

1 Introdução

1.1. Polímeros de impressão molecular

O desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis é de grande importância para uma melhor determinação de espécies químicas e, conseqüentemente, para aumentar a confiabilidade dos resultados analíticos. Devido ao grande número de amostras usualmente manuseadas nas análises, o procedimento de preparo das mesmas deve ser rápido e conveniente, com perdas mínimas dos analitos.

Como o analito de interesse muitas vezes está presente em baixas concentrações em uma matriz que geralmente é incompatível com a técnica de análise são necessárias etapas de limpeza da amostra, para aumentar a compatibilidade desta com a técnica de interesse.

A extração e isolamento dos analitos de interesse são as etapas mais críticas envolvidas na análise de misturas presentes em matrizes complexas. A extração tem o objetivo de remover os analitos da matriz, enquanto que a etapa de limpeza (*clean up*) baseia-se na eliminação de possíveis interferentes.

Neste contexto, o emprego de polímeros molecularmente impressos (do inglês – “molecularly imprinted polymers” – MIP) tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta analítica com grandes potencialidades para minimizar as referidas limitações nas técnicas de separação/concentração tradicionalmente empregadas (Silva, 2009).

Embora o desenvolvimento dos materiais com impressão molecular tenha iniciado a sete décadas atrás, pesquisas e aplicações envolvendo esse assunto ainda ocupam um lugar proeminente na literatura. Os polímeros de impressão molecular (MIP) são polímeros sintéticos obtidos por reações de polimerização na presença de um modelo (molécula molde ou “template”) que produz cavidades no material sintetizado que são específicas para o modelo impresso. Assim, após a remoção do template, os polímeros passam a apresentar sítios vazios com forma do composto alvo (Yeh & Ho, 2005).

O conceito de impressão molecular surgiu a partir da teoria de Pauling na qual um antígeno serviria como molécula molde (MM) para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando em configurações complementares altamente seletivas (Pauling,1940). Em 1949, Dickey, baseado nessa teoria, desenvolveu uma metodologia para a preparação de materiais adsorventes com afinidades específicas para algumas substâncias, indicando a viabilidade e utilidade de se elaborar materiais que permitiam interações seletivas atribuídas principalmente à sua estrutura tridimensional complementar ao da molécula molde.

Wulff e Sarhan (1972) sintetizaram um polímero orgânico enantiosseletivo para o ácido glicérico, onde as interações deste com os monômeros funcionais (MF) eram de natureza covalente. Como consequência da boa interação entre os monômeros e MM, esse polímero mostrou-se bastante seletivo em relação a retenção do enantiômero ácido D,L-glicérico. Entretanto a retirada da MM do sítio de ligação mostrou-se difícil. Em casos como esse, a retirada da MM requer processos mais drásticos como reações de hidrólise, o que pode inativar o polímero para futuras ligações.

A abordagem da impressão não-covalente proposta por Mosbach *et al*,1981 mostrou que a natureza não-covalente das ligações entre a MM e o MF permite maior versatilidade no preparo de diferentes tipos de MIP. Isso é decorrente da ampla faixa de interações não-covalentes, (ligações de hidrogênio, ligação iônica, íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e interações hidrofóbicas) que se pode estabelecer entre diferentes MM e MF. Outra vantagem é cinética rápida de formação e facilidade na clivagem das interações entre os MF e a MM, facilitando a limpeza do polímero impresso através da remoção da MM com solventes apropriados.

Whitcombe *et al.*, 1995 propuseram um novo tipo de MIP, onde a MM e o MF interagem por ligações covalentes no momento da síntese e por interações não-covalentes no momento da re-ligação com o analito de interesse durante a aplicação do MIP na separação deste. Após a síntese do MIP, foi necessária uma hidrólise para a retirada da MM, permanecendo, nesse local, grupos ligantes capazes de interagir não-covalentemente com o analito-alvo. Assim foi possível aliar as vantagens da síntese covalente com a versatilidade da interação não-covalente quando da aplicação do MIP na extração em fase sólida.

As estratégias que permitem obter materiais seletivos baseiam-se no reconhecimento biomolecular característico de muitos processos biológicos como o de replicação de DNA, interação antígeno-anticorpo, enzima-substrato e outros.

Nestes sistemas, as biomoléculas possuem sítios receptores capazes de se ligarem seletivamente a uma molécula, na presença de outras com estruturas moleculares semelhantes. Apesar da aplicação dos MIP ser amplamente voltada para moléculas de baixa massa molar, ainda que de maneira escassa, pode-se também empregar a tecnologia MIP com êxito na separação de macromoléculas, tais como as proteínas C-reativa (Kumar *et al.*, 2012) hemoglobina (Kan *et al.*, 2012) e BSA (Deng *et al.*, 2011). A habilidade dos MIP em simular seletivamente o reconhecimento molecular, tal como é feito com a interação antígeno-anticorpo, traz contribuições significativas para melhoria de seletividade e sensibilidade em química analítica, como materiais poliméricos seletivos em substituição aos métodos de imunoafinidade em cromatografia, bem como em relação aos materiais convencionais empregados em extração em fase sólida (C18 e resinas). Os sistemas biomiméticos sintéticos que caracterizam os MIP possuem vantagens em relação aos sistemas biológicos no tocante à simplicidade do preparo e estabilidade (Tarley *et al.*, 2005).

Além do caráter seletivo, os MIP demonstram vantagens em relação aos imunosorventes no tocante à estabilidade química, capacidade de adsorção e reprodutibilidade no preparo do polímero (Tarley *et al.*, 2005).

O emprego do MIP como sorvente para extração em fase sólida é versátil e, além disso, os polímeros têm alta resistência em meios fortemente ácidos e básicos e são compatíveis com diversos tipos de solventes orgânicos. Eles também podem ser manipulados em altas pressões e temperaturas. Além disso, os materiais poliméricos conservam suas características originais por longos períodos quando armazenados a seco, em temperatura ambiente (Cabral, 2008). Os MIP apresentam algumas desvantagens tais como: formação de sítios de ligação heterogêneos, processo laborioso de quebra e trituração do material e dificuldade de remoção da MM em alguns casos (Neto, 2010).

1.2. Preparo dos MIP

1.2.1. Estratégia geral

De um modo geral, o preparo de um MIP, além da MM e do MF, utiliza-se também um agente ou reagente de ligação cruzada (ALC) a fim de formar uma matriz polimérica rígida. Essas reações de polimerização são sempre iniciadas

com um iniciador radical (IR). Por fim, a MM é removida da matriz polimérica usando-se solvente adequado, ou, por meio de clivagem química se a molécula estabelecer ligação covalente com o monômero. Com a remoção da MM, o polímero resultante disporá de microcavidades com tamanhos uniformes capazes de reter seletivamente a molécula molde presente em uma amostra complexa. É válido ressaltar que a MM normalmente é o próprio analito de interesse, porém, em alguns casos, outra molécula pode ser utilizada como molde desde que este se guarde alguma semelhança estrutural com a do analito de interesse. Assim, o termo analito também pode referir-se à molécula molde utilizada na síntese do polímero. Na Figura 1 é mostrado, de maneira geral, o processo de formação de um MIP (Tarley *et.al.*, 2005).

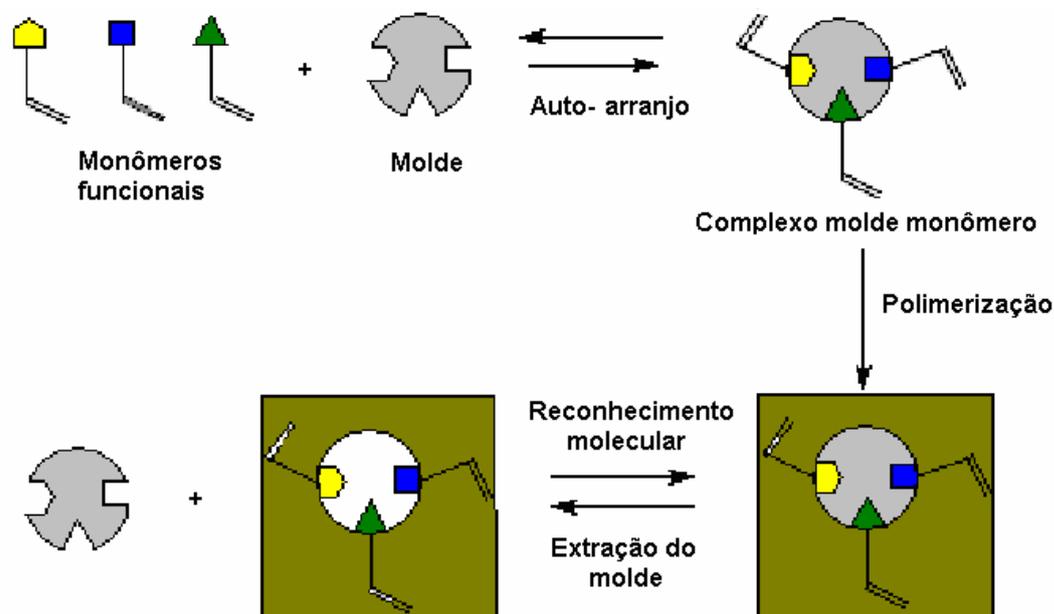


Figura 1 - Representação esquemática do processo de formação do MIP (adaptado de Tarley *et al.*, 2005).

1.2.2.

Escolha da molécula molde e do monômero funcional

O primeiro passo para síntese dos MIP consiste em estabelecer a escolha do monômero e da MM (analito). A MM necessita conter em sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monômeros, de modo a permitir a formação de um complexo estável (Tarley, 2005). O analito deve apresentar grupos funcionais capazes de interagir fortemente com o

monômero a fim 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) (Grassi, 2008).

O tipo de interação estabelecida entre o molde e o monômero funcional determina o método de impressão molecular que pode ser covalente, não covalente, ou semi-covalente (Pereira, 2008).

Quando os MIP são formados por ligações covalentes, observa-se uma maior dificuldade em 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 (Grassi, 2008). Interações do tipo covalente são mais difíceis de serem obtidas e possuem sítios mais seletivos, no entanto, o estabelecimento de ligações covalentes limita a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos e estão restritas a poucos grupos funcionais (Pereira, 2008; Al-Kindy, 2000).

A abordagem que se baseia nas interações não-covalentes, interações do tipo dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, eletrostática, hidrofóbica ou de transferência de carga entre o analito e o monômero funcional (Pereira, 2008). A cinética é bastante rápida e a quebra das interações para a retirada do molde é realizada de maneira simples (Grassi, 2008). Os polímeros preparados a partir de ligações não-covalentes apresentam diâmetros de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Apesar dessas desvantagens eles são mais usados devido a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes tipos de analitos (Andersson, 1984).

Já o modo semi-covalente associa às características vantajosas de ambas as impressões. Esse procedimento utiliza um monômero funcional que liga-se à MM por meio de ligações covalentes, esta é facilmente retirado por clivagem hidrolítica, liberando CO₂ após a polimerização. Os grupos remanescentes nos sítios formados após a hidrólise são capazes de se religarem à MM por meio de interações não-covalentes. Assim, as interações entre o monômero funcional e a MM só ocorrem na etapa de síntese, possibilitando ligações de caráter não-covalente para as cavidades de reconhecimento molecular no polímero (Grassi, 2008).

Os MIP que utilizam interações não-covalentes no processo de reconhecimento molecular são os mais encontrados na literatura, correspondendo a cerca de 90 % dos trabalhos publicados. Uma justificativa para este fato é que a preparação deste tipo de polímero é relativamente direta e requer etapas simples

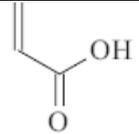
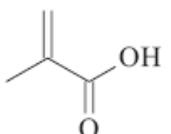
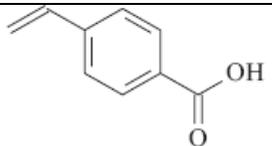
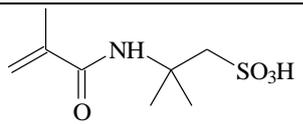
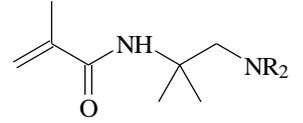
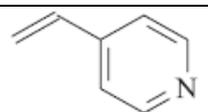
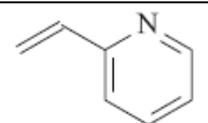
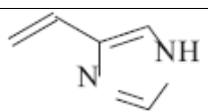
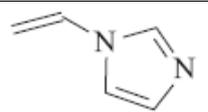
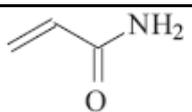
de síntese. Além disso, uma grande variedade de monômeros funcionais, que podem ser utilizados para realizar diferentes tipos de interações intramoleculares, está disponível no mercado. Finalmente, comparada com os métodos covalentes, o modo não covalente utiliza interações que são similares às vistas em processos naturais, o que faz com que este método tenha maior aplicabilidade (Pereira, 2008).

