

Universidade Federal de Itajubá
Instituto de Física e Química
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Síntese e estudo de um polímero de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymer, MIP*) usando bisfenol A como molécula molde para aplicação em extração em fase sólida (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction, MISPE*)

Alessandra Carolina da Costa

Itajubá, setembro de 2017

Universidade Federal de Itajubá
Instituto de Física e Química
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Alessandra Carolina da Costa

Síntese e estudo de um polímero de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymer, MIP*) usando bisfenol A como molécula molde para aplicação em extração em fase sólida (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction, MISPE*)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sandro José de Andrade

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Soares Silva

Setembro de 2017

Itajubá

Universidade Federal de Itajubá
Instituto de Física e Química
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Alessandra Carolina da Costa

Síntese e estudo de um polímero de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymer, MIP*) usando bisfenol A como molécula molde para aplicação em extração em fase sólida (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction, MISPE*)

Dissertação aprovada por banca examinadora em 24 de outubro de 2017, conferindo à autora o título de *Mestre em Química em Nome do Programa Multicêntrico em Química*.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sandro José de Andrade (Orientador)

Prof. Dr. Flávio Soares Silva

Prof.^a. Dr.^a. Claudia Torres

Prof. Dr. Marcos Roberto de Abreu Alves

Itajubá

2017

Aos meus pais, minha madrinha Cidinha, minha irmã Edna, minha sobrinha e amiga Rafaella e ao meu migo Marcus pela compreensão, carinho e apoio na elaboração deste trabalho.

Agradecimentos

À Deus, por me permitir mais esta conquista e por me dar força e coragem para sempre seguir em frente.

Aos Profs. Drs. Sandro José de Andrade e Flávio Soares Silva pela excepcional orientação, sempre compartilhando seus ensinamentos e experiências. Obrigado pela amizade, confiança e conselhos.

Obrigado aos outros docentes do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química e da UNIFEI pelos ensinamentos e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial a Profa. Dra. Maria Elena pela contribuição, prontidão, amizade para a realização desse trabalho.

Obrigado ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ancelotti Junior e os técnicos Paulo e Olívia por disponibilizar o laboratório de Núcleo de Tecnologia em Compósitos-NTC para realização da análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Obrigado à coordenação local do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química UNIFEI. E agradeço também a Rede Mineira de Química, Minas Gerais.

Aos técnicos administrativos do Laboratório de Química Aline, Glauber, Rodrigo e Tarcísio, do Laboratório do IRN João Luís e Raphael Felca, do Laboratório de Caracterização Estrutural Marcos Cirilo e Jonas Mendes pela prontidão em ajudar e pela paciência.

À aluna de doutorado Luziane do Programa de Pós-graduação de Materiais para Engenharia pela ajuda nas análises de FTIR com pastilhas de KBr.

Aos amigos do laboratório de química analítica ambiental pelas inúmeras ajudas concedidas. Obrigado Bianca e Patrícia pela prontidão, amizade e diversas contribuições.

Aos meus pais José e Maria que sempre me aconselharam e incentivaram a seguir o caminho do conhecimento. Obrigado pelo amor, afeto, carinho, auxílio materiais e tudo o que foi cultivado durante a minha jornada. Obrigado aos meus irmãos, em especial minha irmã Edna e minha sobrinha

Rafaella pelo amor, brigas, incentivo, convivência e conselhos durante todos os momentos, bons ou ruins.

Obrigado à minha madrinha Cidinha pelo amor, incentivo, convivência, conselho e paciência. E obrigado a todos os outros familiares.

Aos meus amigos da UFOP e Ouro Preto, Jaqueline, Patrícia, Pollyanna que apesar de estarem longe sempre estão presentes nas minhas decisões. Mas em especial, ao meu “migo” Marcus pela amizade, apoio, companheirismo e conselhos.

Epígrafe

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”

Martin Luther King

Resumo

Para otimizar o processo de síntese do polímero de impressão molecular (MIP) foi realizado um planejamento de triagem estatística Box-Behnken codificados em três níveis, sendo, baixo, médio e alto (-1, 0 e +1) e três fatores, sendo, tipo de solvente, tempo de reação e velocidade de agitação. A técnica cromatográfica utilizada foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector por Fluorescência (FLD), validada e otimizada de acordo com as figuras de mérito (seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação). Para a síntese do MIP, em uma ampola de síntese adicionou-se o BFA como molécula-molde (do inglês *Template*), ácido metacrílico (MAA) como monômero funcional, o solvente acetonitrila, clorofórmio ou tolueno, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) como agente de ligação cruzada e o 4,4'-azo-(ácido-4-cianoaléico) (AACV) como iniciador radicalar. Também foi realizado a síntese de um polímero não impresso (NIP) ausente de molécula molde BFA. Após testes prévios da adsorção e de seletividade dos MIPs empacotados em cartucho de extração em fase sólida foram selecionados os melhores materiais poliméricos para estudos posteriores. O MIP sintetizado apresentou aparência de polímero amorfo, aspectos esbranquiçados e uma estrutura aparentemente rígida. A recuperação do MIP ficou compreendida na faixa de 77,20 – 87,54% com um coeficiente de variação (CV) inferior a 10%. A recuperação do polímero não impresso foi inferior à do MIP. A quantidade remanescente de molécula-molde presente no MIP foi inferior a 1% indicando que a técnica por extração Soxhlet utilizada para a remoção da molécula-molde foi eficiente. A seletividade do MIP e NIP otimizado foi comparada com o composto fenol que se mostrou seletivo para o MIP e NIP com uma recuperação de 48,20% (MIP) e 48,25% (NIP) com CV inferior a 45%.

Os materiais poliméricos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica por varredura (MEV), analisador de tamanho de partículas, analisador de área superficial e porosidade por adsorção/dessorção com nitrogênio pelo método B.E.T, análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Palavras-chaves: Planejamento Box-Behnken MIP, NIP, BFA, EFS e validação da metodologia analítica.

Abstract

In order to optimize the Molecularly Imprinted Polymer (MIP) synthesis process, a three-level low, medium and high (-1, 0 and +1) coded screening of Box-Behnken statistical triage was performed and three solvent type, reaction time and stirring factors were used. The chromatographic technique used was High Performance Liquid Chromatography (HPLC), with Fluorescence Detector (FLD), validated and optimized according to the merit figures (selectivity, sensitivity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection and limit of quantification).

