) o que permite concluir que as substâncias presentes nas amostras interferiram pouco na determinação de catecol sendo o método proposto aplicável a determinação deste analito sem que haja necessidade de um pré-tratamento das amostras.

Tabela 1. Resultados obtidos para determinação de catecol empregando MIP como extrator em fase sólida. Os dados, em 10⁻⁴ mol L⁻¹ catecol, correspondem às estimativas das médias dos desvios - padrão dos resultados obtidos pelo processamento em triplicata das amostras.

Amostra	Concentração de catecol adicionada	Concentração catecol recuperada	Recuperação %
Resíduo de indústria papeleira	0	< LOD	-
	2	1,78 ± 0,08	89,80 ± 4,16
	6	6,13 ± 0,02	102,13 ± 0,35
Águas naturais			
A	0	< LOD	-
	2	1,91 ± 0,09	95,38 ± 4,65
	6	6,15 ± 0,11	102,5 ± 1,91
В	0	< LOD	-
	2	1,88 ± 0,02	95,50 ± 1,10
	6	6,24 ± 0,17	104,02 ± 1,90
С	0	< LOD	-
	2	2,15 ± 0,01	107,70 ± 0,52
	6	$6,26 \pm 0,03$	104,28 ± 0,46
D	0	< LOD	-
	2	$2,00 \pm 0,02$	100,21 ± 1,09
	6	6,30 ± 0,20	104,76 ± 3,17
	0	< LOD	-
E	2	$2,04 \pm 0,03$	101,77 ± 1,65
	6	6,10 ± 0,06	101,70 ± 0,98
F	0	< LOD	-
	2	2,01 ± 0,05	100,37 ± 1,65
	6	6,25 ± 0,08	104,17 ± 1,41
Medicamento	0	< LOQ	-
	2	2,04 ± 0,01	101,90 ± 0,60
	6	5,99 ± 0,05	99,88 ± 0,90
Chá verde	0	< LOQ	-
	2	$2,02 \pm 0,02$	101,17 ± 1,03
	6	6,08 ± 0,03	101,37 ± 0,53
Chá Mate	0	< LOQ	-
	2	$2,07 \pm 0,04$	103,20 ± 2,07
	6	6,06 ± 0,1	101,03 ± 1,6

5.4. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises em fluxo.

5.4.1. Influência do pH reacional

No presente estudo observou-se que a reação de determinação de catecol com 4-aminofenol só ocorria em valores de pH acima de 11 sendo o máximo de absorbância observado em pH ~ 13. Uma solução 1,0 mol L⁻¹ NaOH foi então empregada para assegurar o pH do ambiente reacional em torno de 13.

5.4.2. Influência da temperatura

Relativamente à influência da temperatura no desenvolvimento reacional, os resultados obtidos apontaram para uma redução na magnitude do sinal analítico com o aumento da temperatura, o que pode ser demonstrado pelos resultados ilustrados na Figura 35. Visando simplicidade do sistema proposta, optou-se por trabalhar ao redor de 25 °C, temperatura ambiente mantida por aparelho de ar condicionado.



Figura 35. Influência da temperatura na determinação de catecol com 4-aminofenol. As barras referentes às diferentes temperaturas correspondem 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e $10, 0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.4.3. Influência da vazão total

O aumento na vazão total do sistema ocasionava um ligeiro aumento em sensibilidade analítica, a qual não foi tão pronunciada para vazões maiores do que 3,4 mL min⁻¹, a qual foi escolhida para continuidade do trabalho (Figura 36). Estes resultados corroboram aqueles discutidos no item 5.2.2.



Figura 36. Influência da vazão na determinação de catecol com 4-aminofenol. As barras referentes às diferentes vazões correspondem a 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10, 0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.4.4. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

Relativamente aos experimentos envolvendo a variação no comprimento da bobina reacional, pode-se verificar um aumento acentuado no sinal analítico até o comprimento de 100 cm, sendo que o sinal permaneceu relativamente constante para comprimentos de 150 cm. Similarmente aos resultados descritos no item 5.2.3, para valores de bobinas maiores que 150 cm uma maior dispersão da zona de amostra com conseqüente decréscimo no sinal analítico pode ser observada (Figura 37). A bobina de 100 cm foi então empregada, uma vez que não houve diferenças significativas em sinais analíticos quando uma bobina de 150 era utilizada.


Figura 37. Influência do comprimento da bobina reacional B₂ na determinação de catecol empregando MIP. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10, 0 x 10^{-5} mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

Cabe ressaltar que o efeito Schlieren foi observado quando bobinas menores do que 100 cm foram empregadas. Este efeito compromete a mensuração analítica e repetibilidade, uma vez que não há uma homogeneidade efetiva entre os reagentes envolvidos gerando gradientes de concentração.

5.4.5. Influência da concentração de 4-aminofenol

Quanto aos experimentos envolvendo variações da concentração de 4aminofenol, observou-se que este parâmetro é de extrema importância no desenvolvimento reacional (Figura 38). Notou-se um aumento acentuado em sensibilidade analítica com o aumento na concentração de 4-aminofenol. No entanto, não se observaram variações significativas na magnitude do sinal analítico para concentrações maiores que 0,01 mol L⁻¹. Esta foi então escolhida como concentração de trabalho.



Figura 38. Influência da concentração de 4-aminofenol. A figura se refere ao sistema da Figura 11, e as barras referentes às diferentes concentrações de 4-aminofenol, correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x 10^{-5} mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.4.6. Influência do volume de amostra

Relativamente ao volume de amostra inserido no sistema, verificou-se que um aumento no comprimento da alça de amostragem e consequentemente do volume injetado de amostra ocasionaram um aumento pronunciado do sinal analítico (Figura 39). Isto mostra que a quantidade de catecol influencia diretamente na formação do complexo azul de indofenol. O volume de amostra, no entanto, não pode ser aumentado indefinidamente uma vez que volumes excessivos levam a um aumento pronunciado no tempo de limpeza do sistema comprometendo assim a freqüência analítica.



Figura 39. Influência do volume da amostra na determinação de catecol com 4aminofenol. As barras referentes aos diferentes volumes de amostra correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

O volume de 500 µL foi então escolhido como compromisso entre sensibilidade e freqüência analítica.

5.4.7. Seletividade analítica

O comportamento da reação frente às possíveis espécies interferentes foi ainda avaliado empregando-se as soluções descritas no item 3.1.1. Ressalte-se que na reação em foco o 4-aminofenol não se afigura como um interferente em potencial.

Verificou-se que as soluções que continham 2-cresol apresentaram interferência positiva na reação de determinação de catecol com 4-aminofenol, uma vez que esta espécie também reage com o 4-aminofenol com formação de complexos coloridos de indofenol em ambiente alcalino. No entanto, a presença

de catecol concomitantemente com 2-cresol nas amostras é atípica [Tarley; Sagatelli; Kubota, 2006].

Após o estudo dos principais parâmetros que influenciam a reação, um sistema de análises em fluxo empregando MIP para extração de catecol foi empregado.

5.5. Determinação de catecol com 4-aminofenol empregando sistema de análises em fluxo e MIP como extrator em fase sólida.

5.5.1. Influência do comprimento da bobina reacional B₂

Observou-se uma diminuição na magnitude do sinal analítico com o aumento no comprimento da bobina reacional B₂ (Figura 40). Uma possível explicação para este efeito consiste no aumento da dispersão da zona da amostra quando B₂ foi aumentada de 100 para 200 cm. Bobinas menores que 100 cm não foram avaliadas uma vez que testes em sistema de análises em fluxo sem a presença de mini-coluna de MIP relatam a verificação de efeito Schlieren conforme descrito em 5.4.4. Este parâmetro foi então fixado em 100 cm.



Figura 40. Influência do comprimento da bobina reacional B₂ na determinação de catecol empregando MIP. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x10⁻⁵ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.5.2. Influência do volume de amostra

Os resultados obtidos variando-se o volume de amostra introduzido no sistema foram semelhantes àqueles já apresentados no item 5.3.3. De fato, observou-se um aumento em sensibilidade analítica com aumento do volume de amostra injetado no sistema (Figura 41).



Figura 41. Influência do volume de amostra na determinação empregando MIP. As barras referentes aos diferentes volumes de amostra correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 x10⁻⁵ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

No entanto, o volume da amostra não pode ser aumentado indefinidamente, pois maiores volumes comprometeriam a freqüência analítica do sistema proposto. Este foi então fixado em 1600 μL.

5.5.3. Influência da concentração de 4-aminofenol

Com relação à concentração de 4-aminofenol melhoria em sensibilidade foi conseguida empregando-se uma solução de 0,025 mol L⁻¹ (Figura 42). Maiores concentrações não puderam ser avaliadas em virtude da solubilidade do 4-aminofenol.



Figura 42. Influência da concentração de 4-aminofenol na determinação de catecol empregando MIP. As barras referentes às diferentes concentrações de 4-aminofenol correspondem às soluções de 2,00; 4,00; 6,00; 8,00 e 10,0 $\times 10^{-5}$ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.5.4. Influência da natureza do eluente

Relativamente ao estudo da natureza do eluente a ser empregado, alguns critérios como largura de pico à meia altura (PWHP - do inglês peak width at half peak) e magnitude do sinal analítico foram avaliados. Estes critérios foram escolhidos uma vez que PWHP reflete o tempo de eluição do analito pela coluna de MIP, e quanto menor o seu valor, menor o tempo necessário para eluição. Já a magnitude do sinal analítico foi escolhida, pois quando a eluição é feita de maneira efetiva, tem-se um aumento do sinal, o que também reflete o tempo de eluição.

Verificou-se que a melhor solução eluente foi a solução de 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ uma vez que o emprego desta resultou em maior magnitude do sinal analítico (Figura 43) juntamente com a menor largura de pico à meia altura. Em contrapartida, quando água era empregada como eluente, observou-se uma menor magnitude do sinal analítico em conjunto com uma maior PWHP em relação às demais soluções. Pode-se então inferir que a água não é um bom eluente uma vez que o tempo de eluição expresso pela PWHP é relativamente alto.