O monômero 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 propiciar 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 (Grassi, 2008).

As MM que possuem grupos funcionais com caráter básicos interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos, como o MAA (ácido metacrílico). Em contrapartida, monômeros com caráter básico como 4-vinilpiridina (VP) interagem preferencialmente com MM de caráter ácido. Como a interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio, quantidades superiores do monômero em relação à MM (geralmente 4:1) devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, para formar maior quantidade de complexos “MM-monômero”.

Os monômeros mais usados para o preparo dos MIP com os seus respectivos tipos de interações encontram-se na Tabela 1. É importante ressaltar que MAA é um dos monômeros mais utilizados na síntese de MIP.

Tabela 1 - Monômeros tipicamente usados no preparo dos MIP (Tarley *et al.*,2005).

	Nome do monômero	Tipo de interação com o analito
	Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido meta-acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido p-vinilbenzóico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
	Ácido acrilamidosulfônico	Interação iônica
	Amino metacrilaminada	Interação iônica
	4-vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	2-vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
	4-vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	1-vinilimidazole	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais
	Acrilamida	Ligação de hidrogênio

1.2.3. Escolha do solvente

Outro importante parâmetro que influencia na estabilidade de formação do complexo “MM-monômero” é o solvente utilizado que deve solubilizar tanto a MM quanto o(s) monômero(s), contudo, não deve interferir na interação MM-monômero. Assim, quando há risco de ocorrer tal interferência por meio de forças eletrostáticas ou por ligação de hidrogênio, é prudente o uso de solventes apolares com constante dielétrica baixa, tais como, clorofórmio e tolueno. Por outro lado, solventes com constante dielétrica maior, como a acetonitrila, também podem ser utilizados, porém os polímeros obtidos podem apresentar afinidade menos acentuada ao se ligar ao analito. Já os solventes próticos como água e metanol são pouco utilizados, pois atuam como competidores no meio reacional interferindo na formação de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre MM e monômero. O solvente muitas vezes é chamado de porogênico, quando este influencia nas características morfológicas dos MIP.

Polímeros pouco porosos e com pequena área superficial apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular, devido à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos. Assim, na prática, a escolha adequada de um solvente porogênico pode garantir morfologia e área superficial adequadas desde que, este não interfira na interação MM-monômero. Entretanto, cabe ressaltar que, como regra geral, após o preparo do polímero e a remoção da MM da cavidade, o MIP terá elevada afinidade pelo analito quando o mesmo estiver presente. Isto significa que a extração e/ou pré-concentração direta de amostras aquosas num MIP preparado em solvente apolar exibirá seletividade menos pronunciada pela espécie de interesse (Tarley *et al.*, 2005).

1.2.4. Agente de ligação cruzada e Iniciador radicalar

A seletividade dos MIP também é influenciada pelo tipo de MM. Normalmente, moléculas que possuem grupos estéricos distantes da função orgânica principal que interage com o monômero, produzem polímeros pouco seletivos (Spivak, 2001). A seletividade dos polímeros também é assegurada pelo emprego de reagentes que promovam ligações cruzadas no polímero, o que permite a estabilidade do complexo “MM-monômero” e, conseqüentemente, maior rigidez do sítio seletivo formado. Estudos têm demonstrado que um mínimo 50% (em quantidade de matéria em relação à quantidade dos outros componentes da

mistura) do ALC ou reagente reticulante deve estar presente no meio reacional para garantir uma boa polimerização (Sellergen, 1989). O reagente de ligação cruzada na síntese de um MIP exerce diferentes funções. Ele é um dos fatores que responde pela estabilidade mecânica da matriz polimérica, e pela textura do material. É usado para formar uma estrutura rígida tridimensional ao redor da molécula. O EGDMA (etileno glicol dimetacrilato) tem sido o reagente de ligação cruzada muito utilizada, pois promove a formação de polímeros estáveis (termicamente e mecanicamente). Outros reagentes de ligação cruzada mostrados na Figura 2 têm sido investigados, mas apenas o trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) tem apresentado resultados similares ou melhores que o EGDMA (Kempe,1948; Villoslada, 2004).

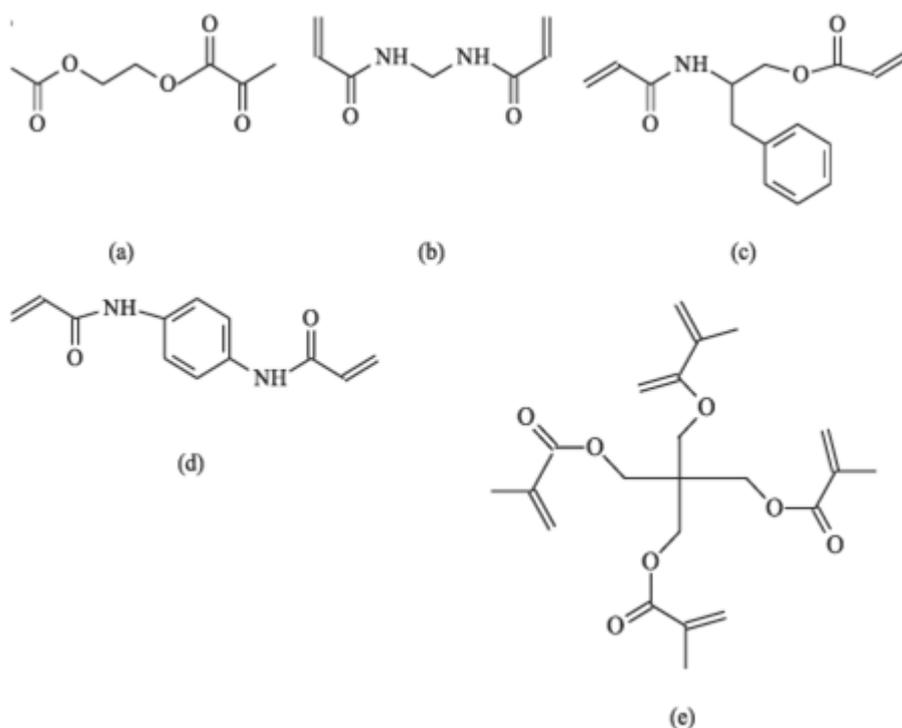


Figura 2 - Estrutura molecular dos reagentes de ligação cruzada empregados na síntese do MIP: (a) etileno glicol dimetacrilato (EGDMA), (b) N' N'-metileno-bis-acrilamina, (c) N',O-bisacrilóila-L-fenilalaninol, (d) N'N'-fenilendiacrilamida e (e) trimetilpropano trimetacrilato (TRIM).

O IR é responsável pela geração dos radicais livres. Estes são responsáveis pelo início do processo de polimerização. Assim é indispensável o emprego de iniciadores radiculares em associação com estímulos físicos como temperatura e radiação UV (Santos,2009). 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 MIP (Grassi, 2009). O iniciador radicalar 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN) é um dos mais empregados na síntese dos MIP, porém outros também podem ser utilizados (Figura 3) conforme descrito na literatura (Mhaka *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1996; César-Oliveira *et al.*, 1999). A escolha dos reagentes é ditada pela natureza da interação da MM com o monômero.

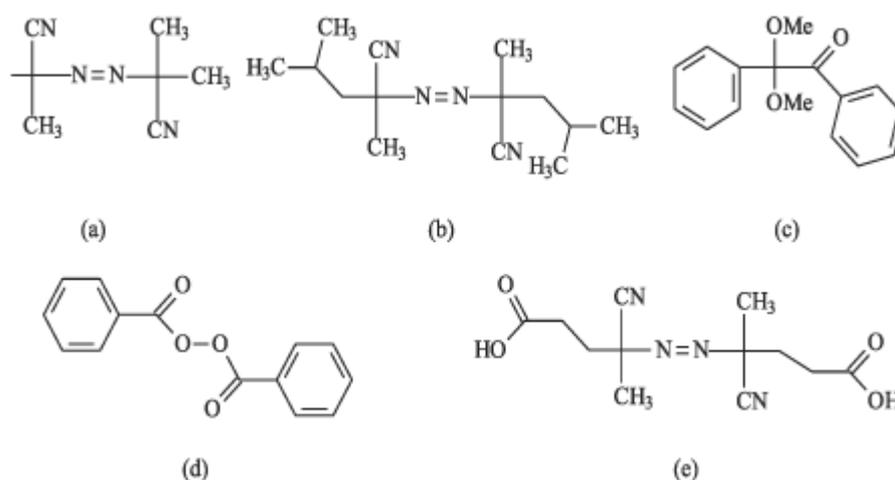


Figura 3 - Estruturas moleculares dos iniciadores radicalares empregados na síntese do MIP. (a) 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN); (b) azo-bisdimetilvaléronitrila (ABDV); (c) dimetilacetal de benzila; (d) peróxido de benzoíla (BPO) e (e) ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenóico).

Vale lembrar que a capacidade de reconhecimento molecular do MIP deve ser avaliada em relação a um polímero não impresso (NIP), do inglês Non Imprinted Polymer. Este material é sintetizado da mesma forma que o MIP, exceto pela adição da molécula molde ao meio reacional. Desta forma, o NIP funciona como um polímero de controle uma vez que não apresenta sítios específicos de ligação (Santos, 2009).

1.2.5. Polimerização

Os MIP são preparados convencionalmente pelo método conhecido por polimerização em "bulk", onde a reação é realizada em sistema homogêneo (Sellergren, 1997; Martín-Esteban, 2001).

Esta reação é conduzida em frascos selados contendo solvente monômero, MM, reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar. A reação deve ocorrer na ausência de oxigênio, sob aquecimento ou sob exposição à radiação UV, de modo a propiciar o início da reação radicalar. O oxigênio deve ser eliminado do meio reacional, pois ele retarda (em alguns casos impede) o início da polimerização. Por fim, o sólido polimérico resultante é moído, peneirado e submetido à limpeza com solvente para extração da MM (Figura 4). Como desvantagens desse método podemos citar partículas e tamanhos irregulares após a trituração do polímero assim como elevado tempo reacional (cerca de 20 h). Apenas 50% do polímero sintetizado geralmente é reaproveitado para fins analíticos, pois, alguns sítios seletivos formados são parcialmente destruídos durante a trituração, diminuindo assim a capacidade seletiva de retenção do polímero. Sendo assim os polímeros preparados por este método são mais indicados para técnicas de extração como a SPE, ao passo que seu uso como fase estacionária em HPLC é pouco indicada, devido à heterogeneidade das partículas (Tarley *et al.*, 2005; Sellergren *et al.*, 1997; Martín-Esteban *et al.*, 2001).

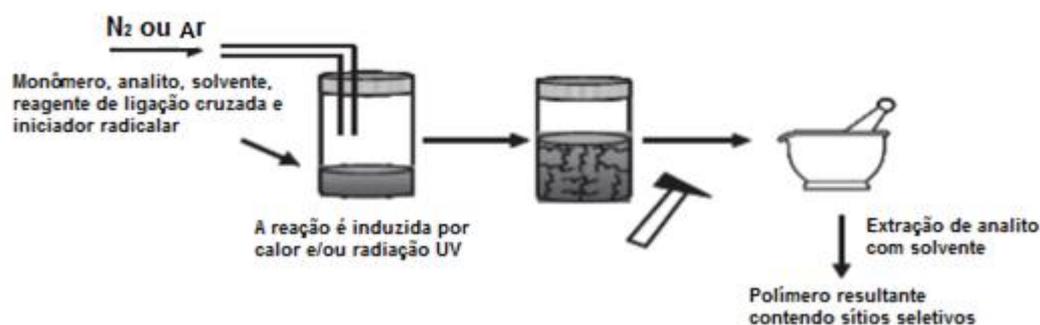


Figura 4 - Representação do procedimento de preparo do MIP empregando o método de polimerização em "bulk" (extraído de Tarley *et al.*, 2005).