For the synthesis of MIP, BPA was added as template molecule, methacrylic acid (MAA) as functional monomer, solvent acetonitrile, chloroform or toluene, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as the cross-linking agent and 4,4'-azo- (4-cyanovaleric acid) (AACV) as the radical initiator. Synthesis of a non-printed polymer (NIP) absent from BFA template molecule has also been performed. After previous tests of the adsorption and selectivity of the MIPs packaged in the solid phase extraction cartridge, the best polymer materials were selected for further studies. The MIP synthesized showed the appearance of amorphous polymer, whitish aspects and a seemingly rigid structure. The MIP showed a recovery in the range of 77,20 – 87,54% with a coefficient of variation (CV) of less than 10%, while the Non-Imprinted Polymer (NIP) a recovery lower than the MIP. And the remaining amount of *template* molecule present in the MIP was less than 1% indicating that the Soxhlet extraction technique used for the removal of the template molecule was efficient. The selectivity of optimized MIP and NIP was compared to the phenol compound which was selective for MIP and NIP with a 50% recovery with CV less than 45%. The polymer materials were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), particle size analyzer, surface area analyzer, and nitrogen adsorption / desorption porosity (BET method), thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC).

Keywords: Design Box-Behnken, MIP, NIP, BPA, SPE and validation of analytical methodology.

Listas de figuras

Figura 1. 1- Distribuição da água no mundo	1
Figura 3. 1- Glândulas que compõem o sistema endócrino humano	9
Figura 3. 2- Representação esquemática dos mecanismos de ação dos hormônios no sistema endócrino	11
Figura 3. 3- Principais rotas de transporte dos IEs para os mananciais	12
Figura 3. 4- Estrutura química do bisfenol A	15
Figura 3. 5- Síntese do bisfenol A	16
Figura 3. 6- Fórmula estrutural do policarbonato e da resina epóxi	17
Figura 3. 7- Média geométrica de concentração BFA ($\mu\text{g L}^{-1}$) na urina das pessoas testadas	19
Figura 3. 8: Principais vias de biotransformação do BFA em roedores e humanos: (a) conjugação com ácido glicurônico e (b) conjugação com sulfato	20
Figura 3. 9- Formatos empregados em EFS	27
Figura 3. 10- (a) Esquema mostrando a formação de um nanotubo de carbono, a partir de uma camada, formada por anéis aromáticos, que se enrola entre si dando origem a uma estrutura tubular; (b) Esquema genérico da síntese de MIP: MF: monômero funcional; MM: molécula modelo; e ALC: agente de ligação cruzada. (c) Esquema ilustrativo dos mecanismos de exclusão das fases RAM, onde as pequenas moléculas aparecem interagindo com a fase ligada à superfície interna e as macromoléculas são excluídas pelas barreiras físicas ou químicas.	29
Figura 3. 11- Etapas da extração em fase sólida (EFS).....	25
Figura 3. 12- Equipamento de extração em fase sólida usando Manifold	27
Figura 3. 13- Esquema genérico de formação de um polímero	32
Figura 3. 14- Esquema genérico da síntese do MIP.....	35
Figura 3. 15- Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada, usualmente empregados na síntese de MIP.....	39
Figura 3. 16- Estrutura química dos iniciadores radicalares mais empregados na síntese de MIP ...	40
Figura 3. 17- Representação da formação do complexo MAA-BFA	41
Figura 3. 18- Tipos de ligação na impressão molecular: A) Impressão não covalente; e B) Impressão covalente/semi covalente.....	43
Figura 3. 19- Esquema genérico da síntese do MIP via polimerização por radicais livres.....	44
Figura 3. 20- Diagrama estrutural das aplicações de MIPs em técnicas de preparo de amostras, cromatografia e sensores	48
Figura 3. 21: (a) Modelo de experimentos com duas variáveis; (b) Modelo de experimento de três variáveis.....	58
Figura 3. 22- Modelo Box-Behnken	59
Figura 4. 1-Esquema genérico da síntese do MIP	65
Figura 4. 2- Esquema genérico da remoção da molécula molde por extração Soxhlet	67
Figura 4. 3- Esquema genérico do processo de EFS dos polímeros sintetizados	68
Figura 4. 4- (a) Demonstração de adsorção em uma única camada (Teoria de Langmuir) e (b) modelo de multicamadas por B.E.T.	73
Figura 4. 5: Representação esquemática da curva linear do método B.E.T.....	74

Figura 5. 1- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo DAD 220 nm	75
Figura 5. 2- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo DAD 228 nm	76
Figura 5. 3- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo DAD 280 nm	76
Figura 5. 4- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo FLD	77
Figura 5. 5- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo DAD a 220 nm	78
Figura 5. 6- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo DAD a 228 nm	79
Figura 5. 7- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo DAD a 280 nm	79
Figura 5. 8- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo FLD a 275/300 nm	80
Figura 5. 9- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 220 nm	82
Figura 5. 10- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 228 nm	82
Figura 5. 11- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 280 nm	83
Figura 5. 12- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo FLD (275/300 nm)	83
Figura 5. 13- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 220 nm	84
Figura 5. 14- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 228 nm	84
Figura 5. 15- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 280 nm	85
Figura 5. 16- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo FLD (275/300 nm)	85
Figura 5. 17- Fotografia do MIP formado após secagem e moagem	91
Figura 5. 18- Os 15 MIPs sintetizados, moídos e sem molécula molde	91
Figura 5. 19- Processo de síntese e impressão para os polímeros de impressão molecular (MIP) ...	92
Figura 5. 20- Matriz X dos contrastes com 15 (experimentos)	94
Figura 5. 21- Matriz X^T com 10 linhas e 15 colunas (10x15)	94
Figura 5. 22- Resultado da multiplicação $(X^T X)^{-1}$ (10:10)	95
Figura 5. 23- Diagrama de Pareto em função dos valores de estatística do teste <i>t-Student</i> do modelo Box-Behnken considerando as interações	96
Figura 5. 24- Diagrama de Pareto em função dos valores de estatística do teste <i>t-Student</i> do modelo Box-Behnken excluindo as interações	97
Figura 5. 25- Gráfico das médias marginais da recuperação média (%) em função dos fatores solvente, tempo (horas) e agitação magnética (rpm)	98
Figura 5. 26- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo proposto	100
Figura 5. 27- Superfície de resposta relacionando solvente, tempo (horas) e recuperação média (%) do BFA detectado por FLD	101
Figura 5. 28- Superfície de resposta relacionando tempo (horas), agitação (rpm) e recuperação média (%) do BFA detectado por FLD	102
Figura 5. 29- Superfície de resposta relacionando solvente, agitação (rpm) e recuperação média (%) do BFA detectado por FLD	102
Figura 5. 30- MIP otimizado e NIP- Experimento 3 do planejamento Box-Behnken	105