Figura 43. Influência da natureza do eluente na determinação de catecol empregando MIP. Os números de 1 a 5 correspondem a água (1); 0,1 mol L⁻¹ HOAc (2); 0,1 mol L⁻¹ HCI (3); 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄ (4) e 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ (5). As barras referentes aos diferentes tipos de eluente correspondem às soluções de 4,00 e 8,00 x10⁻⁵ mol L⁻¹ catecol. A = altura de pico em absorbância.

5.5.5. Influência da natureza dos agentes de limpeza

Cinco soluções contendo diferentes agentes de limpeza foram avaliadas conforme descrito no item 4.5.5, sendo que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

			Agentes de limpe	de limpeza	
Solução	Água	Acetonitrila	Acetonitrila	Metanol	Metanol
		2% (v/v) [*]	10% (v/v) [*]	2% (v/v)*	10% (v/v) [*]
6,00x 10 ⁻⁵					
mol L ⁻¹	0,197	0,158	0,005	0,179	0,103
catecol					
6,00x 10 ⁻⁴					
mol L⁻¹	0,092	0,066	0,025	0,094	0,057
2-cresol					
1:10					
(catecol:	0,289	0,291	0,028	0,290	0,161
2-cresol)					
* em água					

Tabela 2. Influência dos agentes de limpeza. Dados indicam os sinais analíticos em absorbância

Tendo como referência para fins de comparação água como agente de limpeza, observou-se um decréscimo de sinal analítico de 20; 97; 9 e 48 % para soluções de 2 e 10% (v/v) de acetonitrila e de metanol respectivamente daquele obtido para uma solução 6.00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ catecol empregando água como agente de limpeza.

Para a solução 6,00 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ 2-cresol o decréscimo foi de 28; 72, 83 e 38 % para soluções de 2 e 10% (v/v) de acetonitrila e 10% (v/v) de metanol. A solução de metanol 2% não diferiu do agente de limpeza de referência. Já para solução mista de catecol: 2-cresol (1:10) apenas as soluções de 10% (v/v) de acetonitrila e de metanol levaram a decréscimos (90 e 44% respectivamente) no sinal analítico relativamente ao agente de referência (água).

Com base nestes resultados e tendo em vista que as soluções de acetonitrila e metanol estudadas não minimizaram a interferência causada pela presença de 2-cresol na reação em foco, água foi empregada como agente de limpeza na continuidade do trabalho. É válido ressaltar ainda que as soluções

estudadas de acetonitrila e metanol interferiram fortemente no desenvolvimento reacional na concentração de 10% (v/v).

5.5.6. Seletividade analítica

A seletividade analítica foi avaliada e os resultados foram análogos aos descritos no item 5.4.7, ou seja, a introdução de uma mini-coluna de MIP não reduziu a interferência apresentada pelas soluções contendo de 2-cresol. Esta interferência se dá nos sítios não específicos do polímero e poderiam ser minimizadas pelo emprego de um agente de limpeza mais apropriado que a água. No entanto soluções empregadas para tal finalidade não se mostraram eficientes na minimização da interferência causada pelo 2-cresol conforme salientado no item 5.5.5.

5.5.7. Aplicação

Estabelecidas as melhores condições para o desenvolvimento reacional, as figuras de mérito do procedimento analítico foram obtidas. A freqüência analítica foi de 10 determinações por hora, os limites de detecção e de quantificação foram estimados como 0,8 e 0,98 10^{-5} mol L⁻¹ respectivamente e a precisão analítica, expressa como DPR, foi de 2,4 % (2,0 x 10^{-5} mol L⁻¹, n= 8).

O método foi linear na faixa de 0,0 a 10,0 x 10^{-5} mol L⁻¹ sendo a curva analítica (Figura 44) representada como y = 0,0361x + 0,0046.

onde: y = altura de pico em absorbância, x = concentração de catecol em 10^{-5} mol L⁻¹ (r > 0,999;n = 6) sendo a sensibilidade analítica para a presente curva de 0,0361 x10⁻⁵ absorbância L⁻¹mol



Figura 44. Curva analítica da determinação espectrofotométrica de catecol com 4aminofenol empregando sistema de análises em fluxo e MIP como extrator em fase sólida. A figura se refere ao sistema de análises por injeção em fluxo indicado na Figura 12. A = altera de pico, em absorbância.

As amostras foram processadas conforme descrito em 4.5.8 e ensaios de adição/ recuperação foram realizados. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos para determinação de catecol com 4-aminofenol em empregando mini-coluna de MIP. Os dados, em 10⁻⁵ mol L⁻¹ catecol, correspondem às estimativas das médias e dos desvios - padrão dos resultados obtidos pelo processamento em triplicata das amostras.

Amostra	Concentração de catecol adicionada	Concentração catecol recuperada	Recuperação %
	0	< LOD	-
Resíduo de indústria	2	1,80 ± 0,15	88,30 ± 7,42
papelella	6	6,10 ± 0,25	101,67 ± 4,21
Águas naturais	0	< LOD	-
А	2	2,05 ± 0,04	102,65 ± 1,82
	6	$6,03 \pm 0,05$	100,21 ± 0,90
	0	< LOD	-
В	2	1,91 ± 0,16	95,63 ± 8,20
	6	5,82 ± 0,09	97,86 ± 0,90
	0	< LOD	-
С	2	$2,08 \pm 0,08$	103,74 ± 1,37
	6	6,09 ± 0,08	101,60 ± 1,37
	0	< LOD	-
D	2	2,03 ± 0,02	101,62 ± 0,90
	6	$6,02 \pm 0,06$	100,36 ± 1,05
	0	< LOD	-
E	2	2,05 ± 0,05	102,58 ± 2,24
	6	5,97 ± 0,15	99,50 ± 2,52
	0	< LOD	-
F	2	$2,02 \pm 0,02$	101,08 ± 0,92
	6	6,01 ± 0,06	100,21 ± 1,04
Medicamento	0	< LOD	-
	2	$2,05 \pm 0,05$	101,08 ± 0,92
	6	$5,94 \pm 0,06$	99,00 ± 1,04
Chá verde	0	1,32± 0,03	-
Α	2	$3,38 \pm 0,05$	$102,5 \pm 0,50$
	6	7,31 ± 0,07	99,67 ± 1,17
	0	< LOD	-
Chá mate	2	$2,06 \pm 0,05$	$103,03 \pm 0,57$
	6	6,17 ± 0,04	102,8 ± 0, 59

LOD = Limite de detecção

As taxas de recuperação do método proposto variaram na faixa de 88,7 a 103,7 % o que indica que o MIP pode ser eficientemente empregado para

determinação de catecol sendo que os compostos presentes nas diferentes amostras não interferiram na determinação do analito.

5.6. Determinação de (L) ácido ascórbico empregando MIP como separador enantiomérico em fase sólida.

5.6.1 Estudos preliminares.

Para o acoplamento da mini-coluna de MIP no sistema de análises em fluxo, algumas modificações no sistema originalmente propostas por Mortatti e colaboradores (1981) precisaram ser realizadas. Devido ao acoplamento da mini-coluna, a vazão da solução transportadora foi reduzida para 1,25 mL min⁻¹ com a finalidade de minimizar a pressão hidrodinâmica do sistema. Experimentos foram então realizados para definição das melhores concentrações de 1,10 fenantrolina (R₁) e de Fe³⁺ (R₃) e para tanto soluções na faixa de 0,13 a 1,00% (m/v) e 25 a 200 mg L⁻¹, foram respectivamente empregadas (Figura 45 e 46).

Quanto a influencia da concentração de 1,10-fenantrolina, diferenças significativas não foram observadas para as diferentes concentrações avaliadas. Visando um menor consumo de reagentes a concentração de 0,13% (m/v) 1,10-fenantrolina foi empregada.



1,10 Fenatrolina (% m/v)

Figura 45. Influência da concentração de 1,10 fenantrolina. As barras referentes às diferentes concentrações de 1,10 fenatrolina correspondem às soluções de 5,00; 10,0; $15,0 e 20,0 \text{ mg } \text{L}^{-1}$ (L) AA. A = altura de pico em absorbância.

Nos estudos envolvendo diferentes concentrações de ferro, foi verificado que, à medida que a concentração do íon Fe³⁺ aumentava ocorria uma redução na magnitude do sinal. Observou-se ainda falta de linearidade quando soluções contendo 25 mg L⁻¹ de Fe(III) eram empregadas. Este comportamento esta relacionado à falta deste reagente no percurso analítico, o que compromete o desenvolvimento reacional. Contrapondo-se a este comportamento, o excesso do íon Fe³⁺, verificado quando concentrações acima de 50 mg L⁻¹ Fe³⁺ são empregadas, acarreta um maior consumo do reagente 1,10 fenantrolina, o que também influencia no desenvolvimento reacional, o que pode ser verificado pela redução na magnitude do sinal analítico. Em virtude disto, a concentração de 50 mg L⁻¹ de Fe(III) foi escolhida para continuidade do trabalho.



Figura 46. Influência da concentração de Fe³⁺. As barras referentes às diferentes concentrações de Fe³⁺ correspondem às soluções de 2,50; 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ L - ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

Após a definição das concentrações de 1,10 fenantrolina e de Fe³⁺ a serem empregadas na determinação de ácido ascórbico, a mini-coluna polimérica foi acoplada em uma das extremidades do injetor-comutador, conforme ilustrado na Figura 14.

5.6.2. Influência da solução matriz

A avaliação do efeito da solução matriz sobre as interações AA-MIP foram realizadas injetando-se três soluções-padrão (20,0; 40,0 e 60,0 mg L⁻¹ L- AA) com diferentes proporções de solvente (0; 30; 50; 70 % v/v DMSO). Os resultados obtidos tanto para o MIP como para o NIP foram avaliados, bem como a diferença entre eles.