Diante destas considerações, novas concepções de preparo dos MIP são relatadas na literatura com intuito de produzir partículas com tamanhos uniformes. Ao contrário do método de polimerização em "bulk", cuja síntese é realizada num sistema homogêneo (em massa e em solução), os métodos de preparo contemplam ainda reações em sistemas heterogêneos, incluindo a polimerização por suspensão (Matsui *et al.*, 1997), por precipitação (Ye *et al.*, 1998) e por expansão em multi-etapas (Hosoya *et al.*, 1994). Outros métodos de preparo dos

MIP contemplam reações de polimerização dentro de poros de sólidos (sílica e resinas) (Plunkett *et al.*, 1995 e Yilmaz *et al.*, 2002) e reações de polimerização sobre superfície modificada de suporte sólido (Quaglia *et al.*, 2001; Tarley *et al.*, 2005).

A técnica de polimerização em suspensão procura reunir as vantagens dos processos de polimerização em massa, solução e emulsão, ao mesmo tempo em que procura eliminar algumas de suas desvantagens. A polimerização em suspensão corresponde grosseiramente a uma polimerização em massa dentro de cada gotícula de monômero suspensa no meio aquoso. Dessa forma, aumenta-se a concentração do monômero e, conseqüentemente, as velocidades de reação (quando comparada à polimerização em solução). O produto final é obtido na forma de partículas esféricas de tamanho e forma relativamente homogêneos. Além disso, o tamanho médio da partícula e a distribuição de tamanhos das partículas podem ser controlados de forma simples numa faixa relativamente estreita, manipulando-se a velocidade de agitação e a quantidade de agente de suspensão (Machado *et al.*, 2007). No método em questão, apesar da uniformidade do tamanho das partículas ser uma vantagem, eventualmente algumas moléculas de água se dissolvem na mistura polimérica interferindo na interação analito-monômero, principalmente quando esta se dá por ligação de hidrogênio. Além disso, em situações onde monômeros e analitos possuem elevada solubilidade em água, há a possibilidade de ocorrer partição destes constituintes reacionais da fase orgânica para o meio aquoso, resultando num polímero com baixo reconhecimento molecular. A polimerização por suspensão é, portanto, realizada com sucesso quando analitos e monômeros interagem preferencialmente por interações hidrofóbicas e iônicas (Tarley *et al.*, 2005).

A polimerização por precipitação é semelhante à polimerização em *bulk*, a não ser pelos grandes volumes de solventes (5 vezes maior) empregados na dissolução dos reagentes (MF, MM, ALC e IR). Essa mistura (reagentes e solvente) é degaseificada e acondicionada em banho-maria à temperatura de 60 °C por 24 h. A polimerização inicia-se de maneira pontual e o crescimento do MIP resulta da captura de oligômeros nascentes presentes na solução. A precipitação ocorre quando a microesfera adquire densidade maior que a solução. A principal vantagem desse procedimento é a formação de microesferas altamente homogêneas sem a necessidade da formação de emulsões notadamente incompatíveis com algumas MM (Figueiredo *et al.*, 2008). Os métodos de polimerização por precipitação produzem partículas com tamanhos uniformes, mas com diâmetros reduzidos. Esta característica torna-se uma desvantagem

quando tais polímeros são utilizados como fases estacionárias em HPLC, dada a elevada pressão resultante dentro da coluna cromatográfica (Tarley *et al.*, 2005).

Devido a esta limitação, o método de polimerização caracterizado por expansão em multi-etapas torna-se bastante atraente. Este método envolve basicamente o emprego de partículas poliméricas com diâmetro bem definido (geralmente poliestireno com diâmetro de 1 μm), as quais sofrem etapas de expansão com o monômero e o solvente antes do início da reação de polimerização do MIP. Diferentemente de outros métodos de preparo de polímeros, onde o solvente do meio reacional é responsável pela produção de partículas com diâmetro reduzido, no método por expansão em multi-etapas as partículas poliméricas atuam como solventes porogênicos, permitindo a produção de polímeros com tamanhos e poros maiores. Dentre todos os métodos apresentados, a expansão em multi-etapas é o mais trabalhoso e são obtidas partículas poliméricas com tamanhos cerca de cinco vezes maiores que as partículas de poliestireno empregadas no processo (Tarley *et al.*, 2005).

No que diz respeito às reações de polimerização dentro dos poros de sólidos, em especial a sílica, estas permitem obter partículas esféricas devido à uniformidade do sólido poroso. Os poros são utilizados como pequenos frascos reacionais, onde ocorre a reação. Após adição da mistura reacional aos poros, o aquecimento das partículas induz a reação de polimerização do MIP. O MIP adquire tamanho e formato uniformes após a dissolução do sólido poroso.

Neste mesmo segmento de síntese em materiais porosos, os MIP ainda podem ser preparados efetuando primeiramente a imobilização do analito em sólidos porosos, tal como a sílica. Após o término da reação, o suporte sólido e o analito são removidos por dissolução química com solução de ácido fluorídrico (HF) criando, desta maneira, os sítios seletivos. A dissolução química é realizada com HF, pois se trata de um ácido "polimérico", cuja função é apenas dissolver a sílica preservando a matriz polimérica. Com este procedimento é possível controlar não apenas a orientação do analito na superfície do polímero, mas também o formato do MIP resultante usando, por ex., sílicas com diferentes tamanhos de poros. Com esta configuração de MIP, há ainda a possibilidade de imobilizar macromoléculas como as proteínas sobre a superfície do sólido.

Outro método recente de preparo de MIP consiste na polimerização sobre superfície de sílica modificada. Inicialmente partículas de sílica, com diâmetro de 10 μm , são modificadas com tri-etoxi-aminopropilsilano; a reação de polimerização é iniciada após adição do iniciador radicalar [no caso o ácido 4,4'-azo-bis (4-ciano pentaenólico)]. Em seguida, são adicionados ao meio reacional o

monômero (MAA), reagente de ligação cruzada (EGDMA) e o analito, previamente dissolvidos no solvente. A reação ocorre sobre a superfície da sílica, formando uma fina camada polimérica. As micropartículas obtidas assumem características uniformes e mecanicamente estáveis (Tarley *et al.*, 2005).

1.3.

Estado da arte: uso dos MIP em separações analíticas

Os MIP vêm sendo explorado em várias aplicações analíticas. Alguns exemplos emblemáticos são descritos a seguir, indicando aplicações relevantes com técnicas específicas de forma a enfatizar o potencial uso desse tipo de material, evidenciando a seletividade e a sensibilidade das determinações. Porém, nessa seção não se tem a intenção de produzir uma revisão exaustiva da literatura.

As aplicações de MIP se destacam principalmente nas ciências das separações. Isso pode ser comprovado pelo extensivo número de trabalhos (Balamurugan *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2011; Hoshina *et al.*, 2011; She *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010) sobre utilização desses polímeros como fase estacionária em cromatografia líquida (LC), eletrocromatografia capilar (CEC) e, também empacotamento de cartuchos para extração em fase sólida (SPE).

1.3.1.

Cromatografia líquida

Ramstrom, *et al.*, 1994 sintetizaram um MIP para o dipeptídeo Ac-(L)-Phe-(L)-Trp-Ome, capaz de reconhecer especificamente o isômero de impressão na presença de três outros estereoisômeros. Nesse caso, o isômero (LL) foi mais retido na coluna de MIP do que os isômeros (DD), (DL) e (LD). De maneira geral, pode-se concluir que quanto maior o número de centros quirais da molécula, maior a seletividade inerente ao polímero impresso.

Hwang, *et al.*, 2001 sintetizaram um MIP para (-)-fenilpropanolamina, usando ácido metacrílico e etileno glicol dimetacrilato respectivamente como monômero funcional e agente de ligação cruzada. O MIP obtido foi, empacotado em coluna analítica e a enantioseletividade foi avaliada. Após a injeção de uma

mistura racêmica dos isômeros, observou-se maior tempo de retenção para o isômero (-), comprovando a maior afinidade do mesmo pela coluna.

Haginaka, *et al.*, 2004 sintetizaram um MIP para clorfeniramina e bronfeniramina empregando ácido metacrílico ou ácido 2-trifluorometilacrílico como monômeros funcionais, e látex de poliestireno. A retenção enantiosseletiva foi avaliada, empacotando-se os polímeros em uma coluna analítica acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados demonstraram haver afinidade das moléculas modelo pelos seus respectivos MIP.

Yin, *et al.*, 2005 compararam a eficiência da separação de colunas analíticas preenchidas, com um MIP (polímero sintetizado diretamente dentro da coluna), em comparação com um polímero sintetizado ampola a partir dos mesmos reagentes (posteriormente este foi empacotado em coluna). Os resultados mostraram que a separação dos isômeros de nateglinida foi bem definida utilizando o MIP sintetizado diretamente na coluna, enquanto que para o MIP sintetizado em ampola, não houve resolução cromatográfica após empacotamento na coluna.

Kim *et al.*, 2005 investigaram a origem de tal diferença no reconhecimento quiral e concluíram que existe uma distribuição mais homogênea dos sítios específicos no MIP quando o mesmo é sintetizado diretamente na coluna. Isso certamente se deve à redução do número de sítios não específicos.

Bueno *et al.*, 2010 descreveram o desenvolvimento de um procedimento analítico para determinar resíduos de verde malaquita em amostras de salmão utilizando MIP como o material de extração e clean-up, seguido por cromatografia líquida. Verde de malaquita e dois compostos estruturalmente afins, cristal violeta e verde brilhante foram empregados para o teste de seletividade. Os polímeros impressos exibiram alta afinidade para verde malaquita, enquanto cristal violeta e verde brilhante mostraram menor capacidade de ligação.

Moein *et al.*, 2011 propuseram um novo método para a determinação de dextrometorfano em fluidos biológicos usando polímeros impressos molecularmente em fase sólida (MISPE) como um exemplo de técnica de limpeza combinada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Vários parâmetros que afetam a eficiência da extração dos cartuchos MIP foram avaliados. A alta seletividade do sorvente acoplado ao sistema cromatográfico líquido de alta eficiência permitiu uma análise simples e rápida deste fármaco em amostras de plasma com ótimos limites de detecção e quantificação. A seletividade do MIP foi avaliada através da análise do dextrometorfano na presença de várias substâncias com propriedades e estruturas moleculares semelhantes. As

recuperações de dextrometorfano usando cartuchos de MIP a partir de amostras de plasma humano foram superior a 87%.

1.3.2. Eletrocromatografia capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar pode ser considerada uma das mais promissoras técnicas cromatográficas usadas em associação com MIP (Liu *et al.*, 2012; OU *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2011; Agui *et al.*, 2010). Destacam-se pontos relevantes como utilização de volume reduzido de solventes e baixo consumo de amostra, bem como a facilidade de miniaturização.

O trabalho de Schweitz *et al.*, 1997 relata a separação enantiosseletiva de propranolol e metoprolol por meio de CEC utilizando um MIP. Como principais resultados pode-se mencionar que um MIP sintetizado com (R)-propranolol como MM conseguiu proporcionar a separação de uma mistura racêmica contendo (R)-propranolol e (S)-propranolol. Da mesma forma, (R)-metoprolol e (S)-metoprolol foram satisfatoriamente separados empregando-se um MIP preparado com (S)-metoprolol como MM.

No mesmo contexto, Lin *et al.*, 1996 sintetizaram um MIP para a separação enantiomérica de (D) e (L) fenilalanina. Após a síntese, o polímero foi misturado a um gel de poliácridamida e inserido dentro de um capilar de sílica. O desempenho do MIP foi satisfatório, permitindo a separação dos isômeros com boa resolução cromatográfica.

Em outro trabalho de Ou *et al.* 2007 prepararam ainda dois MIP para separação enantiomérica de tetrahidropalmitato e base de Tröger. A síntese ocorreu diretamente dentro do capilar de sílica monolítica. Inicialmente, aderiu-se grupos vinilas aos silanóis da sílica monolítica, e, em seguida, promoveu-se a síntese individual do MIP com cada molécula molde. Os capilares foram, então, acoplados (separadamente) a um sistema de eletrocromatografia capilar, propiciando uma boa separação cromatográfica dos isômeros de tetrahidropalmitato e de base de Tröger em menos de 4 min.