Figura 5. 31- Recuperação do BFA e Fenol para água ultrapura fortificada.	109
Figura 5. 32- Sobreposição do MIP antes após remoção da molécula-molde (MM) com o NIP....	111
Figura 5. 33- Espectro ampliado da região de absorção no infravermelho na faixa de 1800 a 1200 cm^{-1} para o MIP antes e após a remoção da molécula-molde (MM).....	113
Figura 5. 34- Estruturas químicas do EGDMA e MAA.....	112
Figura 5. 35- Micrografias do (A) MIP-BFA antes da remoção da molécula-molde; (B) NIP (Aumento de 300x).....	114
Figura 5. 36- Micrografias do (A) MIP-BFA antes da remoção da molécula-molde; (B) NIP (Aumento de 10.000x).....	114
Figura 5. 37- Micrografia do MIP após remoção da molécula-molde (A): Aumento 300x; (B) Aumento 10.000x.....	114
Figura 5. 38- Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) do MIP antes/após remoção da MM .	115
Figura 5. 39- Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) do NIP	115
Figura 5. 40- Análise TGA/DTA dos polímeros impressos. (a) MIP antes da remoção da molécula-molde (MM); (b) MIP após remoção da molécula-molde (MM); (c) NIP	116
Figura 5. 41- Análise de DSC dos polímeros impresso e não impresso. (a) MIP antes da remoção da molécula-molde (MM); (b) MIP após remoção da molécula-molde (MM); (c) NIP	118
Figura 5. 42- Gráfico de distribuição de tamanho de poros para caracterização de tamanho do NIP (a); MIP com MM (b); MIP sem MM (c)	120
Figura 5. 43- Curva da isoterma de adsorção/dessorção do MIP e NIP sobrepostos	122
Figura 5. 44- (a) Classificação das isotermas de adsorção/dessorção em sólidos contendo poros de raio (r) e energia de adsorção (E1) no intervalo indicado. (b) Tipos de histerese de adsorção/dessorção em sólidos com poros de morfologia distintas	122

Listas de tabelas

Tabela 3. 1- Seminários, comitês e relatórios sobre os efeitos dos IES a saúde dos seres vivos	8
Tabela 3. 2- Principais glândulas do sistema endócrino	10
Tabela 3. 3- Taxa da excreção diária (μg) de estrogênios em humanos	14
Tabela 3. 4- Algumas substâncias químicas classificadas como IE	15
Tabela 3. 5- Propriedades físico-químicas do BFA	16
Tabela 3. 6- Guia geral para seleção de fase sólida, empregando amostras orgânicas contendo analitos com massas moleculares inferiores a 2000 daltons	28
Tabela 3. 7- Comparações das características dos sistemas off-line e on-line	26
Tabela 3. 8- monômeros mais empregados para o preparo de MIPs	38
Tabela 3. 9- Recuperação do analito em função da concentração	56
Tabela 4. 1- Descrição sucinta das SQ da tabela ANOVA	66
Tabela 4. 2- Condições cromatográficas para determinação de bisfenol A	70
Tabela 5. 1- Tempos de retenção do hormônio BFA com detecção pelo DAD e pelo FLD	77
Tabela 5. 2- Equação da reta e coeficiente de correlação (R^2) do BFA detectados por DAD	78
Tabela 5. 3- Equação da reta e coeficiente de correlação (R^2) do BFA detectado por FLD	78
Tabela 5. 4- Coeficiente de correlação referente as curvas de calibração do BFA	80
Tabela 5. 5- LD e LQ do BFA detectado no DAD e FLD	81
Tabela 5. 6- LD e LQ instrumental do BFA detectado no DAD e FLD	81
Tabela 5. 7- Resultados da precisão dos conjuntos de dados dos analistas 1 e 2	86
Tabela 5. 8- Dados da exatidão do método detectados por DAD e FLD	87
Tabela 5. 9- Dados da robustez do método de BFA detectados por DAD e FLD	88
Tabela 5. 10- Condições cromatográficas validadas para determinação de BFA	89
Tabela 5. 11: Níveis e fatores do planejamento Box-Behnken	90
Tabela 5. 12- Planejamento de triagem estatística Box-Behnken	90
Tabela 5. 13- Valores obtidos da recuperação média para os 15 experimentos	93
Tabela 5. 14- Respostas experimentais e previstas para os 15 experimentos obtidos no Box-Behnken	95
Tabela 5. 15- Respostas experimentais e previstas pelo modelo Box-Behnken otimizado	99
Tabela 5. 16- ANOVA para ajuste do modelo proposto	99
Tabela 5. 17- Quantidade de BFA presente nos 15 MIPs em % (g BFA g MIP^{-1})	104
Tabela 5. 18- Valores obtidos da recuperação (%) e CV detectados por FLD	107
Tabela 5. 19- Resultados obtidos do teste F, t de <i>Student</i> e Q entre o MIP e NIP	107
Tabela 5. 20- Eficiência de Extração (%) de alguns analitos alvos obtidos pela técnica MISPE ...	108
Tabela 5. 21- Parâmetros relacionados ao efeito da impressão (q , k_d , k e k')	110
Tabela 5. 22- Atribuições das principais de bandas de absorção no espectro FTIR para o MIP e NIP	112
Tabela 5. 23- Análise elementar dos elementos químicos presentes no MIP e NIP obtidos pelo EDS	115
Tabela 5. 24- Perda de massa (%) do MIP com molécula-molde em função da temperatura	117
Tabela 5. 25- Perda de massa (%) do MIP sem molécula-molde e NIP em função da temperatura	117
Tabela 5. 26- Distribuição das partículas de MIP e NIP	119

Listas de abreviaturas e siglas

AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrila

ACN: Acetonitrila

AACV: 4,4'-azo (ácido cianovalérico)