Figura 47. Influência da solução matriz. As barras referentes às diferentes concentrações de DMSO correspondem às soluções de 20,0; 40,0 e 60,0 mg L⁻¹ L -ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

Analisando-se dos resultados contidos na Figura 47, pode-se verificar que, de uma maneira geral, o aumento na concentração de DMSO ocasionou uma redução nos sinais analíticos. Ao mesmo tempo, observou-se também uma maior diferença entre os sinais analíticos do MIP e do NIP. Esta diferença está associada à diminuição na polaridade da solução matriz, causada pelo aumento da proporção de DMSO nas soluções avaliadas, o que favoreceu a formação de interações específicas entre o analito e o MIP, diminuindo assim, as interações não específicas que acontecem entre o analito e o NIP. De fato, o MIP apresenta uma elevada afinidade pelo analito quando este está na presença do mesmo solvente empregado na síntese. Quando água é empregada como solução matriz, há formação de interações específicas e não específicas, sendo que grande parte do sinal analítico está relacionada à interações não específicas entre o analito e o MIP. Nesta condição, não há grandes diferenças entre os sinais obtidos pelo MIP e pelo NIP sendo este aspecto também verificado por Muldoon e Stanker para um MIP de atrazina [Muldoon; Stanker, 1997]. Observa-se ainda que, para uma solução 50 % (v/v) DMSO, a diferença entre os sinais analíticos do MIP e do NIP para um solução contendo 60 mg L⁻¹ de AA foi de 37,5 %.

Ressalte-se que as interações entre AA - NIP são em sua maioria não específicas, uma vez que a síntese deste é realizada na ausência do analito e por esta razão a mensuração do sinal analítico referente a este polímero pode expressar a quantidade de interações não-especificas que estão sendo formadas. Salienta-se ainda que a solução de 70 % (v/v) DMSO não pode ser empregada, pois ocasionava grandes variações na linha base (efeito Schlieren).

Como as soluções 50 % (v/v) DMSO proporcionaram uma diferença de apenas 12,5% entre os valores de NIP e MIP em relação a solução 30% (v/v) DMSO, e visando uma diminuição no consumo de reagentes, esta ultima concentração foi então empregada para continuidade dos experimentos. Nesta condição a diferença média entre os valores obtidos pelo MIP e pelo NIP foi de 25%.

5.6.3. Influência da natureza do eluente

O eluente a ser empregado na determinação de L-AA foi escolhido levando-se em consideração a magnitude do sinal analítico bem como a largura referente à meia altura do sinal. As soluções 0,1 mol L⁻¹ HCl, 0,1 mol L⁻¹, HNO₃ e 0,1 mol L⁻¹ de HOAc não apresentaram diferenças significativas em largura de pico à meia altura; no entanto, a solução de ácido acético foi escolhida por apresentar maior altura do sinal analítico (Figura 48), o que reflete melhor eficiência de eluição.



Figura 48. Influência da natureza do eluente na determinação de AA. Os números de 1 a 4 correspondem a água; 0,1 mol L⁻¹ HCl; 0,1 mol L⁻¹ HNO₃; 0,1 mol L⁻¹ HOAc. As barras referentes aos diferentes tipos de eluente correspondem a 20,0; 40,0, 60,0 e 80,0 mg L⁻¹ L -ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

Após a definição do eluente, o sistema de análises por injeção em fluxo foi modificado visando uma maior simplicidade operacional. Uma solução-tampão 0,1 mol L⁻¹ HOAc/ Ac foi avaliada como eluente no lugar da solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido acético. A solução-tampão não apresentou diferenças significativas em relação à solução de ácido acético empregada inicialmente como eluente. Esta alteração permitiu a redução de um canal analítico, simplificando assim o sistema de análises por injeção em fluxo. Um novo sistema foi então arquitetado e os estudos que se seguem são referentes ao diagrama de fluxos ilustrado na figura 15.

5.6.4. Influência do agente de limpeza

Observou-se que todas as soluções envolvidas causavam instabilidades pronunciadas na linha base, interferindo na mensuração de AA pelo método proposto com exceção de água. Uma vez que esta se constitui em um eluente moderado, conforme os resultados ilustrados na Figura 48 do item 5.6.3, esta foi empregada como solução de limpeza.

5.6.5. Influência do volume de amostra.

Analogamente aos experimentos conduzidos com o MIP de catecol (itens 5.3.4 e 5.5.2) observou-se um aumento na magnitude do sinal analítico com aumento no volume de amostra que passava pela mini-coluna polimérica. No entanto, perda em linearidade foi observada quando um volume de 1600 μ L era empregado (Figura 49). Tendo em vista o compromisso entre sensibilidade, linearidade da curva analítica e freqüência analítica o volume de 800 μ L foi escolhido para continuidade dos estudos.



Figura 49. Influência do volume de amostra na determinação de AA. As barras referentes aos diferentes volumes de amostra correspondem a 20,0; 40,0; 60,0 e 80,00 mg L⁻¹ L-ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

5.6.6. Influência da concentração dos reagentes

A concentração de Fe^{3+} foi reavaliada nestas condições e uma solução 25 mg L⁻¹ Fe^{3+} foi selecionada como solução de trabalho, uma vez que os resultados

obtidos para esta solução não diferiram significativamente daqueles obtidos para uma solução 50 mg L⁻¹ Fe³⁺ (Figura 50).



Figura 50. Influência da concentração de Fe³⁺ na determinação de AA empregando MIP. As barras referentes às diferentes concentrações de Fe³⁺ correspondem a 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ L-ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

Quanto à concentração de 1,10 fenantrolina, um pequeno aumento no sinal analítico foi observado quando a concentração deste reagente foi de 0,03 %(m/v) (Figura 51); no entanto, a repetibilidade dos sinais analíticos foi comprometida (r.s.d = 2%, n = 3) Em virtude disto, a concentração 0,06 % (m/v) foi selecionada.



1,10-Fenantrolina (%, m/v)

Figura 51. Influência da concentração de 1,10 fenantrolina na determinação de AA empregando MIP. As barras referentes às diferentes concentrações de Fe^{3+} correspondem a de 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ L-ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

5.6.7. Influência do comprimento da bobina reacional

Quanto à variação deste parâmetro, diferenças significativas não foram verificadas para comprimentos de bobina maiores que 100 cm (Figura 52). De fato, a reação em foco apresenta uma cinética de reção relativamente rápida, o que explica o fato de comprimentos maiores de bobina reacional não serem requeridas. Quanto à possível dispersão da zona de amostra, observou-se que esta não foi evidenciada no presente estudo. A bobina de 100 cm foi então empregada para consecução da metodologia proposta.



Comprimento da bobina (cm)

Figura 52. Influência do comprimento da bobina reacional B_2 na determinação de AA empregando MIP. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ L-ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

5.6.8. Capacidade de separação enantiomérica do MIP

Para se avaliar a capacidade de separação enatiomérica de AA, duas curvas analíticas referentes a L-AA e a D-AA foram obtidas (Figura 53) sendo representadas como y = 0,0332x + 0,0048 (r = 0,9991, n=3) e y = 0,0406x - 0,016 (r = 0,9982, n=3) respectivamente.

onde: y = altura de pico em absorbância, x = concentração de AA em mg L^{-1} e r = coeficiente de correlação linear.

Soluções com diferentes concentrações de L-AA e D-AA foram ainda processadas.



Figura 53. Curvas analíticas para L-AA e D-AA. A figura se refere ao sistema de análises por injeção em fluxo da Figura 14. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem 2,50; 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ L e D ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

Nota-se que há pouca diferença entre os sinais apresentados pelos enantiômeros do AA. Uma pequena discriminação pode ser verificada para concentrações de AA acima de 10 mg L⁻¹. Isto também pode ser observado pela análise dos resultados obtidos pelo processamento das diferentes soluções contendo L-AA e D-AA, os quais são apresentandos na Tabela 4.

Tabela 4. Sinais analíticos referentes a soluções L-AA e D-AA com concentrações diferentes dos isômeros. Sinais analíticos em absorbância e concentrações em mg L⁻¹

Soluções	Sinais analíticos	
L-AA + D-AA		
2,50 + 2,50	0,165	
2,50 + 5,00	0,272	
5,00 + 2,50	0,273	
10,0 + 5,00	0,545	
5,00 + 10,0	0,589	

No entanto, estudos mais aprofundados quanto ao tipo de reagentes empregados bem como uma variação na proporção dos mesmos e nas condições de síntese do MIP podem levar a melhorias na capacidade de separação enantiomérica pelo polímero.

Uma vez que a separação dos estereoisômeros do AA não foi possível e tendo em vista a toxicidade do DMSO bem como a obtenção de uma maior simplicidade metodologia, optou-se por empregar água como solução matriz para continuidade dos experimentos.

5.6.9. Tempo de limpeza da coluna

Quando o tempo de limpeza da coluna foi variado observou-se uma redução do sinal analítico de AA e uma maior diferença entre os sinais resultantes obtidos empregando-se MIP e NIP (ver item 5.6.2). Relativamente aos tempos de 2,0; 2,5 e 3,0 min, a diferença entre os sinais do MIP e do NIP foram de 45; 56 e 66 % para uma solução contendo 5,00 L-AA e de 53; 60 e 65% para uma solução 15,0 mg L⁻¹ de L-AA, respectivamente. Visando uma maior freqüência analítica, o tempo de 2,5 min foi empregado para continuidade do trabalho. É importante ressaltar que o aumento no tempo de limpeza da coluna fez com que houvesse uma diminuição na quantidade de interações não específicas entre o analito e o MIP, o que pode ser evidenciado pelo aumento na diferença entre os sinais analíticos do MIP e do NIP. Isto pode estar relacionado à co-eluição do AA uma vez que a solução de limpeza empregada também atua como eluente fraco.

5.6.10. Seletividade analítica

Relativamente à avaliação da seletividade analítica, nenhuma das soluções empregadas apresentou interferência direta na reação para determinação de AA.