Qu *et al.* 2010 desenvolveram um dispositivo micro integrado com impressão molecular de nanopartículas magnéticas como fase estacionária para a separação enantiomérica rápida por CEC. As nanopartículas em presença da S-ofloxacina como MM foram caracterizadas por espectroscopia em infravermelho, termogravimetria e microscopia eletrônica de transmissão. A composição e o pH da fase móvel foram otimizados para se obter a separação dos enantiômeros. O

desempenho analítico utilizando esse procedimento pode ser convenientemente melhorado, mostrando uma vantagem sobre a CEC convencional. O dispositivo de microfluidos magneticamente sintonizável pode ser expandido para localizar

No trabalho de Huang *et al.* 2011 foi preparado um polímero monolítico com impressão molecular como fase estacionária para a separação CEC de um grupo de compostos estruturalmente afins. A (\pm)-norepinefrina foi usada como MM. Condições otimizadas para a reação de polimerização foram avaliadas pela eficiente separação do template. Variando os parâmetros da CEC como eluente e pH. As misturas enantioméricas foram satisfatoriamente separadas.

1.3.3. Extração em fase sólida (SPE)

A aplicação extensiva dos MIP como sorventes para SPE (Chen *et al.* 2012; Lee *et al.* 2012; Muhammad *et al.* 2012; Yin *et al.* 2011; Luo *et al.* 2011; Lucci *et al.* 2010; Javanbakht *et al.* 2010; Scorrano *et al.* 2010) é resultado da simplicidade dessa aplicação, bem como do alto grau de seletividade promovido pelos MIP, quando comparados a sorventes convencionais como C18 e resinas de troca iônica.

Zurutuza *et al.*, 2005 sintetizaram um MIP para benzoilecgonina, um metabólito da cocaína, empregando ácido metacrílico com monômero funcional. O MIP foi então empregado em SPE e os resultados demonstraram seletividade satisfatória na extração de benzoilecgonina em amostras aquosas.

Bravo *et al.*, 2007 sintetizaram um MIP a base de ácido metacrílico para a extração seletiva de dietilbestrol. A seletividade do MIP foi avaliada frente a diversos compostos da mesma classe tais como hexestrol, estrona, estriol, estradiol, e etinilestradiol. O procedimento foi rápido, reprodutível e barato.

O trabalho de Fernandez-Llano *et al.*, 2007 relatou a síntese de um MIP seletivo para o diclofenaco empregando-se 2-(dimetilamino)etil-metacrilato como monômero funcional. O polímero foi aplicado na extração de diclofenaco em amostras de urina seguido de quantificação por voltametria de pulso diferencial. Os resultados foram satisfatórios em termos de seletividade e sensibilidade.

Prasad *et al.*, 2007 sintetizaram um MIP para ácido úrico empregando melanina e cloranil como monômeros funcionais. O MIP foi usado de duas maneiras: como fase sólida em SPE para a extração de ácido úrico e também na construção do sensor eletroquímico usado na quantificação do mesmo. As potencialidades do sistema foram avaliadas frente a amostras de soro sanguíneo,

sem nenhum tratamento prévio. A metodologia permitiu, nas melhores condições de trabalho, a determinação de ácido úrico em concentrações de até 0,024 mg L⁻¹. Além disso, uma avaliação com moléculas estruturalmente semelhantes ao ácido úrico demonstrou haver maior afinidade do ácido úrico pelo MIP, devido à presença de sítios com impressão molecular do ácido úrico.

Ariffin *et al.*, 2007 relataram a síntese de um MIP para diazepam empregando ácido metacrílico como monômero funcional. O polímero foi usado na extração seletiva de diazepam e de outros benzodiazepínicos em amostras de cabelo seguida de quantificação por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa. Os autores promoveram uma comparação entre SPE usando C18 e MIP como fases sólidas. Os cromatogramas das extrações usando MIP foram melhores (mais limpos e com melhor recuperação) do que o obtido após o uso de C18.

Ali *et al.*, 2010 desenvolveram um método para a limpeza de uma micotoxina, ocratoxina A (OTA), a partir de extratos de cereais empregando um novo polímero com impressão molecular (MIP) como sorvente seletivo para SPE e comparar com uma coluna de imunoafinidade. A primeira série de experiências foi realizada em solventes puros para estimar o potencial do sorvente impresso em termos de seletividade e estudar a retenção de OTA no MIP e um NIP. Após esse estudo de viabilidade, dois formatos diferentes de MIP (fragmentos e micro-esferas de monolito) foram avaliados e comparados. Por conseguinte, um procedimento de otimização foi aplicado para a extração seletiva de trigo utilizando as esferas do MIP. Todo o procedimento foi validado aplicando extrato de trigo enriquecida por OTA em níveis de concentração diferentes, e, em seguida, para uma amostra de trigo contaminado certificada. Recuperações próximas de 100% foram obtidas. A elevada seletividade do MIP foi comparada com a seletividade de um cartucho de imunoafinidade para a limpeza da amostra de trigo, sendo encontrada significativa vantagem para o MIP.

Zhu *et al.*, 2011 descrevem a superfície de um polímero com a impressão molecular do imidazol como MM e partículas de sílicas modificadas como material de suporte. A adsorção foi rápida e o equilíbrio de adsorção foi alcançado em 30 minutos. O processo de ligação poderia ser descrito pela cinética de segunda ordem. Comparado com os NIP correspondente o MIP exibiu um desempenho elevado de adsorção e seletividade para o imidazol. A seletiva separação de imidazol foi alcançada na coluna MIP-SPE. As recuperações de imidazol foram superiores a 97,0%. A superfície de impressão molecular apresentada pode

encontrar aplicação útil como um adsorvente em fase sólida para separar traços de imidazol em amostras de água do ambiente.

Molina *et al.*, 2012 desenvolveram um polímero de impressão molecular para as moléculas de cefalosporinas cefalexina (CFL) e cefapirina (PCP). O MIP foi elaborado pela abordagem de impressão não covalente e aplicado a extração em fase sólida. Para a síntese deste MIP, um sal de tributilamônio cefadroxila (TBA-CFD) foi utilizado como MM. A seletividade do MIP contra polímero impresso não (NIP) foi confirmado para CFL, CFD (cefadroxila) e PCP em soluções padrão, bem como em amostras de leite. A eficiência dos MIP sintetizados foram avaliadas por meio da aplicação do processo de SPE-MIP proposta para amostras de leite fortificadas anteriores para o método de HPLC para a detecção de cefalosporinas. As recuperações MIP-SPE foram superiores a 60% para as amostras de leite.

Soleimani *et al.*, 2012 descrevem a síntese de MIP utilizando albumina bovina como MM. Polímeros não-impresso foram preparados e tratados com o mesmo método, mas na ausência da albumina bovina. Os MIP sintetizados e NIP foram caracterizados com base em FTIR, TGA e DTA. Um processo de adsorção (extração em fase sólida, a SPE) para a remoção de albumina bovina utilizando os MIP fabricadas e NIP foram avaliadas sob condições diversas. Parâmetros eficazes na retenção de albumina bovina, por exemplo, pH, taxa de fluxo, a natureza do eluente, a força iônica, o coeficiente de seletividade e capacidade de retenção, foram estudados. Nos experimentos para amostras reais tais como amostras de soro de leite coalhado, urina e leite tiveram recuperação em torno de 80% para a albumina bovina.

1.4. Substâncias- alvo do trabalho

1.4.1. Quercetina (QUE)

Um aumento na ingestão de frutas e vegetais tem sido correlacionado com a redução do risco de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares e câncer. A atividade antioxidante dos flavonóides, encontrados na maioria das frutas e vegetais, é considerada um dos fatores que contribuem para esta redução (Ribani *et al.*, 2008).

Os flavonóides constituem uma família de moléculas diversas que consistem de dois anéis aromáticos, que estão conectados por um anel pirano. Estes

compostos podem ser agrupados em seis subgrupos principais: flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (quercetina, miricetina), catequinas ou flavanóis (epicatequina, galocatequina), flavanonas (naringenina, hesperitina), antocianinas (cianina, pelargonina) e isoflavonas (genisteina, daidzeina). Das principais classes, os flavonóis glicosídicos predominam em frutas e verduras (Ribani *et al.*, 2008).

O chá, uma das bebidas mais consumidas no mundo, é uma das fontes mais ricas em flavonoides. Acredita-se que os flavonóides presentes em chás fazem deles alimentos funcionais. No entanto, os estudos sobre o potencial efeito benéfico dos flavonóides para a saúde humana são ainda inconsistentes ou insuficientes (Matsubara *et al.*, 2006).

Os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico, sintetizados pelas plantas como metabólitos secundários. Constituem um grupo de substâncias com estrutura fenólica variável. O termo flavonóide é um nome coletivo dado aos pigmentos derivados de plantas cuja estrutura consiste em dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Behling *et al.*, 2004).

A quercetina (3,5,7,3',4' - pentahidroxi flavona) mostrado na Figura 5 é um flavonóide encontrado em vários alimentos, como cebola, maçã, folhas verdes, legumes (Yang *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2012), e também em bebidas como chás, vinho e cerveja (Russo *et al.*, 2012). Outras propriedades como atividade anti-histamínica e antiviral (Tomeckova *et al.*, 2012) também são atribuídas à quercetina. Em especial, a atividade antioxidante pode ser relacionada à sua capacidade de sequestrar radicais livres (Behling, 2004).

O interesse de muitos autores em estudar a quercetina baseia-se no efeito farmacológico sobre determinadas doenças. À QUE atribuída uma excelente resposta antioxidante contra o estresse oxidativo (Dias, 2005).

Estudos demonstram que a quercetina possui um excelente potencial antioxidante *in vitro*, sendo o flavonóide com o maior poder seqüestrador de espécies reativas de oxigênio. Este elevado poder antioxidante se deve à presença do grupo catecol no anel B e do grupo hidroxila na posição 3 do anel C (Huber *et al.*, 2008).

A ingestão humana diária de quercetina tem sido estimada em 5-40 mg dia⁻¹, contudo esses níveis podem aumentar para 200-500 mg dia⁻¹ em indivíduos que consomem quantidades elevadas de frutas e legumes (Russo *et al.*, 2012).

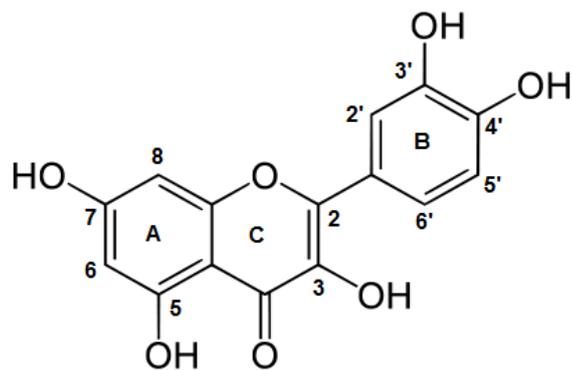


Figura 5 – Estrutura da Quercetina

A distribuição tecidual após suplementação com quercetina, mostrou grande acúmulo do flavonóides e de seus metabólitos nos pulmões de ratos, no fígado e rins de porcos (DE Boer *et al.*, 2005). Há evidências de que o tempo de meia vida dos metabólitos da quercetina varia entre 11 a 28 h. Isto indica que sob condições de suplementação repetida; níveis plasmáticos consideráveis de quercetina são atingidos (Alves, *et al.*, 2010).

Neste trabalho de Tese foram usados dois outros flavonóides com estruturas similares à QUE para testar a seletividade do MIP-QUE (Figura 6).

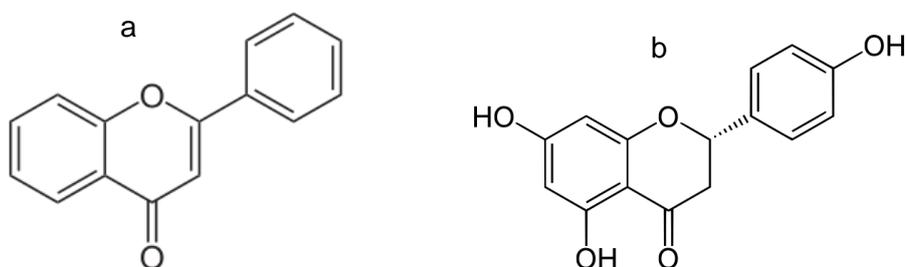


Figura 6 – Estrutura da Flavona e Naringerina.