ALC: Agente de ligação cruzada

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B.E.T: *Brunauer, Emmett e Teller*

BFA: Bisfenol A (*Bisphenol A*, BPA)

B.J.H: *Barrett, Joyner e Halenda*

B.L.P: Boas práticas de laboratório

CAS: *Chemical Abstracts Service* (Registro de Substâncias Químicas)

CE: Contaminantes emergentes

CEC: *Capillary Electrochromatography* (Eletrocromatografia Capilar)

CG/EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CL/EM/EM: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria em Massa em Tandem

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC)

CLC: Cromatografia Líquida Clássica

CONAMA: Conselho Nacional do Meio ambiente

COMPREHEND:

CRM: *Certificated Reference Material* (Material de Referência Certificado, MRC)

CSTEE:

CV: Coeficiente de variação

DAD: *Diode Array Detector* (Detector com Arranjos de Diodos)

DDT: Diclorodifenil tricloroetano

DDE: Diclorodifenil dicloroetano

DES: Dietilestilbestrol

DPR: Desvio Padrão Relativo

DSC: *Differential Scanning Calorimetric* (Calorimetria Exploratória Diferencial)

DSPE: *Dispersion Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida dispersiva)

EDs: *Endocrine Disruptors* (Disruptores Endócrinos)
EDCs: *Endocrine Disrupting compounds or Chemicals*
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Européia para a segurança alimentar)
EFS: Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE)
EGDMA: Etileno Glicol Dimetacrilato
ELL: Extração Líquido-Líquidos
FDA: *Food & Drug Administration* (Administração de alimentos e medicamentos)
FE: Fase Estacionária
FLD: *Fluorescence Detector* (Detector por Fluorescência)
FM: Fase Móvel
FTIR: *Fourier Transform Infraed Spectroscopy* (Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho com Transforma de Fourier)
GC: *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)
HPAs: Hidrocarbonetos Poliaromáticos
IC: Intervalo de Confiança
IDA: Ingestão diária aceitável
IE: Interferentes endócrinos
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPCS: *International Programme on Chemical Safety* (Programa Internacional de Segurança Química)
IR: Iniciador Radicalar
LD: Limite de detecção
LQ: Limite de quantificação
MAA: *Methacrylic Acid* (Ácido Metacrílico)
MeOH: Metanol
MEV: Microscopia Eletrônica por Varredura
MIP: *Molecularly imprinted polymer* (Polímeros de impressão molecular)
MF: Monômero funcional
MM: Molécula Molde (*Template*)
MSPD: *Matrix Solid Phase Dispersion* (Dispersão da Matriz em Fase Sólida)
NIP: Polímero Não Impresso
OMS: Organização Mundial de Saúde

PCB: Policlorados de bifenilas

PMC: Perfluorcarbono metil-ciclohexano

PNUMA: Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

POP: Poluentes Orgânicos Persistentes

PTFE: Politetrafluoretileno

R: Coeficiente de correlação

RAM: *Restricted access material* (Material de Acesso Restrito)

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RMN: Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear

SABESP: Sistema de abastecimento de água e esgoto de São Paulo

SBSE: *Sortative Bar Shaking Extraction* (Extração sortiva em Barra de Agitação)

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

S/N: Sinal/Ruído

SPME: *Solida Phase Microextraction* (Microextração em Fase Sólida)

TG: Termogravimetria

THF: Tetrahidrofurano

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos EUA)

VP: 4-vinil-piridina

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Listas de figuras	iii
Listas de tabelas	vi
Listas de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. Objetivo Geral.....	4
1.1.2. Objetivo Específico.....	4
2. JUSTIFICATIVA	5
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
3.1. Contaminantes emergentes.....	6
3.2. Interferentes endócrinos (IEs)	7
3.2.1. Sistema endócrino	9
3.2.2. Mecanismos de ação dos IEs	11
3.2.3. Efeitos dos IEs sobre à saúde:	11
3.2.4. Fontes do IEs	12
3.2.5. Substâncias classificadas como IEs	14
3.3. Interferente Endócrino - Bisfenol A	15
3.3.1. Características e aplicações	15
3.3.2. Toxicidade	18
3.3.3. Aspectos legais	21
3.3.4. Presença de BFA no ambiente e alimentos	22
3.4. Procedimentos Analíticos.....	23
3.4.1. Preparo de amostras	23
3.4.2. Extração em Fase Sólida	24
3.5. Polímero de Impressão Molecular	30
3.5.1. Histórico	31
3.5.2. Polímeros.....	32
3.5.3. Polimerização por Radicais livres.....	33
3.5.4. Síntese do MIP.....	35

3.5.5.	Variáveis no processo de síntese do MIP.....	36
3.5.6.	Tipo de impressão: Covalente, não covalente ou semi covalente	42
3.5.7.	Mecanismo de polimerização do MIP e NIP.....	44
3.6.	Aplicação dos MIPs como adsorvente	48
3.7.	Adsorção	49
3.7.1.	Adsorção Física ou fisiosorção.....	50
3.7.2.	Adsorção Química ou quimiosorção.....	50
3.8.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	51
3.9.	Parâmetros de Validação da Metodologia Analítica.....	52
3.9.1.	Seletividade	52
3.9.2.	Linearidade	53
3.9.3.	Sensibilidade.....	54
3.9.4.	Precisão	54
3.9.5.	Exatidão.....	55
3.9.6.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	56
3.9.7.	Robustez	56
3.10.	Análise Estatística	57
3.10.1.	Planejamento de Experimentos-Análise multivariada	57
3.11.	Técnicas de caracterização	60
4.	METODOLOGIA.....	61
4.1.	Materiais, reagentes, padrões, solventes e equipamentos	61
4.2.	Preparo de soluções	62
4.3.	Validação do Método.....	62
4.3.1.	Seletividade	63
4.3.2.	Linearidade	63
4.3.3.	Sensibilidade.....	63
4.3.4.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	63
4.3.5.	Precisão	64
4.3.6.	Exatidão.....	64
4.3.7.	Robustez	64
4.4.	Síntese do MIP e NIP.....	64
4.5.	Validação da síntese do MIP	66
4.6.	Remoção da molécula molde (template) do MIP	67
4.7.	Empacotamento do MIP e NIP no cartucho de EFS.....	67