Observou-se, porém que as soluções 0,025% (m/v) de sorbitol e aquelas contendo 0,25% (m/v) de polietilenoglicol e 0,25% (m/v) de ácido cítrico interferiram na retenção de ácido ascórbico pelo MIP. Relativamente às moléculas de sorbitol e polietilenoglicol (Figura 54) estes apresentam grupos de ligação capazes de formar pontes de hidrogênio com os sítios do MIP. Desta forma, estes compostos inibem a retenção de AA pelo polímero por um processo de competição, uma vez que seus grupos funcionais competem com os grupos presentes na molécula de AA pelos sítios de ligação do MIP. Analogamente, o ácido cítrico, por apresentar uma alta polaridade, desempenha papel semelhante ao descrito para sorbitol e para polietilenoglicol, sendo este mesmo comportamento também verificado em presença de adoçantes artificiais como ciclamato de sódio, aspartame e acelsulfame-k (Figura 54)



Figura 54. Estruturas moleculares dos principais interferentes na determinação de AA.

Com o intuito de se minimizar as interferências causadas por estes compostos, uma segunda mini-coluna contendo 30 mg de NIP foi acoplada ao sistema em uma terceira seção do injetor-comutador. Nesta configuração, a amostra primeiramente passava pela mini-coluna de NIP e depois preenchia a alça de amostragem. Quando a amostra era injetada, esta era transportada pelo agente de limpeza para mini-coluna de MIP onde o AA era retido. Neste momento uma solução 0,1 mol L⁻¹ HOAc passava pela coluna de NIP eluíndo as espécies químicas aderidas na etapa anterior. Esta estratégia, porém aumentou excessivamente a pressão hidrodinâmica, o que ocasionou interrupções contínuas nas junções que ligavam a mini-coluna de NIP e a alça de amostragem ao injetor.

Visto que os interferentes presentes nas amostras de suplementos vitamínicos não puderam ser superados, o procedimento então não poderia ser aplicado diretamente a suplementos vitamínicos. Para avaliação das principais características analíticas, empregaram-se então amostras de sucos de frutas naturais.

5.6.11. Aplicação

Dimensionados os principais parâmetros envolvidos na determinação espectrofotométrica de AA empregando MIP como separador enantiomérico em fase sólida, as amostra foram processadas. Os resultados encontram-se na tabela 5, a qual fornece também as estimativas de desvios-padrão dos resultados baseadas, em três repetições.

147

Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de AA empregando MIP como separador enantiomérico. Os dados, em mg L⁻¹ AA, são valores estimados para as médias e os desvios-padrão dos resultados obtidos em triplicata com o sistema proposto (Figura 14).

Amostra	Método proposto (mg L ⁻¹)	Método comparativo (mg L ⁻¹)
Laranja Pera	2,90±0,03	37,7±0,4
Laranja Lima	4,13±0,04	37,7±0,4
Laranja baiana	5,28±0,02	51,6±0,4
Limão	0,37±0,05	16,8±0,4
Ponkan	2,68±0,01	21,6±0,4

Observa-se que os resultados obtidos pelo médodo proposto diferiram significativamente daqueles apresentados pelo método oficial. Esta diferença provavelmente está associada ao efeito de matriz. Quando soluções de amostra foram diluidas dez e cinco vezes, as concentrações obtidas não correspondiam àquelas teoricamente calculadas para as mesmas. De fato, as concentrações obtidas pelo método proposto, *e.g* para uma amostra de ponkan foram de 0,93 e 1,5 mg L⁻¹ AA quando os esperado era de 0,27 e 0,54 mg L⁻¹ AA respectivamente para diluições de 10 e 5 vezes.

A sensibilidade analítica do método proposto foi estimada e para tanto, uma curva analítica foi obtida (Figura 54), sendo esta representada como:

y = 0.0453x - 0.0025

onde: y = altura de pico expressa em absorbância, x = concentração de AA em mg L^{-1} , (r > 0,9997;n = 4).



Figura 55. Curva analítica da determinação espectrofotométrica de AA empregando MIP como separador enantiomérico em fase sólida. A figura se refere ao sistema de análises por injeção em fluxo da Figura 15. As barras referentes às diferentes bobinas reacionais correspondem 2,50; 5,00; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹ ácido ascórbico. A = altura de pico em absorbância.

O limite de detecção e de quantificação do método proposto foram estimados como 0,72 e 1,06 mg L⁻¹ segundo cálculo baseado no intervalo de confiança da curva analítica [Ribeiro et al., 2008] e a freqüência analítica foi de 15 determinações por hora.

5.7. Determinação espectrofotométrica de atrazina empregando sistemas de análises em fluxo multicomutado e MIP- SPE.

5.7.1. Influência da natureza do eluente

A avaliação da solução eluente a ser empregada na metodologia de SPE para retirada do analito aderido ao MIP é de extrema importância uma vez que limitação na etapa de eluição pode gerar falsos resultados no processamento das amostras. Os eluentes avaliados no presente estudo encontram-se descritos no item 4.7.2. Todos os eluentes empregados apresentam como característica comum o fato de serem mais polares e próticos do que o solvente empregado na síntese do MIP. No entanto, a avaliação deste parâmetro não foi conclusiva, uma vez que a atrazina não permanecia retida no MIP.

Segundo Matsui e colaboradores (1995), a adição de água a solventes ou mesmo o seu emprego como eluente pode interferir na formação de pontes de hidrogênio, as quais são a base para a interação da atrazina ao MIP. Os autores relataram que o aumento na quantidade de água causava um significante decréscimo na retenção de atrazina ao MIP e que 5% (v/v) de água no eluente era suficiente para cancelar a capacidade de retenção do polímero. O ácido acético, por sua vez, tem sido algumas vezes empregado como eluente; no entanto o seu emprego foi inviabilizado pela sua capacidade de absorção na região do ultravioleta, fator este que interferia na determinação de atrazina a qual era realizada na região espectral entre 220 e 260 nm. Metanol foi então empregado, porém, problemas associados à retenção do analito, os quais são descritos no item que segue, limitaram a consecução deste estudo.

Limitações quanto ao emprego de sistemas de análises em fluxo com solventes orgânicos foram verificadas através da deformação nos tubos de bombeamento, comprometimento das confluências de acrílico e falta de miscibilidade entre os solventes, o que acarretava efeito Schlieren pronunciado.

5.7.2. Influência da solução matriz

Na síntese de MIPs, as interações analito-MIP são influenciadas pela escolha do solvente a ser empregado na etapa de concentração da amostra na

150

coluna. Quando estas interações ocorrem por meio de forças eletrostáticas e por formação de pontes de hidrogênio, como no caso do MIP confeccionado para atrazina, solventes apolares com constante dielétrica baixa, tais como *e.g.* clorofórmio, oferecem um meio adequado para estabilizar as referidas interações de maneira mais efetiva.

Quando clorofórmio e acetato de etila foram empregados como meio para o preparo das soluções-padrão, deformações nos tubos de bombeamento e junções acrílicas foram observadas, comprometendo o emprego destes solventes. A formação de um precipitado branco em linha foi ainda observada quando acetato de etila era empregado em conjunto com outros solventes como metanol e acetonitrila. Visando contornar estas limitações, acetonitrila foi avaliada como uma possível solução matricial. No entanto, nenhum sinal analítico referente à determinação de atrazina foi observado. Segundo Farrington e colaboradores, (2006) a não retenção de atrazina ao MIP quando esta se encontra em meio a um solvente com constante dielétrica alta, como é o caso da acetonitrila, está relacionada ao fato de estes solventes atuarem como eluentes em potencial, uma vez que o MIP foi sintetizado em meio a um solvente apolar com constante dielétrica baixa e tem maior afinidade em se religar ao analito quando as mesmas condições de síntese são empregadas, conforme salientado acima [Farrington; Magner; Regan, 2006].

5.7.2. Influência do volume de amostra

Tentativas no sentido de se obter respostas analíticas foram realizadas e para tanto, um intervalo de tempo de amostragem foi variado 1 a 5 min, o que

151

equivale a volumes de 2,0 a 10,0 mL das soluções-padrão. Nenhum resultado, porém foi observado.

Tendo em vista todas estas limitações, a maioria de caráter técnico, esta vertente da Tese não pode ser concluída.

6. CONCLUSÕES

Os procedimentos automatizados para a determinação de catecol empregando MIP como extrator para separação em fase sólida se mostraram viáveis. Em sua versão atual, os sistemas permitem que 12 soluções sejam processadas por hora, fornecendo resultados altamente repetitivos na faixa entre 2,00 e 10,0 x 10^{-4} mol L⁻¹ e 2,00 e 10,0 x 10^{-5} mol L⁻¹ catecol. Derivas de linha base não foram observadas em ambos os sistemas propostos.

No entanto, o emprego de MIP não elimina totalmente a interferência causada por matrizes complexas, uma vez que estas causam interferências não específicas nos MIPs.

Quanto à síntese e emprego de MIPs visando à separação enantiomérica de L- AA qualquer tipo de conclusão é prematura. MIPs com baixa capacidade de separação enantiomêrica podem ser formados uma vez que este fator esta intimamente ligado às proporções e características de cada reagente envolvido no processo de síntese. Ainda, deve ser considerado o fato do D-AA ser facilmente convertido em L-AA sobre condições oxidantes. Um estudo mais refinado das condições de síntese bem como dos reagentes envolvidos bem como, o emprego de outro iniciador radicalar que permita a realização da síntese sob temperaturas mais brandas deve ser realizado.

Cabe ressaltar, no entanto que a síntese de MIP para ácido ascórbico é inédita e o MIP aqui sintetizado apresentou boa eficiência na retenção de ambas as formas de AA com limite de detecção de 0,76 mg L⁻¹. O sistema apresenta uma freqüência analítica de 15 determinações por hora e derivas na linha de base foram menores que 4% durante um período de operação de 8 horas.

Quanto à determinação de atrazina empregando MIP como extrator em fase sólida pode-se concluir que as limitações quanto ao emprego de solventes orgânicos em sistemas de análises em fluxo prejudicou a avaliação do MIP. Ainda a hipótese do comprometimento na formação do polímero resultando num MIP com pouca afinidade pela atrazina não deve ser descartarda.

Quando MIPs são implementados em sistemas de análises por injeção em fluxo como extratores sólidos, algumas observações devem ser ressaltadas.