1.4.1.1. Separação e determinação de Quercetina

Vários métodos analíticos têm sido descritos para a separação e determinação de quercetina. Alguns considerados mais relevantes como fonte de informação para essa Tese serão resumidos a seguir.

Nielsen, *et al.*, 1998 desenvolveram um método por HPLC para a determinação de quercetina em amostras de urina humana utilizando coluna de

comutação e detecção por fotometria de absorção no UV-vis. As amostras de urina foram hidrolisadas com o uso de enzimas e extraídas em fase sólida (C₁₈) antes da injeção no HPLC. Antes da eluição de quercetina e do padrão interno, fisetina, a partir da primeira coluna usada para a limpeza de amostra, a válvula foi comutada para a segunda coluna para a realização da análise propriamente dita com limite de detecção de 5 ng mL⁻¹. O método foi aplicado para determinar o nível de quercetina (em urina) em 120 amostras relativas ao estudo do consumo humano de suco de frutas.

Wang, *et al.*, 2005 desenvolveram um método utilizando HPLC para determinar simultaneamente quercetina, kaemferol e isorametina adsorvidos em células de câncer de mama tratadas com ginkgo. Os flavonóides presentes nas amostras foram separados em uma coluna C₁₈ após extração simples com uma mistura de éter e acetona. A eficiência de extração média foi de cerca de 70%. O método validado apresentou um limite de quantificação (LOQ) para quercetina de 0,1 µM.

Xu, *et al.*, 2007, fabricaram eletrodos de nanotubos de carbono/poliestireno para uso como detectores amperométricos em eletroforese capilar (CE) na determinação de rutina e quercetina em *Flos Sophorae Immaturus*, uma planta fitoterápica de origem chinesa. Esse novo detector permitiu trabalhar em potenciais mais baixos e produziu melhoras na razão sinal-ruído. Além disso, o eletrodo exibiu resistência a incrustação de material na superfície do eletrodo (diminuição do efeito de memória) e melhorou a estabilidade a longo prazo com boa reprodutibilidade dos resultados. O limite de detecção (LOD) não foi descrito neste trabalho.

Kumar, *et al.*, 2009 demonstraram que o uso da microextração em fase sólida acoplado a HPLC produziu um método rápido, preciso, reprodutível e sensível para a determinação de miricetina e quercetina em soluções aquosas preparadas a partir de amostras de tomate, cebola, uva e vinho tinto. Limite de detecção melhorado foi de 24,7 pg mL⁻¹ para a quercetina.

1.4.1.2.

Trabalhos relacionados com MIP-Quercetina

Existem alguns trabalhos na literatura relatando o uso de MIP em análise de amostras contendo quercetina (a grande maioria abordando MIP como SPE).

Em 2001, Xie *et al.*, desenvolveram uma nova abordagem para extrair componentes ativos da folha de ginkgo usando MIP sintetizado a partir de

acrilamida (MF) e quercetina (MM). O solvente polar tetra-hidrofurano foi usado como porogêneo. A seletividade da extração foi avaliada por HPLC sendo a boa afinidade para estruturas análogas à quercetina (como a morina e a naringenina), o que demonstrou a possibilidade de extração direta de certos constituintes farmacológicos do ginkgo usando o MIP. O LOD não foi reportado no respectivo trabalho.

Molinelli *et al.*, 2002 desenvolveram uma nova abordagem usando SPE (cartuchos empacotados com MIP) para a pré-concentração de analitos visando a análise em bebidas. O MIP-QUE foi preparado utilizando 4-vinilpiridina como MF, EGDMA como reagente de ligação cruzada e AIBN como iniciador radicalar. As frações recolhidas foram analisadas por HPLC. A comparação dos resultados obtidos foi feita com cartuchos NIP aplicados como matriz SPE durante os experimentos de controle. O MIP permitiu a extração seletiva de quercetina de matrizes de vinho tinto, demonstrando o potencial de extração em fase sólida e seletividade e economia. O limite de detecção não foi reportado.

Ainda em 2002, Weiss *et al.*, publicaram um trabalho descrevendo MIP para a quercetina preparado por polimerização térmica. O desempenho do MIP foi avaliado por HPLC. O NIP também foi sintetizado e a boa capacidade de separação de quercetina em amostras complexas foi confirmada. O limite de detecção foi de $843 \mu\text{g L}^{-1}$.

Em 2006, Xia *et al.*, descrevem um procedimento simples para a síntese de MIP de quercetina utilizando ácido metacrílico como MF e pérolas de quitosana como matriz funcional. O polímero obtido foi avaliado por cromatografia líquida. O MIP exibiu uma maior seletividade para a quercetina em uma mistura de flavonoides. O polímero preparado apresentou alta capacidade de adsorção. Os modelos de adsorção de Freundlich e Langmuir também foram aplicados para descrever as isotermas de equilíbrio.

Song *et al.*, 2009 prepararam um MIP para quercetina pelo método de polimerização térmica utilizando a acrilamida como monômero funcional e EGDMA como reagente de ligação cruzada, na presença de quatro solventes diferentes (porogênicos), 1,4-dioxano, tetrahidrofurano e acetona. O desempenho seletivo do MIP foi avaliado através de análise por HPLC. Os resultados indicaram que o tipo de solvente teve grande impacto no reconhecimento da quercetina. O melhor solvente relatado foi o tetrahidrofurano. De acordo com a análise química quântica computacional o MIP obtido a partir do solvente polar poderia produzir melhor capacidade de reconhecimento molecular.

No mesmo ano, Song *et al.*, 2009 prepararam vários tipos de MIP (em diferentes proporções) através da polimerização térmica usando quercetina como MM, acrilamida como monômero funcional, EGDMA como reagente de ligação cruzada e tetrahidrofurano como solvente porogênico. Os MIP foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica. Investigações sistemáticas relativas às condições de síntese em detrimento do reconhecimento molecular foram realizadas. Análises revelaram que sítios de ligação foram formados nos polímeros de forma homogênea. Além de quercetina, dois outros compostos estruturalmente semelhantes foram utilizados (rutina e catecol) em testes de reconhecimento. Foi observado que o MIP exibiu a maior retenção para a quercetina. Por conseguinte, o MIP foi utilizado como sorvente SPE em amostras de *Cacumen platycladi* (extrato de uma planta chinesa), seguido por análise usando HPLC com detecção por fotometria de absorção no UV-vis. Os autores concluíram que a aplicação de MIP com elevada afinidade pela MM foi excelente para o reconhecimento de quercetina no extrato. O limite de detecção não foi mencionado.

Pakade, *et al.*, 2012 sintetizaram um MIP-quercetina com 4-VP e EGDMA usando diferentes solventes com o objetivo de formar MIP com alto reconhecimento para a molécula de quercetina em sistemas aquosos em temperatura elevada. Um MIP preparado a partir da mistura de três solventes (tetrahidrofurano, água e metanol) mostrou potencial na determinação de quercetina em cebola. As partículas do polímero, antes e após a lavagem foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho e análise termogravimétrica. A morfologia da superfície foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A capacidade de ligação do MIP foi investigada em duas temperaturas (25 e 84 °C). Parâmetros incluindo a influência do pH, o tempo de extração e capacidade de ligação foram avaliados. Experimentos realizados em temperatura mais elevadas mostraram que o MIP ainda manteve seletividade para a quercetina.

Em outro trabalho de 2012, López *et al.* utilizaram um MIP-quercetina para extração em fase sólida e pré-concentração de catequinas. O MIP foi preparado pelo método de polimerização térmica, usando 4-VP (4-vinil piridina como monômero funcional) e EGDMA. Uma mistura de acetona e acetonitrila foi utilizada como porogênico. Investigação sistemática da influência do monômero, reticulador, porogênico, bem como condições de polimerização sobre as propriedades do MIP foram realizadas. O MIP-quercetina foi avaliado de acordo com suas propriedades de reconhecimento seletivo para a quercetina e para compostos estruturalmente relacionados (catequina, galato de epigallocatequina e

tocoferol). Uma boa retenção foi observada para quercetina, catequina e galato de epigallocatequina. Características de adsorção e cinética foram avaliados para catequina que indicaram que o polímero sintetizado teve alta capacidade de adsorção e continha sítios homogêneos de ligação. A caracterização química e morfológica do MIP foi investigada por espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica e BET para a determinação da área superficial, diâmetro e volume dos poros, o que confirmou um elevado grau de polimerização. Contudo não foi seletivo somente para quercetina. Finalmente, o MIP foi aplicado com sucesso na limpeza e pré-concentração de catequinas em várias amostras naturais.

1.4.1.3. Albumina sérica bovina (BSA)

A BSA é empregada como proteína modelo em sistemas biomiméticos. Ela é a proteína mais abundante no sangue bovino (concentração típica de 50 mg mL⁻¹) e possui uma estrutura muito similar à estrutura da HSA (Human Serum Albumin), apresentando uma percentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76%. A BSA é constituída por uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios. Ela é carregada negativamente no pH 7,0 e sofre mudanças conformacionais no intervalo de pH entre 4 e 8 (Ferreira, 2009). A BSA representa cerca de 10% do total de proteínas do soro do leite bovino (Libardi, 2010).

As albuminas são caracterizadas pelo baixo número de triptofano e metionina, alto número de cisteína e aminoácidos carregados, ácido aspártico e ácido glutâmico, lisina e arginina (Ferreira, 2009). Elas são capazes de se ligar com diferentes compostos biologicamente ativos (fármacos, ácidos graxos, esteroides, corantes, etc) no corpo (Roy *et al.*, 2010). BSA e HSA diferem principalmente no teor de triptofano. Exceto por isso, a composição de ácidoaminos das duas proteínas são quase as mesmas. HSA tem um grupo triptofano na posição 214, enquanto que a BSA tem um grupo triptofano nas posições 134 e 212 (Mishra *et al.*, 2005).

Uma das maneiras significativas de transporte de drogas no sangue é a ligação destas com a albumina do soro. A capacidade de ligação da droga com a albumina do soro no sangue pode ter um impacto considerável sobre a distribuição, concentração livre e metabolismo de fármacos. Portanto, a interação

droga-proteína tem uma importância considerável em farmacologia e os parâmetros de ligação são úteis no estudo de farmacocinética. BSA é altamente estável e relativamente barata (Jayabharathi, 2011).

As proteínas são frequentemente consideradas como principais alvos para flavonóides terapeuticamente ativos. A pesquisa sobre interações droga-proteína representam um campo de interesse por causa da perspectiva de desvendar mecanismos de ação das drogas e da possibilidade de concepção de novos medicamentos (Liu *et al.*, 2010).

A albumina é produzida no fígado (entre 9 e 12 gramas diários) e tem como principais funções o transporte e a regulação da pressão osmótica sanguínea. Além do plasma que possui entre 30 e 40% do total, a albumina encontra-se ainda nos tecidos musculares e na pele (Completo, 2008).

Geralmente considera-se que as proteínas globulares, como a BSA, apresentam maior afinidade por superfícies hidrofóbicas, uma vez que a interação entre as partes hidrofóbicas da proteína e da superfície é suficiente para expulsar as moléculas de água situadas junto à superfície. Geralmente a superfície é mais hidrofílica e o interior mais hidrofóbica. No caso de uma superfície hidrofílica existe forte afinidade entre esta e a água adsorvida o que torna-se mais difícil a proteína substituí-la. No entanto a adesão da BSA não depende apenas da hidrofobicidade da superfície, como já demonstrado no estudo em que obteve forças de adesão da BSA a uma superfície mais hidrofílica. Estes resultados comprovam que existem outras forças como a electrostática e de Van der Waals, que influenciam no processo de adsorção (Completo, 2008).

Trabalhos sobre a interação BSA e quercetina foram descritos (Kitson, 2004; Mishra, *et al.* 2005, Dofour, *et al.*, 2005; Liu,*et al.*, 2010; Kaldas,*et al.*, 2005), porém em todos o interesse era a avaliação das propriedades do complexo BSA-quercetina. Nenhum dos trabalhos abordou essa interação da quercetina com a BSA do ponto de vista analítico quantitativo. Nesta Tesa tentou-se aliar o uso do MIP ao alto poder de sensibilidade e seletividade do complexo BSA-quercetina aplicado à determinação e quantificação de quercetina em matriz biológica. A interação BSA-quercetina induz a uma supressão do sinal fluorescente da proteína (BSA) devido a ligação ao seu domínio IIA (sítio hidrofóbico). Este sítio de ligação inclui o triptofano 212 cuja interação com os flavonóides é responsável pela sua supressão da fluorescência (Dangles *et.al*,1999).