4.8. Avaliação do efeito de impressão no MIP e NIP.....	68
4.9. Validação das condições cromatográficas	70
4.10. Técnicas de caracterização	70
4.10.1. Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	71
4.10.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	71
4.10.3. Análise térmica	71
4.10.4. Analisador de tamanho de partículas	72
4.10.5. Área superficial e porosidade	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.1. Validação da metodologia analítica para determinação de bisfenol A por cromatografia .	75
5.1.1. Seletividade	75
5.1.2. Linearidade	77
5.1.3. Sensibilidade.....	80
5.1.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação	80
5.1.5. Precisão	86
5.1.6. Exatidão/Recuperação.....	87
5.1.7. Robustez	88
5.2. Síntese do MIP otimizada	90
5.3. Remoção da molécula molde do MIP.....	103
5.4. Síntese do MIP otimizado e NIP	104
5.5. Recuperação do MIP otimizado e NIP.....	106
5.6. Teste da seletividade do MIP e NIP.....	109
5.7. Técnicas de caracterização	111
5.7.1. Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	111
5.7.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	113
5.7.3. Análise termogravimétrica (TGA).....	116
5.7.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	118
5.7.5. Análise de tamanho de partículas	119
5.7.6. Área superficial e porosidade	121
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	127

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos tópicos mais relevantes na Química Ambiental é a qualidade da água para o consumo humano. A água é considerada um solvente universal, essencial para manter a vida e desempenha um papel vital para o bom funcionamento dos ecossistemas da Terra. Ela é utilizada no abastecimento doméstico e industrial, na irrigação, dessedentação de animais, preservação da flora e fauna, recreação e lazer, criação de espécies, geração de energia elétrica, navegação, diluição e transporte de despejos (BILA; DEZOTTI, 2007).

De acordo com a SABESP, o Planeta Terra é formado por $\frac{3}{4}$ de água com a maior parte sendo salgada (97,5%) e o restante doce (2,5%). E desses 2,5%, pode-se dizer que apenas 0,3% são destinadas para o consumo humano, como pode ser mostrado na Figura 1.1.

Figura 1. 1- Distribuição da água no mundo



Fonte: Adaptada da SABESP, 2015.

A água doce disponível no planeta se apresenta cada vez mais insuficiente para ser utilizada como água potável. A América do Sul é uma das regiões que mais concentra a quantidade dessa água para o consumo doméstico e industrial. O Brasil, por exemplo, concentra cerca de 13,7% da água doce disponível do mundo. Logo, para se ter um controle desses recursos hídricos no Brasil foram criadas a Resolução CONAMA n° 357/2009, alterada pela Resolução CONAMA n° 430 em 13 de maio de 2011, que “dispõe sobre a classificação dos corpos d’água em doce, salina e salobra”, e a Portaria n° 2914/2011 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre a potabilidade da água. Mesmo atendendo aos requisitos do Ministério da Saúde a qualidade da água distribuída a milhões de brasileiros, ainda precisa melhorar significativamente.

Como resultado do desenvolvimento industrial e econômico que vivemos, surgem muitos problemas ambientais relacionados com a água. O Brasil é um dos países que passam por esses problemas ambientais, devido a fragilidade das políticas públicas e a precariedade dos serviços de saneamento, somadas ao crescimento populacional desordenado nas grandes cidades que têm sido responsáveis pela diminuição da qualidade dos nossos recursos hídricos. Além disso, a escassez na alocação de recursos financeiros e a inexistência de um planejamento baseado em critérios toxicológicos e ambientais conduziram a um quadro onde o lançamento de esgoto doméstico bruto, em conjunto com cargas industriais, vem causando sérios impactos aos sistemas de águas superficiais (BERALDO, 2012; RAIMUNDO, 2011).

A principal preocupação com a qualidade da água nos principais rios brasileiros, de acordo com o pesquisador Wilson Jardim, são os chamados interferentes endócrinos, que são substâncias consideradas como “contaminantes emergentes” da água (JARDIM, 2013).

A origem da hipótese da ação dos interferentes endócrinos deve-se a acontecimentos importantes, tais como, o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol (DES) na gravidez, entre os anos de 1940 a 1970; anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida diclorodifenil tricloroetano (DDT) e seu metabólito diclorodifenil dicloetano (DDE) e um estudo na Dinamarca que relata o declínio da qualidade do sêmen de homens durante aproximadamente 50 anos, entre os anos de 1938 e 1990 (BILA; DEZOTTI, 2007).

Esses contaminantes emergentes são originados com uso de compostos orgânicos sintéticos que causam alterações crônicas no desenvolvimento e na reprodução de organismos aquáticos. Um desses compostos sintéticos que está sendo amplamente estudado por vários pesquisadores é o bisfenol A (BFA) que é uma substância que causa a desregulação do sistema endócrino nos seres vivos, mesmo sendo encontrado em baixas concentrações (ng L^{-1}) no ambiente. Alguns estudos recentes mostram que o BFA pode causar câncer, problemas neurológicos, redução da fertilidade masculina, feminização dos peixes, dentre outros. Logo, neste trabalho o BFA será o foco de estudo.

O BFA por apresentar solubilidade moderada (300 mg L^{-1}) no meio aquoso pode ser encontrado no ambiente tanto por fontes pontuais ou por fontes difusas. A extração deste no ambiente é muito difícil devido ser encontrado em concentração traço (ng L^{-1}). Entretanto, umas das técnicas analíticas que está sendo amplamente utilizada é a extração em fase sólida (EFS) por esta apresentar uma boa eficiência de extração (MALDANER; JARDIM, 2012; PIETRO *et al.*, 2008).

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido cujos mecanismos são baseados na cromatografia líquida de baixa pressão, que está disponível comercialmente sob a forma de cartuchos de extração descartáveis, tendo como objetivo isolar/concentrar, *clean up*, e extrair o analito de interesse (JARDIM, 2010; JARDIM, 2013). Consiste de quatro etapas:

- (1) Acondicionamento do adsorvente no cartucho com um solvente adequado;
- (2) Percolação ou introdução da amostra no cartucho;
- (3) *Clean up* ou lavagem do cartucho com um solvente para remoção de possíveis interferentes e/ou impurezas presentes na matriz da amostra;
- (4) Eluição e coleta dos analitos pré-concentrados com uma passagem mínima de solvente.