Uma das principais limitações apresentadas no emprego de MIPs está atrelada às suas características. Como já ressaltado, os MIPs se ligam de maneira mais eficiente, ou seja, tem uma maior afinidade pela molécula molde quando esta se encontra num ambiente igual ou muito próximo àquele empregado na síntese [Martín-Esteban, 2001]. Como a polimerização dos MIPs é, em grande parte dos trabalhos, realizada em presença de solventes apolares e com baixa constante dielétrica, o emprego destes em etapas futuras para re-ligação da molécula molde é requerida para obtenção de uma melhor seletividade. Segundo Tarley e colaboradores (2005) um processo de extração e/ ou concentração de amostras aquosas num MIP preparado em solvente apolar, deverá exibir menor seletividade pela espécie de interresse [Tarley; Sotomayor; Kubota, 2005] que outro empregando moléculas em ambientes apolares. De fato, em amostras aquosas, o bom desempenho dos MIPs só ocorre quando a interação do analito com a cavidade do MIP se dá, predominantemente, por meio de interações hidrofóbicas, as quais devem prevalecer sobre as interações iônicas. Caso contrário, as moléculas de água ou de outros solventes polares do meio podem impedir, por meio de um efeito competitivo, a retenção dos analitos na cavidade do MIP [Baggiani et al., 2001]

154

No entanto, o uso de solventes orgânicos em sistemas de análises em fluxo requer uma série de cuidados. Os tubos de bombeamento e de transmissão não devem interagir com estes solventes, ou seja, devem ser confeccionados de materiais resistentes e quimicamente inertes que não se deformem com o uso. Ainda, as conexões como confluências e junções também devem apresentar resistência química e física a solventes orgânicos, bem como o módulo de injeção e cela de fluxo. A pressão hidrodinâmica no sistema pode ainda ser um fator limitante quando do acoplamento da coluna polimérica. Um aumento excessivo da pressão pode comprometer a analise devido à ruptura nas conexões. A formação de bolhas de ar no percurso analítico causado pelo emprego de solventes voláteis também pode influenciar as medidas principalmente em sistemas acoplados a espectrofotômetros.

Outro aspecto relevante diz respeito às condições de síntese, escolha dos reagentes e do analito (molécula molde). Estas devem ser criteriosamente avaliadas e escolhidas uma vez que a eficiência do processo de separação/ concentração, bem como a seletividade apresentada pelo MIP são diretamente influenciadas por elas.

Quanto à seletividade apresentada pelos MIPs, estas podem ser facilmente contestadas. Na verdade os polímeros apresentam apenas uma maior afinidade pela molécula molde e isto não impede que outras moléculas similares a esta se liguem a ele através de ligações não específicas. A minimização destas interferências, no entanto, não se dá de maneira tão simples como alguns autores afirmam. De fato, para minimizar estas interferências, uma série de experimentos envolvendo diferentes soluções de limpeza e/ ou soluções matrizes tem que ser realizado. Em alguns casos, torna-se necessário o emprego de mais de uma solução de limpeza ou ainda o acoplamento de uma segunda coluna para retenção dos interferentes. O tamanho e geometria das partículas também interferem no desempenho dos MIPs. Caminhos preferenciais podem ser formados quando o empacotamento da coluna não se dá de maneira efetiva devido à geometria irregular das partículas após a maceração do bloco polimérico. Ainda no processo de obtenção de partículas, pela maceração mecânica do bloco polímero, tem-se que grande parte dos sítios ativos são destruídos neste processo sendo que apenas 15% do total de sítios de ligação formados permanecem intactos. Este fator contribui para uma diminuição na capacidade de retenção do MIP e consequentemente na sua seletividade diminuindo o desempenho do mesmo.

Finalmente, levando-se em conta as limitações e pontos favoráveis salientados neste trabalho de tese, pode-se concluir que, para se empregar MIPs como extratores em fase sólida em sistemas de analises em fluxo avaliações criteriosas devem ser feitas quanto à escolha do analito (molécula molde), condições de síntese e solventes empregados. A disponibilidade de materiais específicos para trabalho com solventes orgânicos também deve ser levada em consideração quando do emprego de MIPs. Superadas as limitações aqui enfatizadas, a união de sistemas de análises em fluxo e polímeros molecularmente impressos se afigura promissora. Esforços no sentido de sintetizar MIPs em solventes polares ou mesmo em ambientes aquosos, bem como metodologias de polimerização que forneçam partículas de tamanhos mais regulares favorecendo assim o empacotamento e emprego dos MIPs estão sendo realizados, o que futuramente deverá viabilizar o emprego mais efetivo de MIPs e o seu acoplamento em sistemas de análises em fluxo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Atrazina. Brasília.(ÍndiceMonográfico,A14).Disponívelem:http://anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/a14.pdf. Acesso:07 mar. 2008.

ALEXANDER, C.; ADERSSON, H.S.; ANDERSSON, L.I.; ANSSEL, R.J.; KIRSCH, N.; NICHOLLS, I.A.; O'MAHONY, J. WHITCOMBE, M.J. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. **Journal of Molecular Recognition**, Weinheim, v. 19, p. 106-180, 2006.

ALEXIEV, A.A.; ANGELOVA, M.G. Determination of subnanogram amounts of cobalt through its catalytic action on oxidation of catechol by hydrogen peroxide. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 2, p. 187-194, 1980.

AL-KINDY, S.; BADIA, R.; DIAZ-GARCIA, M.E. Fluorimetric monitoring of molecular imprinted polymer recognition events for aluminum. **Analytical Letters**, New York, v. 35, p. 1763–1774, 2002.

ANDERSSON, L.I. Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers. **The Analyst**, Cambridge, v. 125, p. 1515-1517, 2000.

ANDERSSON, L.I.; MOSBACH, K. Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 516, p. 313-322, 1990.

ANDERSSON, H.S.; NICHOLLS, I.A. A historical perspective of the development of molecular imprinting. In: SELLERGREN, B. (Ed.). **Molecularly imprinted polymers**. Mans-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2001. cap. 1, p. 1-19.

ANSELL, R.J. Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 1809-1835, 2005.
ANTHEMIDIS, A.N.; ZACHARIADIS, G.A.; STRATIS, J.A. On-line solid phase extraction system using PTFE packed column for the flame atomic absorption spectrometric determination of copper in water samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 54, p. 935-942, 2001.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. Cap 45 p. 16 -17.

ARRUDA, M.A.Z. (Ed). **Trends in sample preparation**. New York: Nova Science Publishers, 2007. cap. 1-9.

BAGGIANI, C.; ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; TOZZI, C. Binding properties of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-imprinted polymers prepared with different molar ratios between template and functional monomer. **Talanta**, Amsterdam, v. 62, p. 1029-1034, 2004.

BAGGIANI, C.; GIOVANNOLI, C.; ANFOSSI, L.; TOZZI, C. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 938, p. 35-44, 2001.

BIRADAR, D.P.; RAYBURN, A.L. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 24, p. 1222-1225, 1995.

BJARNASON, B.; CHIMUKA, L.; RAMSTRÖM, O. On-line solid-phase extraction of triazine herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 71, p. 2152-2156, 1999.

BOYD, R.A. Herbicides and herbicide degradates in shallow groundwater and the Cedar River near a municipal well field, Cedar Rapids, Iowa. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 248, p. 241-253, 2000.

BRAVO, J.C.; FERNANDEZ, P.; DURAND, J.S. Flow injection fluorimetric determination of β -estradiol using a molecularly imprinted polymer, **The Analyst**, Cambridge, v. 130, p. 1404–1409, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. Resolução nº. 357, de 17 de março de 2005. Classificação das águas doces, salobras e salinas do território nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRETON, F.; ROUILLON, R.; PILETSKA, E.V.; KARIM, K.; GUERREIRO, A.; CHIANELLA, I.; PILETSKY, S.A. Virtual imprinting as a tool to design efficient MIPs for photosynthesis-inhibiting herbicides. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 22, p. 1948-1954, 2007.

BRITISH PHARMACOPEIA. 5. ed. London: Her Majesty's Stationary Office, 1988. v.2, p.901.

CACHO, C.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C. Characterization and quality assessment of binding sites on a propazineimprinted polymer prepared by precipitation polymerisation. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 802, p. 347-353, 2004.

CACHO, C.; TURIEL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; PÉREZ-CONDE, C.; CÁMARA, C. Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 376, p. 491-496, 2003.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta B**, Amsterdam, v. 58, p. 1177-1233, 2003.

CERDA, V.; ESTELA, J.M. Automatic pre-concentration and treatment for the analysis of environmental samples using non-chromatographic flow techniques. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, London, v. 85, p. 231-253, 2005.

CEREJEIRA, M.J.; VIANA, P.; BATISTA, S.; PEREIRA, T.; SILVA, E.; VALÉRIO, M.J.; SILVA, A.; FERREIRA, M.; SILVA-FERNANDES, A.M. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, Amsterdam, v. 37, p. 1055-1063, 2003.

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

D'AGOSTINO, G.; ALBERTI, G.; BIESUZ, R.; PESAVENTO, M. Potentiometric sensor for atrazine based on a molecular imprinted membrane. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 22, p. 145-152, 2006.

DAVIES, M.P.; DE BIASI, V.; PERRETT, D. Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 504, p. 7-14, 2004.

DEAN, J.R.; WADE, G.; BARNABAS, I.J. Determination of triazine herbicides in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 733, p. 295-335, 1996.

de JESUS, D.S.; CASELLA, R.J.; FERREIRA, S.L.C.; COSTA, A.C.S.; de CARVALHO, M.S.; SANTELLI, R.E. Polyurethane foam as a sorbent for continuous flow analysis: Preconcentration and spectrophotometric determination of zinc in biological materials. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 366, p. 263-269, 1998.

de PRADA, A.G.V; MARTINEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, A.J.; PINGARRON, J.M. Solid-phase molecularly imprinted on-line preconcentration and voltammetric determination of sulfamethazine in milk. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 539, p. 125-132, 2005.