1.4.1.3.1. Mecanismo de supressão de fluorescência

A diminuição de fluorescência pode ser o reflexo a uma variedade de processos. A supressão colisional (dinâmica) ocorre quando o fluoróforo, no estado excitado, é desativado (por transferência de energia) após contato com alguma outra molécula em solução (supressor). Neste caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental sem modificação na estrutura química das moléculas envolvidas no processo. Por outro lado, a diminuição de fluorescência também pode ocorrer pela formação de complexos estáveis não-florescentes entre o fluoróforo e a molécula supressora. Este mecanismo, denominado supressão (quenching) estática, ocorre no estado fundamental e não depende da difusão e/ou colisões moleculares. Neste caso, a relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração do supressor é facilmente determinada pelo cálculo da constante de associação para a formação do complexo (Equação 1) (Lakowicz, 2006).

$$K_{sv} = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (1)$$

onde $[F - Q]$ é a concentração do complexo, $[F]$ é a concentração do fluoróforo não-complexado, e $[Q]$ é a concentração do supressor (neste caso o analito). Se a espécie complexada não emite fluorescência, então a fração de fluorescência remanescente F_0/F é dada pela fração de fluoróforo total que não complexou. Considerando que a concentração total de fluoróforo $[F_0]$ é dada pela Equação 2, que substituída na Equação 1 tem-se a Equação 3 (Lakowicz, 2006).

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad (2)$$

$$K_{sv} = \frac{[F]}{[F][Q]} - \frac{[F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (3)$$

Ao substituir a concentração do fluoróforo pela intensidade de fluorescência, pode-se reorganizar a Equação 6 de modo a obter a Equação que é a Equação de Stern-Volmer.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad (4)$$

A relação entre a razão F_0/F e a concentração do supressor $[Q]$ é linear sendo a constante de supressão própria constante de associação dos complexos.

Apenas a medida da diminuição da fluorescência não permitem identificar a contribuição dos processos (dinâmico e/ou estático) na resposta de atenuação fluorescente. A medição do tempo de vida de fluorescência é o método mais definitivo para distinguir entre esses dois mecanismos. A supressão estática remove uma fração dos fluoróforos da observação. Nesse caso a fluorescência observada é apenas da fração não complexada (sem alteração no seu tempo de vida). Um método adicional para distinguir essas duas formas se supressão é através dos espectros de absorção do fluoróforo. A diminuição de fluorescência por colisões afeta apenas os estados excitados dos fluoróforos e, portanto, os espectros de absorção não se alteram. Entretanto a formação do complexo (estado fundamental) pode resultar em nítidas alterações no espectro de absorção do fluoróforo.

1.4.2. Kanamicina

Desde seu descobrimento, na década de 40, os antibióticos aminoglicosídeos são parte importante do arsenal terapêutico antibacteriano. Os estudos que culminaram com o descobrimento desta nova classe de antibióticos foram realizados no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade Rutgers, nos Estados Unidos. Em 1943, após examinar vários actinomicetos de solo, Waksman *et al.* isolaram uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância com a capacidade de inibir o crescimento do bacilo da tuberculose e de outros micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. A partir desse estudo a estreptomina foi isolada, o que deflagrou a descoberta uma série de novas substâncias com potencial antibacteriano, derivadas dos actinomicetos, assim como os aminoglicosídeos semi-sintéticos, amicacina e netilmicina derivados da kanamicina e sisomicina, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2006).

O nome aminoglicosídeo deve-se ao fato da molécula ser constituída por dois ou mais aminoácidos unidos por ligação glicosídica a uma hexose ou aminociclitol, que habitualmente está em posição central na estrutura molecular (Oliveira *et al.*, 2006). A kanamicina (2-(aminometil)-6-[4,6-diamino-3-[4-amino-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil) tetrahidropirano-2-il] oxi-2-hidroxi-ciclohexoxi]-tetrahidropirano-3,4,5-triol) é um antibiótico aminoglicosídeo polibásico que possui

atividade contra uma variedade de bactérias patogênicas (Alwarthan, *et al*, 1994). Por ser pouco absorvida pela mucosa gastrointestinal, a kanamicina é mais usada por via parenteral (intramuscular e endovenosa) atingindo níveis séricos máximos depois de 1 h da administração. A kanamicina não é metabolizada no organismo sendo excretada por filtração glomerular na forma ativa (Beviláqua *et al*, 2008) e sua ligação às proteínas plasmáticas é desprezível. A meia-vida da droga é de 3 a 4 h (chegando a 6 h em crianças), ela concentra-se nos rins por onde é eliminada, no fígado e nos fluídos corporais (pleural, sinovial e peritoneal). Ela não é encontrada nas secreções brônquicas nem no líquido prostático (Penildon, 2002).

A kanamicina (na forma de sulfato) é produzida unicamente por fermentação utilizando determinadas estirpes de *Streptomyces kanamyceticus*, sendo eficaz contra um largo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e, por isso, utilizada em medicina humana (Yu *et al*, 2009) e veterinária. A kanamicina é encontrada em diferentes formas como a majoritária kanamicina A e minoritárias kanamicinas B, C e D (Figura 7) (N.C.Megoulas *et al*. 2005; Y.H.Long *et al.*, 2003).

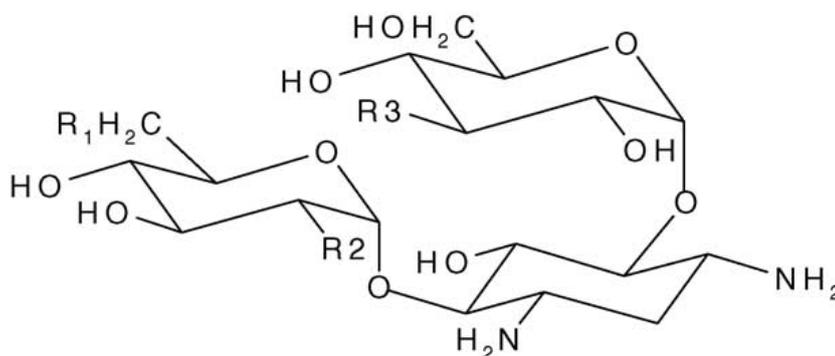


Figura 7 - Estrutura de kanamicinas (kanamicina A: R1=NH₂, R2=OH, R3=NH₂; kanamicin B: R1=NH₂, R2=NH₂, R3=NH₂; kanamicina C: R1=OH, R2=NH₂, R3=NH₂; kanamicina D: R1=NH₂, R2=OH, R3=OH).

A kanamicina atua impedindo a síntese protéica de micro-organismos, interferindo na leitura do código genético na etapa de replicação (Penildon, 2002). Suas Indicações terapêuticas são geralmente para infecções causadas por estafilococos, neissérias, *Mycobacterium tuberculosis* e enterobactérias. Ela é indicada principalmente em infecções sistêmicas (septicemias) ou localizadas (meningite, infecções urinárias) causados por bacilos Gram negativos. A associação com a penicilina G é sinérgica e aplicada no tratamento contra

pneumococos, *Streptococcus pyogenes*, clostrídios, *Bacteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, leptospira, micoplasmas, riquetsias, clamídias e fungos. (Penildon, 2002).

1.4.2.1.

Métodos para determinação de Kanamicina

Métodos analíticos disponíveis para a determinação de Kanamicina em várias matrizes são baseados em espectrofotometria, imunoensaio, electroforese capilar, cromatografia em fase gasosa, cromatografia em camada fina, e cromatografia líquida. Certamente, LC com detecção UV-vis ou fluorimétrica é a técnica dominante, mas devido à capacidade de absorção UV é necessária derivação pré-coluna ou pós-coluna (com fenilisocianato ou ftalaldeído). Métodos de LC baseados no índice de refração, espectrometria de massa por eletrospray, eletroquímica pulsada, com detecção fluorimétrica indireta também têm sido relatadas. O método de LC com base em detector eletroquímico pulsado foi adotado na recente edição da Farmacopéia EUA. No quadro de trabalho de rotina, os inconvenientes das técnicas de derivatização são amplamente reconhecidos (dependência de vários parâmetros experimentais, da reação de derivatização incompleto, a utilização de fases móveis carregadas de sais, prolongado tempo de análise, o custo adicional para o sistema de derivatização e reagentes) (Megoulas, 2005). Devido a todos esses inconvenientes das técnicas utilizadas para a determinação e quantificação da Kanamicina foi desenvolvido uma metodologia simples, rápida e sensível com as sondas fluorescentes de nanopartículas CdTe modificadas com ácido tioglicólico (CdTe-TGA).

1.4.2.2.

Febre amarela: doença e vacina

A febre amarela é uma doença causada por arbovírus, do gênero *Flavivírus*. A doença apresenta alta taxa de letalidade (70%), e apesar da existência de uma vacina disponível para sua prevenção, desde a década de 30, a febre amarela permanece até os dias de hoje como um problema real em saúde pública. Não há tratamento específico para a febre amarela: o vírus se multiplica rapidamente pelo organismo e atinge primeiramente o fígado, causando hepatite. Como consequência da insuficiência hepática, os fatores responsáveis pela coagulação do sangue se alteram e surgem então sangramentos (inclusive no cérebro) (Levy

et al.,1984). Existem dois ciclos epidêmicos bem definidos para a disseminação da febre amarela: o ciclo urbano e o silvestre. No ciclo urbano a transmissão ao homem é feita pelo mosquito *Aedes aegypti*, sendo a fonte de infecção o próprio homem. Já no ciclo silvestre, os macacos são as fontes de infecção, sendo a transmissão ao homem feita por meio de mosquitos silvestres de vários gêneros, como os gêneros de *Aedes* e *Haemagogus* (Joklik *et al.*,1985).

Entretanto a reinfestação do vetor urbano da doença no Brasil faz com que as autoridades em saúde pública entrem em estado de alerta no que diz respeito à reemergência da febre amarela urbana. Apesar do risco de reemergência, existe uma forma segura e eficaz de prevenção desta grave doença: a vacinação. A vacina contra a febre amarela é composta do vírus vivo de mesmo nome (febre amarela), na sua forma atenuada, de maneira a conferir imunidade ativa à doença.

A vacina é utilizada para a imunização ativa contra a febre amarela de adultos e crianças a partir dos seis meses de idade. É produzida através do cultivo de uma cepa atenuada do vírus da febre amarela, designada 17D, subcepa 17DD, em ovos embrionários de galinha livres de agentes patogênicos, de acordo com as normas estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A vacina é um produto liofilizado e deve ser reconstituído somente com o diluente estéril fornecido especificamente para esta finalidade. Como componentes formadores têm-se: glutamato de sódio, sorbitol, sacarose, eritromicina e kanamicina (Figura 8) e gelatina hidrolisada bovina (FIOCRUZ).

Os estabilizadores (glutamato de sódio, sorbitol, sacarose, gelatina) são adicionados de forma a preservar o vírus durante o processo de liofilização da vacina. A liofilização é um processo de estabilização no qual o produto em solução é primeiramente congelado e depois a quantidade de solvente, em geral água, é reduzida por sublimação e depois por dessorção, a valores que não permitam atividade biológica e minimizam reações químicas. Essa remoção de água é feita sob pressão reduzida e baixas temperaturas, sendo necessário proteger o vírus durante o processo. Depois de liofilizada, a vacina tem um prazo de validade de dois anos.

Os preservativos são substâncias adicionadas à vacina de forma a impedir sua contaminação, não só durante seu processo produtivo como também durante seu uso nos postos de saúde. Como dito anteriormente, os antibióticos são preservativos essenciais. No caso da vacina contra a febre amarela, são adicionados os antibióticos eritromicina e kanamicina.