Com o uso cada vez mais constante da técnica de extração em fase sólida, tem surgido nos últimos anos a necessidade de desenvolvimento de novos tipos de adsorventes (sorventes) que melhoram a seletividade e especificidade de interação do adsorvente com o analito alvo. Um desses adsorventes é o polímero de impressão molecular (do inglês *Molecular Imprinted Polymer*, MIP). No entanto, ainda se utiliza muito os adsorventes comerciais (C8, C18, sílica, ciano, dentre outros) por estes apresentarem uma boa seletividade e eficiência de extração para diversos analitos, porém, não são específicos para um determinado analito presente em amostras com concentrações traços. Neste contexto, surge a necessidade do desenvolvimento de novos tipos de adsorventes como foi citado anteriormente (AUGUSTO *et al.*, 2010; CALDAS *et al.*, 2011).

A técnica de impressão molecular surgiu na década de 30, através do modelo chave-fechadura (enzima-substrato) que foi um dos primeiros conceitos a surgir sobre o que é MIP. A partir de vários estudos e pesquisas chegaram a um conceito mais concreto sobre esse novo adsorvente que está sendo amplamente utilizado em diferentes segmentos da Química Analítica, Físico-Química, Bioquímica, Ciências Farmacêuticas, dentre outras (CHEN *et al.*, 2016).

Os polímeros de impressão molecular (MIP) também chamados de material biomimétrico podem ser definidos como um material rígido e tridimensional preparado ao redor de uma molécula molde (do inglês *Template*) (MM) por meio de interação covalente, não covalente, semi covalente, interação eletrostática ou por ligante organometálico com um precursor monômero funcional. A síntese do MIP se dá por meio das técnicas de polimerização que podem ser classificadas como: por polimerização em *bulk*, por precipitação, por suspensão, por emulsão ou por expansão em multi etapas. A remoção da molécula molde pode ser realizada por lavagem ou extração com um solvente, obtendo-se um MIP com sítios seletivos complementares a molécula molde (CHEN *et al.*, 2016).

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi sintetizar e caracterizar um polímero de impressão molecular (MIP) e seu análogo polímero não impresso (NIP) utilizando o bisfenol A como uma molécula molde para futura aplicação como adsorvente de extração em fase sólida (MISPE).

1.1.2. Objetivo Específico

- ✓ Desenvolver e validar um método analítico para determinação de bisfenol A por cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Sintetizar e caracterizar um MIP e NIP para futuras aplicações em EFS;
- ✓ Otimizar e validar um processo eficiente de síntese do MIP e NIP;
- ✓ Verificar a eficiência de extração do MIP e NIP produzido utilizando água ultrapura fortificada com bisfenol A;
- ✓ Verificar a seletividade do MIP e NIP utilizando bisfenol A e fenol em água ultrapura fortificado.

2. JUSTIFICATIVA

Devido à grande preocupação com a qualidade dos corpos aquáticos, onde o consumo de produtos sintéticos (fármacos, cosméticos, higiene pessoal, alimentos industrializados, dentre outros) são na maioria das vezes responsáveis pela descarga de grandes quantidades de contaminantes emergentes com ênfase aos interferentes endócrinos que causam alteração no sistema endócrino dos seres vivos em efluentes domésticos ou industriais, levando a contaminação da água de abastecimento humano por estes contaminantes estarem presentes em concentrações traços (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$). No entanto, para remover esses contaminantes presentes no meio ambiente, diversos métodos físicos ou químicos vêm sendo desenvolvidos.

Entre esses métodos, o polímero de impressão molecular (MIP) utilizado como adsorvente em cartucho para extração em fase sólida ou até mesmo como fase estacionária para colunas cromatográficas vêm se destacando por ser uma técnica de preparo de amostra bastante eficiente na remoção de contaminantes presentes no meio ambiente em concentração traços e residuais.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Contaminantes emergentes

A escassez e o risco de racionamento não são os únicos problemas que a maior parte dos brasileiros enfrenta em relação à água. O crescimento desordenado das cidades e o consequente adensamento populacional, aliados ao saneamento precário, às atividades antrópicas e o desenvolvimento industrial têm acarretado ao meio ambiente muitos prejuízos, uma vez que são lançados ao ambiente em todo o momento diversos compostos químicos denominados de contaminantes emergentes (CE) que prejudicam seres humanos, animais e, principalmente, os organismos aquáticos (FACHIN, 2014; SILVA *et al.*, 2016; SILVEIRA, 2015).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*), contaminantes emergentes são “*poluentes (bióticos e abióticos) de ocorrência natural ou antrópica, ou microrganismo que não é normalmente controlado no ambiente, que podem causar efeitos sobre a saúde dos seres vivos e no ecossistema aquático*” (JARDIM, 2013; PETRI *et al.*, 2015; RICHARDSON; TEMES, 2014; ROCHA; JÚNIOR, 2014; SANTANA, 2013).

A presença desses contaminantes emergentes no ambiente tornou-se recentemente uma grande preocupação das agências de proteção ambiental em todo o mundo, em especial para os produtos farmacêuticos e pesticidas. Estes compostos são continuamente introduzidos no ambiente e são encontrados em concentrações residuais ou traços (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), mas, mesmo assim, podem afetar a qualidade da água potável e causar um grande impacto sobre os ecossistemas aquáticos e à saúde humana (BILA; DEZOTTI, 2007; RICHARDSON; TEMES, 2014). Esse problema se agrava porque, é inviável legislar centenas de compostos denominados emergentes. Por isso, a comunidade científica vem trabalhando na identificação de possíveis substâncias indicadoras, isto é, um composto que possa apresentar risco da exposição a algumas classes de produtos. Nesse sentido, a cafeína, uma das bebidas mais consumidas em todo mundo depois da água, é um excelente indicador por estar associada aos compostos com atividade estrogênica que podem alterar o metabolismo hormonal dos seres humanos (SILVEIRA, 2015).

Os CE possuem as mais diversas origens que atingem os corpos d’água, tais como: herbicidas e pesticidas usados na agroindústria; produtos químicos utilizados em indústria química; medicamentos, cosméticos, protetores solares que tem origem na indústria farmacêutica; retardantes de chama bromado; compostos perfluorados; dentre outros produtos de uso cotidiano (FACHIN,

2014; JARDIM, 2013; RAIMUNDO, 2011). Dentre estas espécies de contaminantes emergentes, temos um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente que merece nossa atenção pelo fato de interferir no sistema endócrino de humanos e alguns animais, com isso afetando a saúde, o crescimento e a reprodução que são conhecidos como Interferentes Endócrinos (IEs) (ROCHA; JÚNIOR, 2014; SANTANA, 2013; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2007).