DICKEY, F.H. The preparation of specific adsorbents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 35, p. 227-229, 1949.

dos SANTOS, L.B.O. Desenvolvimento de metodologia para determinação de resíduos de atrazina em solos e águas naturais empregando técnicas eletroanalíticas. 2006. 143 f. Tese (Doutorado em Química Analítica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DRESSLER, M. Extraction of trace amounts of organic-compounds from water with porous organic polymers. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 165, p. 167-206, 1979.

DU, J.; SHEN, L.; LU, J. Flow injection chemiluminescence determination of epinephrine using epinephrine-imprinted polymer as recognition material. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 489, p. 183-189, 2003.

EBARVIA, B.S.; BINAG, C.A.; SEVILLA III, F. Biomimetic piezoelectric quartz sensor for caffeine based on a molecularly imprinted polymer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, p. 1331-1337, 2004.

EBARVIA, B.S.; BINAG, C.A.; SEVILLA III, F. Piezoelectric quartz sensor for caffeine based on molecularly imprinted polymethacrylic acid. **Sensors and Actuators B**, Amsterdam, v. 107, p. 782-790, 2005.

EBARVIA, B.S.; CABANILLA, S.; SEVILLA III, F. Biomimetic properties and surface studies of a piezoelectric caffeine sensor based on electrosynthesized polypyrrole. **Talanta**, Amsterdam, v. 66, p. 145-152, 2005.

EKBERG, B.; MOSBACH, K. Molecular imprinting: A technique for producing specific separation materials. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 92-96, 1989.

EŠKINJA, I.; GRABARIĆ, Z.; GRABARIĆ, B.S. Monitoring of pyrocatechol indoor air pollution. **Atmospheric Environment**, Amsterdam, v. 29, p. 1165-1170, 1995.

FANG, Z.L. Flow Injection separation and preconcentration. Weinheim: VCH, 1993. cap. 1, p.10.

FANG, Z.L. Trends of flow injection sample pretreatment approaching the new millennium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 400, p. 233-247, 1999.

FERRER, I.; LANZA, F.; TOLOKAN, A.; HORVATH, V.; SELLERGREN, B.; HORVAI, G.; BARCELÓ, D. Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides from natural waters and sediment samples using terbuthylazine molecularly imprinted polymers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, p. 3934-3941, 2000.

FIDLER, M.C.; DAVIDSSON, L.; ZEDER, C.; HURRELL, R.F. Erythorbi acid is a potent enhancer of nonheme-iron absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Davis, v. 79, p. 99-102, 2004.

FIGUEIREDO, E.C.; TARLEY, C.R.T.; KUBOTA, L.T.; RATH, S.; ARRUDA, M.A.Z. On-line molecularly imprinted solid phase extraction for the selective spectrophotometric determination of catechol. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 85, p. 290-296, 2007.

FIREMAN-SHORESH, S.; AVNIR, D.; MARX, S. General method for chiral imprinting of sol-gel thin films exhibiting enantioselectivity. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 15, p. 3607-3613, 2003.

FRIEDMANN, A.S. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. **Reproductive Toxicology**, Amsterdam, v. 16, p. 275-279, 2002.

GARBELLINI, G.S.; PEDROSA, V.A.; SALAZAR-BANDA, G.R.; AVACA, L.A. Metodologias eletroanalíticas para determinação de herbicidas triazínicos por voltametria de onda quadrada e técnicas de deconvolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 2025-2034, 2007.

GUARDIA, L.; BADIA, R.; DIAZ-GARCIA, M.E. Molecular imprinted ormosils for nafcillin recognition by room temperature phosphorescence optosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 21, p. 1822-1829, 2006.

GUARDIA, L.; BADÍA, R.; DÍAZ-GARCÍA, R. Molecularly imprinted sol-gel nafcillin determination in milk-based products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 566-570, 2007.

GUIOCHON, G.A.; BEAVER, L.A. Progress and future of instrumental analytical chemistry applied to the environment. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 524, p. 1-14, 2004.

HAGINAKA, J.; KAGAWA, C. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for dchlorpheniramine - Evaluation of retention and molecular recognition properties in an aqueous mobile phase. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 948, p. 77-84, 2002.

HANTASH, J.; BARTLETT, A.; OLDFIELD, P.; DENES, G.; O'RIELLY, R.; DAVID, F. Application of an in-line imprinted polymer column in a potentiometric flowinjection chemical sensor to the determination of the carbamate pesticide carbaryl in complex biological matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 351-357, 2007.

HAUSER, P.C.; LITTEN, J.C. Flow-injection analysis with bulk extraction based optical sensor membranes. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 294, p. 49-56, 1994.

HAUPT, K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. **The Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 747-756, 2001.

HAUPT, K.; MOSBACH, K. Molecularly imprinted polymers in chemical and biological sensing, **Biochemical Society Transactions**, London, v. 27, p. 344-350, 1999.

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 Biochemical and biophysical methods**, Amsterdan, v.70, p. 133-150, 2007

HE, C.; ZHANG, Z.; HE, D.; XIONG, Y. Chemiluminescence determination of metformin based on hydroxyl radical reaction and molecularly imprinted polymer on-line enrichment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 385, p. 128-133, 2006a.

HE, D.; ZHANG, Z.; ZHOU, H.; HUANG, Y. Micro flow sensor on a chip for the determination of terbutaline in human serum based on chemiluminescence and a molecularly imprinted polymer. **Talanta**, Amsterdam, v. 69, p. 1215-1220, 2006.

HE, Y.; LU, J.; ZHANG, H.; DU, J. Molecular imprinting-chemiluminescence determination of norfloxacin using a norfloxacin-imprinted polymer as the recognition material. **Microchimica Acta**, Amsterdam, v. 149, p. 239-244, 2005.

HENRY, O.Y.F.; CULLEN, D.C.; PILETSKY, S.A. Optical interrogation of molecularly imprintes polymers and development of MIP sensors: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, p. 947-956, 2005.

HILT, J.Z.; BYRNE, M.E. Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 1599-1620, 2004.

HU, X.; HU, Y.; LI, G. Preparation and characterization of prometryn molecularly imprinted solid-phase microextraction fibers. **Analytical Letters**, New York, v. 40, p. 645-660, 2007.

HUANG, S.C.; LEE, G.B.; CHIEN, F.C.; CHEN, S.J.; CEHN, W.J.; YANG, M.C. A microfluidic system with integrated molecular imprinting polymer films for surface plamon resonance detection. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, Bristol, v. 16, p. 1251-1257, 2006.

HWANG, C.; LEE, W. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 962, p. 69-78, 2002.

JAVARONI, R.C.A.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de canade-açucar. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, p. 58-64, 1999.

JAGETIA, G.C.; ARUNA, R. Hydroquinone increases the frequency of micronuclei in a dose-dependent manner in mouse bone marrow. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 205-213, 1997.

JENKINS, A.L.; YIN, RAY.; JENSEN, J. Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water. **The Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 798-802, 2001.

KANDIMALLA, V.B.; JU, H. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse application in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 380, p. 587-605, 2004.

KARIM, K.; BRETON, F.; ROUILLON, R.; PILETSKA, E.V.; GUERREIRO, A.; CHIANELLA, I.; PILETSKY, S.A. How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 1795-1808, 2005.

KATZ, A.; DAVIS, M.E. Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers. **Macromolecules**, Washington, v. 32, p. 4113-4121, 1999.

KEIL, O.; DAHMEN, J.; VOLMER, D.A. Automated matrix separation and preconcentration for the trace level determination of metal impurities in ultrapure inorganic salts by high-resolution ICP-MS. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 364, p. 694-699, 1999.

KESARI, R.; GUPTA, V.K. A simple method for the spectrophotometric determination of atrazina using p-aminoacetophenone and its application in environmental and biological samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 47, p. 1085-1092, 1998.

KOSTER, E.H.M.; CRESCENZI, C.; HOEDT, W.; ENSING, K.; JONG, G.J. Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, p. 3140-3145, 2001.

KRIZ, D.; MOSBACH, K. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 300, p. 71-75, 1995.

KRIZ, D.; RAMSTROM, O.; SVENSSON, A.; MOSBACH K. Introducing biomimetic ensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, p. 2142-2144, 1995. KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 179, p. 103-118, 1986.

LANZA, F.; SELLERGREN, B. Molecularly imprinted polymers via high-throughput and combinatorial techniques. **Macromolecular Rapid Communications**, Weinheim, v. 25, p. 59-68, 2004.

LAVIGNAC, N.; BRAIN, K.R.; ALLENDER, C.J. Concentration dependent atrazineatrazine complex formation promotes selectivity in atrazine imprinted polymers. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 22, p. 138-144, 2006.

LEMOS, V.A.; JESUS, A.A.; GAMA, E.M.; DAVID, G.T.; YAMAKI, R.T. On-line solid phase extraction and determination of copper in food samples using polyurethane foam loaded with Me-BTANC. **Analytical Letters**, New York, v. 38, p. 683-696, 2005.

LI, W.H.; STOVER, H.D.H. Monodisperse cross-linked core-shell polymer microspheres by precipitation polymerization. **Macromolecules**, Washington, v. 33, p. 4354-4360, 2000.

LIAO, T.; JIANG, C.M.; WU, M.C.; HWANG, J.Y., CHANG, H.M. Quantification de L- ascorbic acid and total ascorbic acid in fruits and spinach by capillary zone electrophoresis. **Eletrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 1484-1488, 2001.

LIN, J.; YAMADA, M. Chemiluminescent flow-through sensor for 1,10phenantroline based on thecombination of molecular imprinting and chemiluminescence. **The Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 810-815, 2001.

LIN, J.; YAMADA, M. Chemiluminescent reaction of fluorescent organic compounds with KHSO₅ using cobalt(II) as catalyst and its first application to molecular imprinting. **Analytical Chemistry**, Washington v. 72, p. 1148-1155, 2000.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 885, p. 3-16, 2000.

LISKA, I.; KRUPCIK, I.; LE CLERCQ, P.A. The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices-a review os solid phase extraction techniques. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 12, p. 577-590, 1989.