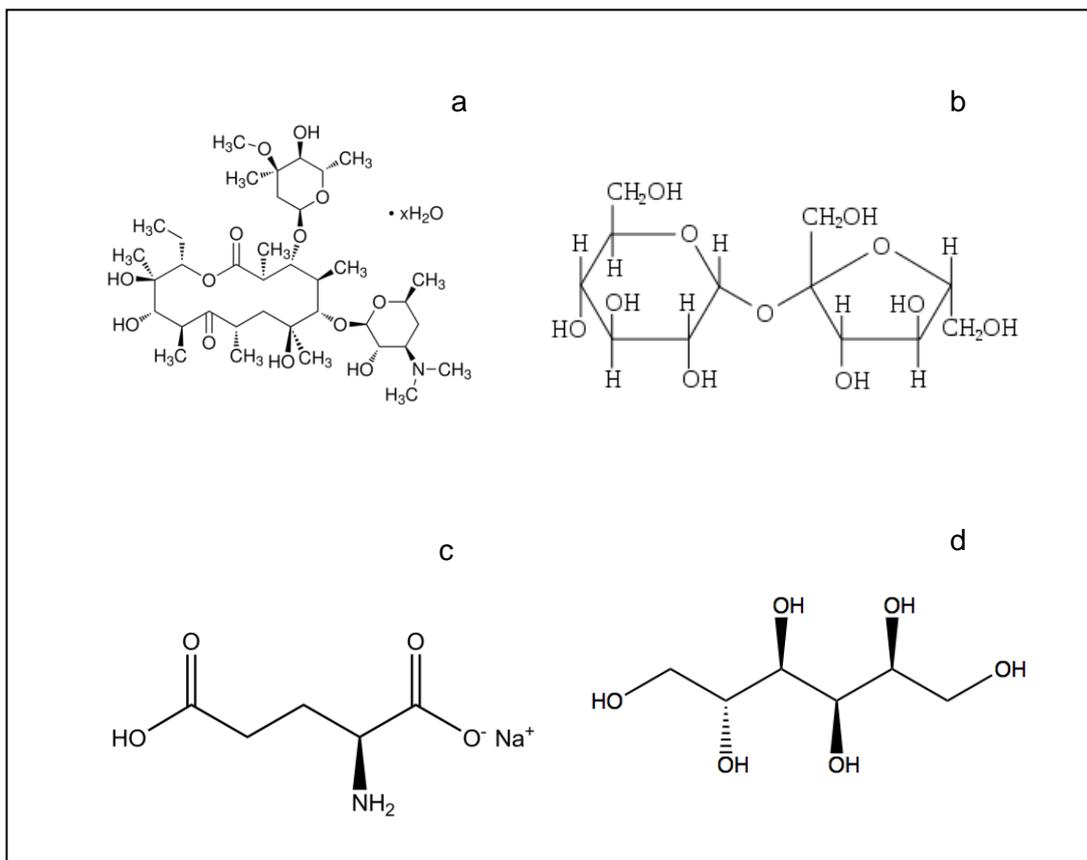


Figura 8 - Estruturas química da eritromicina (a), da sacarose (b), glutamato de sódio (c) e sorbitol (d).

1.4.2.3. Sonda fluorescente Quantum Dots (QDs)

Considerando-se que os trabalhos reportados na literatura para determinação e quantificação da kanamicina são extremamente complexos e trabalhosos, vislumbou-se a possibilidade da utilização da sonda fluorescente CdTe-TGA QDs como um método simples e eficaz para quantificação da Kanamicina. A ausência de elétrons π deslocalizados na estrutura da KANA é um forte indício da ausência de fluorescência natural dessa molécula. Portanto, é preciso induzir a fluorescência (na kanamicina) por meio de algum artifício. Neste trabalho foi usado um método com CdTe-TGA QDs.

Nanocristais de materiais semicondutores também são conhecidos como pontos quânticos (QDs), encontram-se em escala nanométrica e os diâmetros das esferas variam de 2 a 15 nm. Os QDs foram introduzidos no novo campo de aplicação das ciências da vida e da medicina, incluindo estudos da biologia

molecular e celular, de nanobiosensores híbrido, sistemas de distribuição de drogas, imagem biométrica e de diagnósticos de câncer (Totomstis, 2009).

QDs apresentam a vantagem de possuir um amplo espectro de absorção, perfil de emissão (fluorescência) estreito e simétrico, intensidade de fluorescência elevada e boa fotoestabilidade, estas são características importantíssimas (Jhonsi, 2011). Portanto, os QDs são muito utilizados como sensores ópticos para determinação das mais diversas substâncias. Em relação ao processo de síntese existem muitas abordagens, contudo a rota de obtenção em meio aquoso produz QDs com excelente qualidade e estabilidade (Duan J. *et al*,2009).

1.4.2.4.

Trabalhos descrevendo determinação de kanamicina

O método oficial para a quantificação de kanamicina em produtos farmacêuticos, alimentos e em fluidos biológicos é um método microbiológico que é demorado, e apresenta baixa detectabilidade e precisão ruim (Megoulas *et al.*, 2005).

Mays *et al.*, 1976 desenvolveram um método usando HPLC para a determinação de kanamicina A e B. Os componentes das amostras foram separados num permutador de cátions (cromatografia de troca iônica) e monitorados por fluorescência utilizando-se de derivatização química pós-coluna em linha com fluorescamina em acetona, 2-mercaptoetanol, etanol e tampão borato. O mesmo método foi aplicado na determinação de outros antibióticos como a ampicilina e amicacina.

Em 1994, Abdulrahman *et al.*, desenvolveram um método para a determinação de kanamicina por quimioluminescência (não foi mencionado o comprimento de onda de detecção) usando a lucigenina. O método baseou-se no efeito inibidor que a kanamicina tem sobre a reação de lucegina em meio básico contendo peróxido de hidrogênio. O efeito das concentrações dos reagentes foi estudado e as condições de reações discutidas. Os resultados obtidos para o ensaio com preparações comerciais em comparação com outros métodos conhecidos mostraram boa precisão até $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de detecção foi de $1,0 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$.

Kim *et al.*, 2001 descreveram um método por HPLC para a determinação de kanamicina em vacina contra a varicela. Este método envolveu um procedimento de derivatização com fenilisocianato e trietilamina com detecção em 240 nm. O

método cromatográfico desenvolvido apresentou boa especificidade, exatidão e precisão e o limite de detecção foi de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Kaale *et al.*, 2001 desenvolveram e validaram um método usando eletroforese capilar para a determinação de sulfato de kanamicina com detecção por fotometria de absorção UV-vis após derivatização pré-capilar. Esse método foi usado também para separar oito substâncias similares a kanamicina. A derivatização foi feita usando ácido 1,2-benzoldicarboxílico e ácido tioglicólico. Estratégias para aumentar a seletividade e otimizar os parâmetros de separação envolveram a aplicação de planejamentos experimentais. A análise quantitativa produziu resultados satisfatórios com limite de detecção de $0,0003 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ para o limite de quantificação.

Long *et al.*, 2003, desenvolveram um método baseado em eletroforese capilar com SPE e derivação química do analito, já que o mesmo não possui absorvidade molar suficiente para se permitir detectá-la por fotometria de absorção a 335 nm. A kanamicina foi isolada a partir do soro humano usando SPE. Uma mistura de tampão borato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 10,5)/metanol (50:50 v/v) foi utilizada como solvente de eluição do analito. Após derivatização química pré-capilar com orto-ftalaldeído/ácido mercapto acético, a amostra foi analisada por eletroforese capilar usando tampão borato pH 10 como eletrólito de corrida e metanol como modificador químico. O método foi aplicado em análise de kanamicina em soro de pacientes com tuberculose. O limite de detecção de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o de quantificação de $5,0 \mu\text{g/mL}$ foram obtidos numa faixa de 5,0 a $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Yu *et al.*, 2009 propuseram um método de determinação de antibióticos aminoglicosídicos da kanamicina, amicacina e de tobramicina no leite por eletroforese capilar com derivação química pós-coluna usando L naftaleno-2, 3-dicarboxaldeído e 2- mercaptoetanol em tampão tetraborato de sódio e metanol. A detecção foi por fluorescência induzida com laser. As amostras de leite foram passadas através de pré-tratamento com ácido tricloroacético. Os limites de detecção e quantificação dos aminoglicosídeos ($7,0 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ e $2,1 \times 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ para a kanamicina) foram inferiores ao estabelecido pela agência de medicina européia.

1.4.3. Piraclostrobina

Os atuais sistemas agrícolas do Brasil têm maximizado sua produção através do uso de pesticidas e de irrigação adequada (Juliatti, 2005). Recentemente, tem-se observado o maior uso de pesticidas nas culturas da soja, algodão, milho, café e de hortaliças, para evitar epidemias como cercosporiose do milho, ferrugem da soja, e a mancha de ramulária do algodoeiro (Juliatti, 2005).

Entre os agrotóxicos mais utilizados a maioria deles possuem substâncias altamente perigosas a saúde e a vida humana e de outros seres vivos, de tal sorte que a OMS – Organização Mundial da Saúde, juntamente com a FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação insistiram na necessidade de serem adotadas regras para a venda e para a manipulação desses agrotóxicos, como forma de precaver o homem das possíveis conseqüências, a curto, médio e longo prazo, pois segundo estudos da OMS, cerca de 3% dos trabalhadores que são expostos aos agrotóxicos acabam sofrendo alguma forma de intoxicação, estimando-se que ocorram cerca de 3 milhões de casos anualmente no mundo todo, destes 700 mil com distúrbios neurológicos e outros efeitos adversos, outros 80 mil apresentam câncer e outras 220 mil casos com a morte dos usuários (<http://meioambiente.culturamix.com/agricultura/agrotoxicos-e-pesticidas> página acessada dia 20/10/2012).

Mesmo sabendo de todas as conseqüências do uso dos agrotóxicos o Brasil ainda não dispõe de uma política de educação e saúde voltada a conscientização dos trabalhadores rurais sobre os riscos eminentes no uso dessas substâncias. Os seios problemas de saúde causados pelos agrotóxicos não se restringem somente aqueles que manuseiam diretamente com os produtos, pilotos de aviões, moradores de pequenas cidades próximas a zonas de lavouras também podem ser atingidos por nuvens de pesticidas trazidas pelo vento, num fenômeno denominado pulverização por deriva. As conseqüências do uso e do contato com os agrotóxicos e pesticidas podem trazer graves conseqüências, contaminando também os recursos hídricos. Portanto projetos educacionais que abordem diretamente sobre a necessidade de adotar medidas de segurança no seu manuseio, e sobre os riscos a saúde, que podem ser desde uma intoxicação até o desenvolvimento de doenças graves e a morte, são essenciais para orientar e conscientizar esta população

(<http://meioambiente.culturamix.com/agricultura/agrotoxicos-e-pesticidas> página acessada dia 20/10/2012).

Os pesticidas agrícolas, por concepção, são produtos destinados ao manejo de fitopatógenos, tendo como objetivo fundamental provocar a morte destes micro-organismos, reduzindo suas populações a níveis tais que não interferiram nem na qualidade nem na quantidade agrícola dos produtos cultivados (Rodrigues, 2009). Os pesticidas (fungicidas) da classe das estrobilurinas foram substâncias naturais primeiramente isoladas de cogumelos (basidiomicetes). O nome da classe é derivado dos cogumelos do gênero *Strobilurus* (Souza, 2008).

Essas estrobilurinas naturais foram os compostos de partida para produção de estrobilurinas sintéticas (azoxistrobina, kresoximmetil, trifloxistrobina, fluoxastrobina, piraclostrobina, picoxistrobina e dimoxistrobina) que são mais estáveis e mais potentes quando usados comercialmente na agricultura para controle de fungos (Souza, 2008). As estrobilurinas atuam preventivamente inibindo a germinação de esporos, apresentando alguma ação curativa e inibindo o desenvolvimento dos fungos nos estágios iniciais de pós-germinação. Este grupo de fungicidas atua através da inibição da respiração mitocondrial através do bloqueio de transferência de elétrons dentro da cadeia respiratória, que por sua vez faz com que importantes processos celulares bioquímicos sejam gravemente afetados, assim como os resultados na cessação do crescimento fúngico (Lagunas-Allué *et al.*, 2012). As moléculas são absorvidas pelas folhas de forma gradual e constante, conferindo uma proteção na superfície por tempo mais prolongado e difundindo-se pela folha, com algumas apresentando uma distribuição sistêmica uniforme. Esses pesticidas são eficientes contra um grande número de fitopatógenos, em todas as classes de fungos, mesmo quando aplicados em baixas concentrações, permitindo um maior intervalo entre as aplicações (Rodrigues, 2009). Na Figura 9 são mostradas as estruturas dessas estrobilurinas.