3.2. Interferentes endócrinos (IEs)

A todo instante surgem novos compostos químicos para as mais variadas aplicações. Atualmente, são registradas no CAS (*Chemical Abstract Service*), mais de 130 milhões de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, sendo que aproximadamente 67 milhões destas substâncias estão disponíveis comercialmente. Aproximadamente 15 mil substâncias novas são registradas diariamente.

Dentre as diversas substâncias registradas no CAS, várias delas podem afetar o sistema endócrino, tais como: substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilas policloradas, bisfenol A, fármacos, dentre outras) e substâncias naturais (estrogênios naturais) (AQUINO, BRANDT; CHERNICHARO, 2013; QUINÁGLIA *et al.*, 2017). Essas substâncias que interferem no sistema endócrino dos seres vivos são denominadas de interferentes endócrinos.

Existem muitas definições para os interferentes endócrinos, que são mundialmente conhecidos como *endocrine disruptors* (EDs) ou *endocrine disrupting compounds or chemicals* (EDCs) – são substâncias que mesmo em baixíssimas concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} podem provocar efeito hormonal nos seres vivos (BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007; PETROVIC, 2004; QUINÁGLIA *et al.*, 2017). Tais substâncias podem ser de origem antrópica, também denominada de xenoestrogênios ou de origem natural, como por exemplo, os fitoestrogênios.

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency –USEPA), “*um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento*”. Já o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), em conjunto com o Japão, os EUA, o Canadá e a União Européia, adotou a seguinte definição: “*Um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações*”.

As primeiras evidências da ação dos interferentes endócrinos surgiram com o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram o dietilestilbestrol (DES) na gravidez, entre os anos de 1940 a 1970; anomalias no sistema reprodutivo em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida dicloro difenil tricloroetano (DDT) e seu metabólito dicloro difenil dicloroetano (DDE), um estudo realizado na Dinamarca por um período de aproximadamente 50 anos entre 1938 a 1990, que relatou uma diminuição da quantidade do sêmen de homens devido ao uso deste mesmo pesticida (BILA; DEZOTTI, 2007).

O Programa das Nações Unidas para Meio Ambiente (PNUMA) juntamente com a Organização Mundial de Saúde (OMS), outras organizações governamentais e não-governamentais, com ênfase em documentos em formato de relatórios verificaram que há uma crescente preocupação mundial quanto aos efeitos desses contaminantes químicos denominados de interferentes endócrinos no meio ambiente que possa afetar e interferir no funcionamento do sistema endócrino (hormonal) sobre a saúde dos seres humanos e animais. Alguns desses estudos estão listados na Tabela 3.1 (BILA; DEZOTTI, 2007; QUINÁGLIA *et al.*, 2017).

Tabela 3. 1- Seminários, comitês e relatórios sobre os efeitos dos IES a saúde dos seres vivos

Ano	Organização	Objetivos dos estudos
1995	Agência Ambiental Federal Alemã	Discussão sobre ocorrência e impacto dos IE e riscos potenciais que podem causar aos humanos e outros animais
1995	US EPA	Seminário para avaliar os riscos à saúde e efeitos ambientais dos IE
1996	US EPA	Seminário para desenvolvimento de estratégia para avaliar o risco dos IE ao meio ambiente
1996	US EPA	Desenvolvimento de programa de testes e análises (“screening”) para avaliar a ação dos IE
1997	US EPA	Relatório sobre os DE presentes no meio ambiente
1998	US EPA	Revisão e discussão das informações científicas disponíveis sobre os IE
1998	OECD	Desenvolvimento de métodos de ensaio para os IE
1999	CSTEE	Revisão da literatura existente e opinião científica nas evidências dos IE, em particular, avaliação dos riscos ecológicos e diretrizes de ensaios toxicológicos
1999	Comissão das Comunidades Européias	Identificação do problema dos IE, suas causas, conseqüências e definição das medidas adequadas para dar uma resposta ao problema
2001	Comissão das Comunidades Européias	Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade européia sobre os IE
2002	Comissão das Comunidades Européias	Programa COMPREHEND: Avaliação das evidências dos IE no ambiente aquático na Europa
2002	OECD	Avaliação dos métodos de ensaios para as substâncias estrogênicas
2002	WHO	Avaliação global do estado da arte da ciência dos IE
2003	IEH	Relatório de avaliação do progresso internacional da pesquisa dos IE
2004	Comissão das Comunidades Européias	Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos sobre os IE

Fonte: Adaptado de BILA; DEZOTTI, 2007.

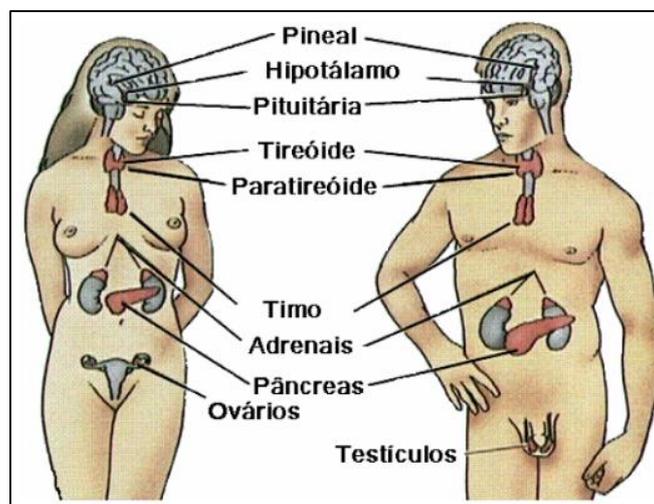
3.2.1. Sistema endócrino

O corpo humano é organizado em níveis químico, celular, tecidual, órgãos e sistemas. São onze sistemas que gerenciam as funções do corpo humano, sendo eles: circulatório, respiratório, digestivo, reprodutor, linfático, excretor, esquelético, nervoso, sensorial, muscular e endócrino; cada um destes é responsável por funções vitais do organismo (TORTORA; DERRICKSON, 2015).