LIU, M.; LU, J.; HE, Y.; DU, J. Molecular imprinting–chemiluminescence sensor for the determination of brucine. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 541, p. 99-104, 2005.

LOBINSKI, R.; MARCZENKO, Z. Recent advances in ultraviolte-visible spectrophotometry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 23, p. 55-111, 1992.

LU, Y.; LI, C.; ZHANG, H.; LIU, X. Study on the mechanism of chiral recognition with molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 489, p. 33-43, 2003.

MAGNA, A.; SALOMÃO, A.A.; VILA, M.M.D.C.; TUBINO, M. Comparative study of two spectrophotometric reagents for catechol analysis in guaraná seeds powder. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, p. 129-132, 2003.

MARTIN-STEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 370, p. 795-802, 2001.

MASQUE, N.; MARCE, R.M.; BORRULL, F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 20, p. 477-486, 2001.

MATSUI, J.; FUJIWARA, K.; TAKEUCHI, T. Atrazine-selective polymers prepared by molecular imprinting of trialkylmelamines as dummy template species of atrazine. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, p.1810-1813, 2000.

MATSUI, J.; GOJI, S.; MURASHIMA, T.; MIYOSHI, D.; KOMAI, S.; SHIGEYASU, A.; KUSHIDA, T.; MIYAZAWA, T.; YAMADA, T.; TAMAKI, K.; SUGIMOTO, N. Molecular imprinting under molecular crowding conditions: an aid to the synthesis of a high-capacity polymeric sorbet for triazine herbicides. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 79, p. 1749-1757, 2007.

MATSUI, J.; KUBO, H.; TAKEUCHI, T. Design and preparation of molecularly imprinted atrazine-receptor polymers: investigation of functional monomers and solvents. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 14, p. 699-702, 1998.

MATSUI, J.; MIYOSHI, Y.; DOBLHOFF-DIER, O.; TAKEUCHI, T. A molecularly imprinted synthetic polymer receptor selective for atrazina. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 67, p. 4404-4408, 1995.

MATSUI, J.; OKADA, M.; TSURUOKA, M. TAKEUCHI, T. Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor. **Analytical Communications**, Cambridge, v. 34, p. 85-87, 1997.

MENA, M.L.; AGÜÍ, L.; MARTINEZ-RUIZ, P.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; REVIEJO, A.J.; PINGARRÓN, J.M. Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 376, p. 18-25, 2003.

MENA, M.L.; MARTINEZ-RUIZ, P.; REVIEJO, A.J.; PINGARRON, J.M. Molecularly imprinted polymers for on-line preconcentration by solid phase extraction of pirimicarb in water samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 451, p. 297-304, 2002.

MORTATTI, J.; KRUG, F.J.; PESSENDA, L.C.R.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Determination of iron in natural-waters and plant-material with 1,10-phenanthroline by flow-injection analysis. **The Analyst**, Cambridge, v. 107, p. 659-663, 1982.

168

MOTTALEB, M.A.; ABEDIN, M.Z.; ISLAM, M.S. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in river water by solid-phase extraction and gas chromatography. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 19, p. 1365-1369, 2003.

MUDD, S. A hypothetical mechanism of antibody formation. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 23, p. 423-427, 1932.

MULDOON, M.T.; STANKER, L.H. Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, p. 803-808, 1997.

MULDOON, M.T.; STANKER, L.H. Polymer synthesis and characterization of a molecularly imprinted sorbent assay for atrazine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1424-1427, 1995.

MURRAY, G.M.; UY, O.M. Ionic sensors based on molecularly imprinted polymers. In: SELLERGREN, B. (Ed.). **Molecularly imprinted polymers**. Manmade mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2001. cap. 19, p. 441-465.

NIE, F.; LU, J.; HE, Y.; DU, J. Determination of indomethacin in urine using molecule imprinting-chemiluminescence method. **Talanta**, Amsterdam, v. 66, p.728-733, 2005.

NILSSON, K.; LINDELL, J.; NORRLÖW, O.; SELLERGREN, B. Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 680, p. 57-61, 1994.

PANG, X.S.; CHENG, G.X.; LI, R.S.; LU, S.L.; ZHANG, Y.H. Bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide gel beads prepared via inverse-phase seed suspension polymerization. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 550, p.,13-17, 2005.

PAULING, L. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 62, p. 2463-2657, 1940.

PAULING, L.; CAMPBELL, D.H. The manufacture of antibodies in vitro. **Journal** of Experimental Medicine, New York, v. 76, p. 211-220, 1942.

PEREIRA, M.D.; ARRUDA, M.A.Z. Preconcentration of Cd(II) and Pb(II) using humic substances and flow systems coupled to flame atomic absorption spectrometry. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 146, p. 215-222, 2004.

PÉREZ-MORAL, N.; MAYES; A.G. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 504, p. 15-21, 2004.

PIACHAM, T.; JOSELL, A.; ARWIN, H.; PRACHAYASITTIKUL, V.; YE, L. Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 536, p. 191-196, 2005.

PILETSKY, S.A.; ALCOCK, S.; TURNER, A.P.F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. **Trends in Biotechnology**, London, v. 19, p. 9-12, 2001.

PLUNKETT, S.D.; ARNOLD, F.H. Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports for high-performance ligand-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 708, p. 19-29, 1995.

POGORELOVA, S.; BOURENKO, T.; KHARITONOV, A.B.; WILLNER, T. Selective sensing of triazine herbicides in imprinted membranes using ion-sensitive field-effect transistors and microgravimetric quartz crystal microbalance measurements. **The Analyst**, Cambridge, v. 127, p. 1484-1491, 2002.

POOLE, C.F. New trends in solid-phase extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, p. 362-373, 2003.

PONS, C.; FORTEZA, R.; CERDA, V. The use of anion-exchange disks in an optrode coupled to a multi-syringe flow-injection system for the determination and speciation analysis of iron in natural water samples. **Talanta**, Amsterdam, v. 66, p. 210-217, 2005.

POZZEBON, J.M.; QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. Development of solidphase extraction for triazines: Application to a biological sample. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, New York, v. 26, p. 781-790, 2003.

PRADE, L.; HUBER, R.; BIESELER, B. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase - explanations for the selectivity of the enzyme in plants. **Structure with Ffolding and Design**, London, v. 6, p. 1445-1452, 1998.

PRASAD, K.; PRATHISH, K.P.; GLADIS, J.M.; NAIDU, G.R.K.; RAO, T.P. Molecularly imprinted polymer (biomimetic) bases potentiometric sensor for atrazine. **Sensors and Actuators, B**, Amsterdam, v. 123, p. 65-67, 2007.

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

QUAGLIA, M.; DE LORENZI, E.; SULITZKY, C.; MASSOLINI, G.; SELLERGREN, B. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography. **The Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 1495-1498, 2001.

RAMSTRÖM, O.; ANDERSSON, L.I.; MOSBACH, K. Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 58, p. 7562-7564, 1993.

RAMSTRÖM, O.; SKUDAR,K.; HAINES, J.; PATEL, P.; BRUGGEMANN, O. Food analyses using molecularly imprinted polymers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 2105-2114, 2001.

REIS, B.F.; GINE, M.F.; ZAGATTO, E.A.G.; LIMA, J.L.F.C.; LAPA, R.A. Multicommutation in flow analysis. Part1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 293, p. 129-138, 1994.

RIBEIRO, F.A.L; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; da SILVA, L.R.; SCHENEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figura de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v.31, p.164-171, 2008.

ROSENGREN, A.M.; KARLSSON, J.G.; ANDERSSON, P.O.; NICHOLLS, I.A. Chemometric models of templates molecularly imprinted polymer binding. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 77, p. 5700 -5705, 2005.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analyses. Part 1. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 78, p. 145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E.H. Flow injection analysis. New York: Wiley Interscience, 1988. 499p.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 237, p. 329-343, 1990.

SALINAS-CASTILLO, A.; SANCHEZ-BARRAGAN, I.; COSTA-FERNANDEZ, J.M.; PEREIRO, R.; BALLESTEROS, A.; GONZALEZ, J.M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A.; SANZ-MEDEL, A.L. lodinated molecularly imprinted polymer for room temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 25, p. 3224-3226, 2005.

SANCHEZ-BARRAGAN, I.; COSTA-FERNANDEZ, J.M.; PEREIRO, R.; SANZ-MEDEL, A.; SALINAS, A.; SEGURA, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A.; BALLESTEROS, A.; GONZALEZ, J.M. Molecularly imprinted polymers based on iodinated monomers for selective room-temperature phosphorescence optosensing of fluoranthene in water. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 77, p. 7005-7011, 2005.

SANCHEZ-BARRAGAN, I.; KARIM, K.; COSTA-FERNANDEZ, J.M.; PILETSKY, S.A.; SANZ-MEDEL, A. A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water. **Sensors Actuators B**, Amsterdam, v. 123, p. 798–804, 2007.

SANTOS, W.J.R.; LIMA, P.R.; TARLEY, C.R.T.; KUBOTA, L.T. A catalytically active molecularly imprinted polymer that mimics peroxidase based on hemin: application to the determination of *p*-aminophenol. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Washington, v. 389, p. 1919-1929, 2007.

SCHIEFFER, G.W.; WHEELER, G.P; CIMINO, C.O. Determination of folic-acid in commercial diets by anion-exchange solid-phase extraction and subsequent reversed-phase HPLC. Journal of Liquid Chromatography, Amsterdam, v. 13, p. 2659-2669, 1984.

SELLERGREN, B.; HALL, A.J. Fundamental aspects on the synthesis and characterization of imprinted network polymers. In: SELLERGREN, B. (Ed.). **Molecularly imprinted polymers**. Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2001. cap.2, p. 21-57.

SERGEYEVA, T.A.; PILETSKY,S.A.; BROVKO, A.A.; SLINCHENKO, E.A.; SERGEYEVA, L.M.; PANASYUK, T.L.; EL'SKAYA, A.V. Conductimetric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes. **The Analyst**, Cambridge, v. 124, p. 331-334, 1999.