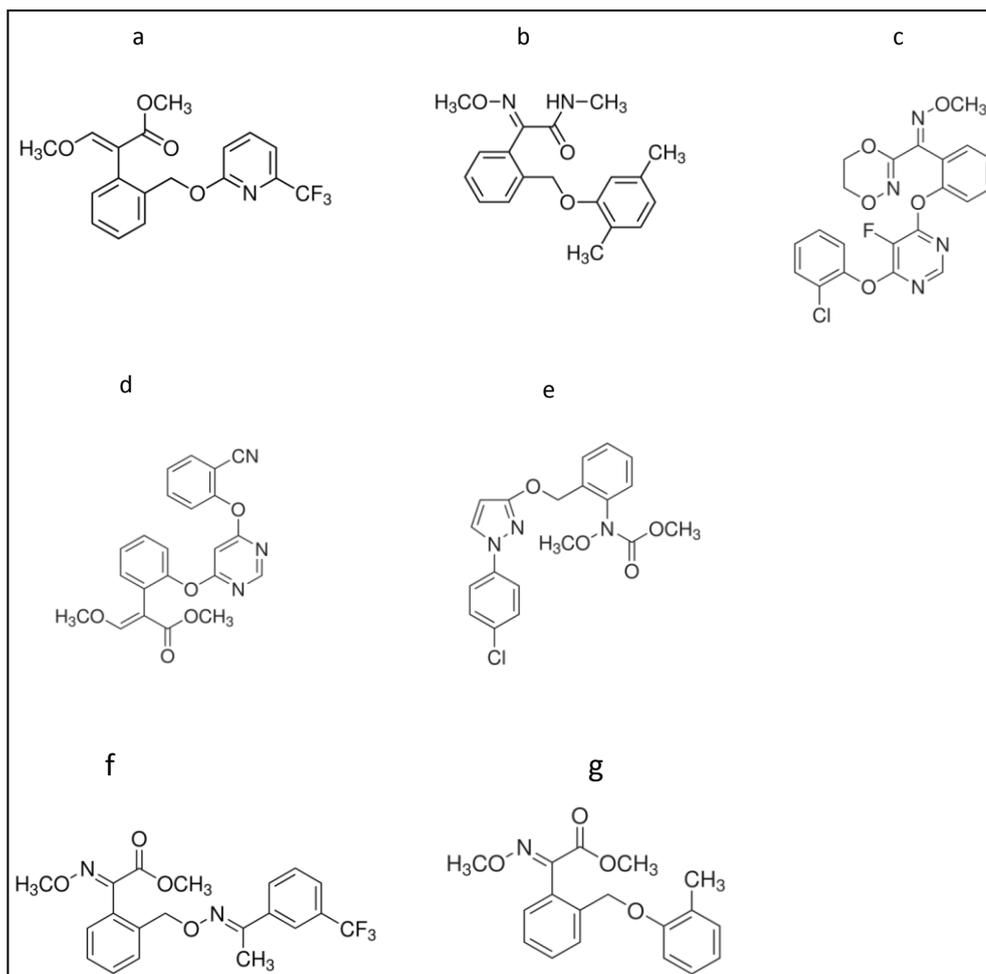


Figura 9- Estrutura dos pesticidas: (a) picoxistrobina, (b) dimoxistrobina, (c) fluoxastrobina, (d) azoxistrobina, (e) piraclostrobina, (f) trifloxistrobina e (g) kresoximmetil.

Piraclostrobina (metil-N-2-[1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-3-yloximetil]fenil(N-metoxi)-carbamato foi desenvolvida pela BASF em 2000. Sozinha ou em combinação com outros fungicidas, ela é capaz de proteger plantações de morango, pimenta, tomate e cereais de doenças fúngicas (You *et al.* 2009).

Na Tabela 2 é mostrado o extenso uso agrícola da piraclostrobina. Recentemente, foram avaliados os reflexos do controle da produção do tomateiro e foi relatada que em tratamentos onde foram pulverizados os fungicidas piraclostrobina e azoxistrobina, sempre foi verificada uma tendência para se colher um número maior de frutos sadios. Tal fato é justificado por evidências que as estrobilurinas, além de atuarem diretamente sobre o patógeno, apresentam efeitos secundários altamente benéficos à planta, tais como a redução da produção de etileno, o aumento da atividade da enzima nitrato redutase, o atraso

na senescência, uma maior resistência ao estresse hídrico e o aumento no teor de clorofila (Rodrigues, 2009)

Tabela 2 - Uso agrícola da piraclostrobina em diversas culturas (Resolução RE nº 227 de 20/01/11 (DOU de 21/01/11)).

<i>Culturas</i>	<i>Modalidade de emprego (aplicação)</i>	<i>LMR (mg kg⁻¹)</i>	<i>Intervalo de segurança</i>
Algodão	Foliar	0,2	7 dias
Alho	Foliar	0,1	7 dias
Amendoim	Foliar	0,1	14 dias
Aveia	Foliar	1,0	30 dias
Banana	Foliar	0,5	3 dias
Batata	Foliar	0,01	3 dias
Batata	Sulco de plantio	0,01	(1)
Café	Foliar	0,5	45 dias
Cana de açúcar	Foliar	0,1	30 dias
Cana de açúcar	Tolete (plantio)	0,1	(1)
Cebola	Foliar	0,5	7 dias
Cenoura	Foliar	0,2	7 dias
Cevada	Foliar	1,0	30 dias
Citros	Foliar	0,5	14 dias
Crisântemo	Foliar		U.N.A.
Feijão	Foliar	0,1	14 dias
Maça	Foliar	2,0	14 dias
Mamão	Foliar	0,1	7 dias
Manga	Foliar	0,1	7 dias
Melancia	Foliar	0,1	7 dias
Melão	Foliar	0,1	7 dias
Milho	Foliar	0,1	45 dias
Pepino	Foliar	0,05	7 dias
Pimentão	Foliar	1,0	3 dias
Rosa	Foliar		U.N.A.
Soja	Foliar	0,1	14 dias
Soja	Sementes	0,1	(1)
Tomate	Foliar	0,2	1 dia
Trigo	Foliar	0,5	30 dias
Uva	Foliar	2,0	7 dias

(1) Intervalo de segurança não determinado devido à modalidade de emprego

U.N.A. = Uso não alimentar; LMR = Limite Máximo de Resíduo de pesticida

1.4.3.1.

Métodos analíticos para determinação de piraclostrobina

Vinas, *et al.*, 2009 propuseram um método com uso mínimo de solvente para a determinação sensível de sete fungicidas da classe das estrobilurinas (azoxistrobina, metominostrobin, cresoxim-metil, trifloxistrobina, picoxistrobina, dimoxistrobina e piraclostrobina) em amostras de alimentos para bebês. Microextração com imersão direta da fase sólida na amostra e determinação por GC-MS. O método de adição padrão foi recomendado. As recuperações obtidas para amostras fortificadas foram satisfatórias para todos os fungicidas.

Souza *et al.*, 2009 desenvolveram um trabalho usando cromatografia eletrocínica capilar micelar para a determinação de piraclostrobina e picoxistrobina. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de urina fortificadas com os analitos. O limite de detecção para a piraclostrobina foi $5,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ enquanto o da picoxistrobina foi $2,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Teste de recuperação foram feitos em amostra de urina fortificada com os pesticidas e as médias das recuperações para piraclostrobina e picoxistrobina foram $75 \pm 4\%$ e $109 \pm 9\%$ respectivamente.

Gonzales-Rodríguez *et al.*, 2009 desenvolveram um método usando cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa para a determinação de 11 fungicidas da nova geração (benalaxil, benalaxil-M, boscalide, ciazofamida, famoxadona, fenamidona, fluquinconazol, iprovalicarbe, piraclostrobina, trifloxistrobina e zoxamide) em uvas e vinhos. As amostras foram extraídas com acetato de etila: hexano (1:1 %v/v), limpas e eluídas em um cartucho GCB/PSA (carbono grafitizado/Amina primária secundária). O eluente usado foi acetonitrila:tolueno (3:1 %v/v). A precisão do método foi inferior a 16% para todos os fungicidas. Limites de detecção e quantificação foram inferiores a $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ou mg L^{-1} , exceto para ciazofamida. Os valores encontrados nas amostras foram muito menores, em todos os casos, que os níveis de resíduos máximos (LMR) dos fungicidas estabelecidos pela União Europeia para as uvas (Suíça e Itália), para os vinhos obteve-se os valores de 0,05 e 2,0 mg/Kg para a piraclostrobina.

Filho, *et al.*, 2010 desenvolveram um método para a determinação simultânea de 14 resíduos de pesticidas (clofentezina, carbofurano, diazinon, metil paration, malation, fention, tiabendazol, imazalil, bifentrina, permetrina, procloraz, piraclostrobina, difenoconazol e azoxistrobina) em mangas. O método baseou-se na microextração em fase sólida (SPME) seguido de cromatografia em fase

gasosa com detecção por espectrometria de massa. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a extração com fibra de poliácrlato após imersão direta a 50 °C durante 30 min. A dessorção foi feita por 5 min a 280 °C. O método foi validado utilizando amostras fortificadas com pesticidas em níveis de concentração variando de 33,3 a 333,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As recuperações médias para o menor nível de concentração variou de 71,6 a 117,5%, com desvios padrão relativos entre 3,1 e 12,3%. O método foi aplicado em amostras de manga e todas apresentaram quantidades dos pesticidas bifentrina e azoxistrobina em concentrações de 18,3 a 57,4 e 12,7 a 55,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Estes valores estavam abaixo do LMR estabelecido pela legislação brasileira.

Francesc *et al.*, 2011 desenvolveram o primeiro suporte de imunoafinidade para a extração de fase sólida de resíduos de piraclostrobina em alimentos. Três anticorpos monoclonais (anti-PY mAbs) foram avaliados para a produção de colunas cromatográficas de imunoafinidade utilizando géis de Sepharose para imobilização covalente de anticorpos. A coluna foi usada para a extração de resíduos de piraclostrobina de suco de frutas e posterior determinação por HPLC com detecção por fotometria de absorção UV-Vis. Um fator de pré-concentração de 50 vezes foi conseguido e um limite de quantificação de 0,01 mg L^{-1} foi alcançado.

Lagunas-Allué *et al.*, 2012 desenvolveram um método simples e de baixo custo com base no uso de SPE e determinação por GC-MS para os pesticidas, tais como vinclozolina, diclofluanida, penconazol, captan, quinoxifena, fluquinconazole, boscalide e piraclostrobina em uvas. As variáveis experimentais que afetam o método, tais como a quantidade da fase sólida de cartuchos C_{18} , natureza do solvente e o volume de eluição foram otimizados por meio de um planejamento experimental. Os efeitos de interferência de matriz foram eliminados usando padrões preparados em matriz (assemelhamento de matriz). As recuperações de pesticidas nas amostras de uvas foram maiores que 80%, exceto para captan. As incertezas expandidas em dois níveis de concentração foram menores que 20% para todos os analitos.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver polímeros de impressão molecular preparados a partir de matrizes acrílicas e sol-gel de forma a aplica-los em procedimentos de extração em fase sólida (SPE) e na determinação seletiva de quercetina, piraclostrobina e kanamicina em diferentes amostras. Para possibilitar as determinações, novas abordagens espectroscópicas, em especial na fluorescência, foram propostas.

1.5.2. Objetivos específicos

- Sintetizar um polímero de impressão molecular (MIP) seletivo e um polímero não-impresso (NIP) usando como molécula molde quercetina.
- Sintetizar também dois polímeros inéditos na literatura com a impressão molecular de piraclostrobina e kanamicina.
- Fazer as caracterizações químicas e morfológicas dos polímeros obtidos.
- Otimizar as condições de uso dos polímeros como sorventes na extração em fase sólida (SPE).
- Utilizar a sonda fluorescente BSA na determinação de QUE e aplicá-la na quantificação de QUE em matriz biológica.
- Desenvolver uma metodologia para a determinação de kanamicina utilizando sonda fluorescente CdTe-TGA QDs e aplicá-la na sua quantificação.
- Aplicar os polímeros em análises de diversas amostras: água de rio, urina humana, vacina e suplemento alimentar, bem como na limpeza dessas matrizes.
- Avaliar a seletividade das substâncias-alvo na presença de seus interferentes.
- Comparar os métodos propostos espectrofluorimétricos e espectrofotométricos com o método HPLC.
- Validar os métodos desenvolvidos.

- Estabelecer a pesquisa que envolve a síntese e aplicação de polímeros de impressão no laboratório de espectroanalítica e eletroanalítica aplicada (LEEA) da PUC-Rio.