SERGEYEVA, T.A.; BROVKO, A.A.; PILETSKY, E.V.; PILETSKY, S.A.; GONCHAROVA, L.A.; KARABANOVA, L.V.; SERGEYEVA, L.M.; EL'SKAYA, A.V. Porous molecularly imprinted polymer membranes and polymeric particles. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 582, p. 311-319, 2007.

SHOJI, R.; TAKEUCHI, T.; KUBO, I. Atrazine sensor based on molecularly imprinted polymer-modified gold electrode. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, p. 4882-4886, 2003.

SIEMAN, M.; ANDERSSON, L.I.; MOSBACH, K. Selective recognition of the herbicide atrazine by noncovalent molecularly imprinted polymers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 141-145, 1996.

SILVA, M.M.; ARRUDA, M.A.Z.; KRUG, F.J.; OLIVEIRA, P.V.; QUEIROZ, Z.F.; GALLEGO, M.; VALCARCEL, M. On-line separation and preconcentration of cadmium, lead and nickel in a fullerene (C-60) minicolumn coupled to flow injection tungsten coil atomic absorption spectrometry. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, v. 368, p. 255 - 263, 1998.

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

SUAREZ-RODRIGUEZ, J.L.; DIAZ-GARCIA, M.E. Flavonol fluorescent flowthrough sensing based on a molecular imprinted polymer. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 405, p. 67-76, 2000.

SUAREZ-RODRIGUEZ, J.L.; DIAZ-GARCIA, M.E. Fluorescent competitive flowthrough assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 16, p. 955-961, 2001.

SUEDEE, R.; SRICHANA, T.; SAELIM, J.; THITIRAT, T. Chiral determination of various adrenergic drugs by thin-layer chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases prepared with antagonists. **The Analyst**, Cambridge, v. 124, p. 1003-1007, 1999.

SUN, Y.-G.; CUI, H.; LI, Y.-H.; LIN, X.-Q. Determination of some catechol derivatives by a flow injection electrochemiluminescent inhibition method. **Talanta**, Amsterdam, v. 53, p. 661-666, 2000.

SURUGIU, I.; SVITEL, J.; YE, L.; HAUPT, K.; DANIELSSON, B. Development of a low injection capillary chemiluminescent ELISA using an imprinted polymer instead of the antibody. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, p. 4388-4392, 2001.

TAKEUCHI, T.; FUKUMA, D.; MATSUI, J. Combinatorial molecular imprinting: an approach to synthetic polymer receptors. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 71, p. 285-290, 1999.

TAKEUCHI, T.; UGATA, S.; MASUDA, S.; MATSUI, J.; TAKASE, M. Atrazine transformation using synthetic enzymes prepared by molecular imprinting. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 2, p. 2563-2566, 2004.

TARLEY, C.R.T.; ARRUDA, M.A.Z. Online coupling of a flow injection system to TS-FF-AAS for preconcentration and determination of lead in water and vegetables. **Analytical Letters**, New York, v. 38, p. 1427-1443, 2005.

TARLEY, C.R.T.; FERREIRA, S.L.C.; ARRUDA, M.A.Z. Use of modified rice husks as a natural solid adsorbent of trace metals: characterization and development of an on-line preconcentration system for cadmium and lead determination by FAAS. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 77, p. 163-175, 2004.

TARLEY, C.R.T.; KUBOTA, L.T. Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 548, p. 11-19, 2005.

TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP ("molecularly imprinted polymers") em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 1076-1086, 2005.

TARLEY, C.R.T.; SEGATELLI, M.G.; KUBOTA, L.T. Amperometric determination of chloroguaiacol at submicromolar levels after on-line preconcentration with molecularly imprinted polymers. **Talanta**, Amsterdam, v. 69, p. 259-266, 2006.

TRAVIESA-ALVAREZ, J.M.; SANCHEZ-BARRAGAN, I.; COSTA-FERNANDEZ, J.M.; SANZ-MEDEL; R.P.A. Room temperature phosphorescence optosensing of

benzo[a]pyrene in water using halogenated molecularly imprinted polymers. **The Analyst**, Cambridge v. 132, p. 218-223, 2007.

US Department of Health and Human Services. FDA. **Guidance for industry** - bioanalytical method validation. Rockville: FDA, 2001. 25 p. Disponível em: http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf. Acesso em: 13 fev. 2008

Van MAANEN J.M.; De VAAN M.A.; VELDSTRA A.W.; HENDRIX W.P. Pesticides and nitrate in groundwater and rainwater in the Province of Limburg in The Netherlands. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 72, p. 95-114, 2001.

VILLOSLADA, F.N.; TAKEUCHI, T. Multivariate analysis and experimental design in the screening of combinatorial libraries of molecular imprinted polymers. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 78, p. 1354-1361, 2005.

WANG, Y.; CHEN, M.L.; WANG, J.H. Sequential/bead injection lab-on-valve incorporating a renewable microcolumn for co-precipitate preconcentration of cadmium coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 21, p. 535-538, 2006.

WANG, J.; HANSEN, E.H. Trends and perspectives of flow injection/sequential injection on-line sample-pretreatment schemes coupled to ETAAS. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v. 24, p. 1-8, 2005.

WANG, Z.H.; ZHANG, Z.P.; WANG, Z.P.; LIU, L.W.; YAN, X.P. Acrylic acid grafted polytetrafluoroethylene fiber as new packing for flow injection on-line microcolumn preconcentration coupled with flame atomic absorption spectrometry for determination of lead and cadmium in environmental and biological samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdan, v.514, p. 151-157, 2004.

WHITCOMBE, M.J.; VULFSON, E.N. Imprinted polymers. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 13, p. 467-478, 2001.

WIKIPEDIA.Ácidoascórbico.Disponívelem:http://pt.wikipedia.org/wiki/VitaminaC. Acesso em: 26 abr. 2007.

WU, A.H.; SYU. M.J. Synthesis of bilirubin imprinted polymer thin film for the continuous detection of bilirubin in a MIP/QCM/FIA system. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 21, p. 2345-2353, 2006.

WULFF, G.; VIETMEIER, J.; POLL, H.G. Enzyme-analog built polymers.22. Influence of the nature of the cross-linking reagent on the performance of imprinted polymers in racemic-resolution. **Macromolecular Chemistry and Physics**, Weinheim v. 188, p. 731-740, 1987.

XIONG, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Z.; HE, D.; HE, C. Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with flow-injection chemiluminescence for the determination of tetracycline. **The Analyst**, Cambridge, v. 131, p. 829-834, 2006a.

XIONG, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Z.; HE, D.; HE, C. Determination of hydralazine with flow injection chemiluminescence sensor using molecularly imprinted polymer as recognition element. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 41, p. 694-700, 2006b.

XIONG, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Z.; HE, D.; HE, C. Flow-injection chemiluminescence sensor for determination of isoniazid in urine sample based on molecularly imprinted polymer. **Spectrochimica Acta, Part A**, Amsterdam, v. 66, p. 341-346, 2007.

XU, X.; ZHU, L.; CHEN, L. Separation and screening of compounds of biological origin using molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 804, p. 61-69, 2004.

YAN, X.P.; LI, Y.; JIANG, Y. Selective measurement of ultratrace methylmercury in fish by flow injection on-line microcolumn displacement sorption preconcentration and separation coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 75, p. 2251-2255, 2003.

YANG, C.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; YANG, F. Molecularly imprinted on-line solidphase extraction combined with chemiluminescence for the determination of pazufloxacin mesilate. **Microchimica Acta**, Amsterdam, v. 159, p. 299-304, 2007.

YE, L.; MOSBACH, K. The technique of molecular imprinting - principle, state of the art, and future aspects. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Heidelberg, v. 41, p. 107-113, 2001.

YEBRA-BIURRUN, M.C. Flow injection determination methods of ascorbic acid. **Talanta**, Amsterdam, v. 52, p. 367-383, 2000.

YILMAZ, E.; RAMSTRÖM, O.; MÖLLER, P.; SANCHEZ, D.; MOSBACH, K. A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates. **Journal of Materials Chemistry**, Cambridge, v. 12, p. 1577-1581, 2002.

YOSHIDA, M.; HATATE, Y.; UEZU, K.; GOTO, M.; FURUSAKI, S. Chiralrecognition polymer prepared by surface molecular imprinting technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 169, p. 259-269, 2000.

ZACHARIADIS, G.A.; ANTHEMIDIS, A.N.; BETTAS, P.G.; STRATIS, J.A. Determination of lead by on-line solid phase extraction using a PTFE microcolumn and flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Amsterdam, v. 57, p. 919-927, 2002.

ZAGATTO, E.A.G.; DIAS, A.C.B. In-line sample preparation in flow analysis. In: ARRUDA; M.A.Z. (Ed.). **Trends in sample preparation**. New York: Nova Science Publishers, 2006. cp. 7.

ZENKI, M.; TANISHITA, A.; YOKOYAMA, T. Repetitive determination of ascorbic acid using iron (III) - 1.10- phenanthroline-peroxodisulfate system in circulatory flow injection method. **Talanta**, Amsterdam, v. 64, p. 1273-1277, 2004.

ZHANG, Z.; HE, D.; LIU, W.; LV, Y. Chemiluminescence micro-flow-injection analysis on a chip. **Luminescence**, Weinheim, v. 20, p. 377-381, 2005.

ZHOU, H.; ZHANG, Z.; HE, D.; HU, Y.; HUANG, Y.; CHEN, D. Flow chemiluminescence sensor for determination of clenbuterol based on molecularly imprinted polymer. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 523, p. 237-242, 2004.

ZHOU, H.; ZHANG, Z.; HE, D.; XIONG, Y. Flow through chemiluminescence sensor using molecularly imprinted polymer as recognition elements for detection of salbutamol. **Sensors Actuators B**, Amsterdam, v. 107, p. 798-804, 2005.

ZOUGAGH, M.; RIOS, A.; VALCARCEL, M. Automatic selective determination of caffeine in coffee and tea samples by using a supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 539, p.117–124, 2005.