O sistema endócrino ilustrado na Figura 3.1, é um dos sistemas do corpo humano mais complexos é constituído por um conjunto de glândulas e tecidos localizados em diferentes partes do corpo humano, estas sintetizam e secretam substâncias químicas responsáveis pela maioria das funções biológicas (TORTORA; DERRICKSON, 2015).

Essas substâncias químicas sintetizadas denominadas de hormônios, atuam como mensageiros e são secretadas pelas glândulas endócrinas e, quando lançadas na corrente sanguínea, comandam o funcionamento do organismo, controlando algumas funções, tais como, atividades dos órgãos, níveis de sais, açúcares e líquidos no sangue, armazenamento de energia, crescimento e desenvolvimento de um determinado organismo, as características sexuais, dentre outros (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Figura 3. 1- Glândulas que compõem o sistema endócrino humano



Fonte: Adaptado de BERALDO, 2012; GHISELLI; JARDIM; 2007.

Portanto, os hormônios são responsáveis pelo equilíbrio, manutenção e homeostase do funcionamento do organismo. Algumas das glândulas mais importantes do corpo bem como os hormônios e a ação deste estão listados na Tabela 3.2 (TORTORA; DERRICKSON, 2015).

Tabela 3. 2- Principais glândulas do sistema endócrino

Glândulas	Hormônio sintetizado e ação
Hipófise ou pituitária	Localizada na base do encéfalo, embaixo do crânio, possui tamanho pequeno (pode ser comparada com o tamanho de uma ervilha). É dividido em dois lobos, a adeno-hipófise (anterior) e neuro-hipófise. Exerce efeito sobre os órgãos não endócrinos e regulam na produção e secreção de hormônios nas glândulas endócrinas.
Paratireoides	São quatro pequenas glândulas localizada atrás da tireoide no pescoço, secreta o hormônio paratormônio que é responsável pelo aumento da concentração de cálcio no sangue devido a remoção deste nos ossos, aumento de adsorção de vitamina D, adsorção intestinal de cálcio e reabsorção nos túbulos renais.
Tireoide	Localizada no pescoço em frente a traquéia, produzem os hormônios tiroxina (T ₄), triiodotironina (T ₃) que controlam o crescimento e a taxa metabólica, e também produz a calcitonina responsável pela homeostase do cálcio no sangue.
Timo	É uma glândula do sistema linfático, responsável pela produção de linfócitos T, colher, distribuir e transportar os glóbulos brancos (leucócitos).
Supra-renais ou adrenais	Localizada acima dos rins envolvida por uma capsula fibrosa. É dividida em duas partes: medula (parte interna) e córtex (parte externa). Responsável pela síntese e liberação de hormônios corticóides como aldosterona que regula a taxa de sais nos rins e adrenalina em resposta ao <i>stress</i> .
Pâncreas	Localiza-se atrás do estômago entre o duodeno e baço fazendo parte do sistema digestivo e endócrino. É tanto uma glândula exócrina quanto endócrina. Responsável produzir proteínas, enzimas e hormônios que fluem diretamente para a corrente sanguínea.
Testículos	Órgão reprodutor masculino que influencia no crescimento e desenvolvimento. Responsável pela produção dos hormônios sexuais masculinos androgênios e espermatozoides.
Ovários	Órgão reprodutor feminino que influencia no crescimento e desenvolvimento. Produz os hormônios sexuais femininos que regulam a ovulação e a menstruação e garantem a manutenção da gravidez através do desenvolvimento do embrião e das glândulas mamárias.

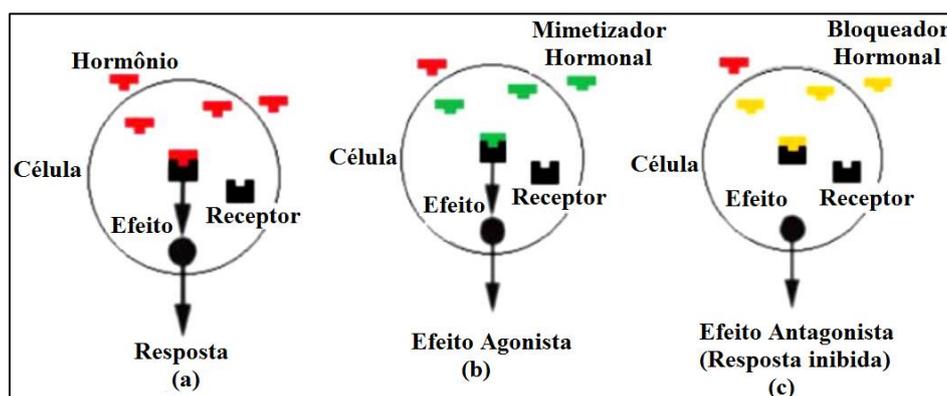
Fonte: Adaptado de GHISELLI; JARDIM, 2007.

3.2.2. Mecanismos de ação dos IEs

Os hormônios agem em determinadas células do corpo, chamadas células- alvo. Uma célula-alvo responde a uma molécula de hormônio por possuir receptores específicos à interação molecular (GHISELLI; JARDIM, 2007; SODRÉ *et al.*, 2007). A ação de um determinado hormônio pode ser comparada com transmissão de rádio, onde as ondas de rádio propagam-se pelo ar, mas só é possível ouvi-las empregando-se um receptor ajustado na frequência adequada (SODRÉ *et al.*, 2007). A interação hormônio-receptor pode ocorrer de duas maneiras, como ilustrado na Figura 3.2:

- Agonista: uma molécula hormonal liga-se ao receptor provocando uma resposta que terá um efeito biológico.
- Antagonista: um hormônio liga-se ao receptor bloqueando a ação agonista do outro hormônio. Provocando alterações no sistema endócrino dos seres vivos.

Figura 3. 2- Representação esquemática dos mecanismos de ação dos hormônios no sistema endócrino



Fonte: Adaptado de GHISELLI; JARDIM, 2007.

A elevada sensibilidade e especificidade de um receptor hormonal por um hormônio específico é conseguida se este hormônio se encontrar em concentrações baixas, produzindo uma resposta natural. No entanto, os receptores hormonais também têm grande capacidade de se ligar a outras substâncias químicas em concentrações baixas gerando um efeito na resposta do hormônio, provocando alterações no sistema endócrino (GHISELLI; JARDIM, 2007).

3.2.3. Efeitos dos IEs sobre à saúde:

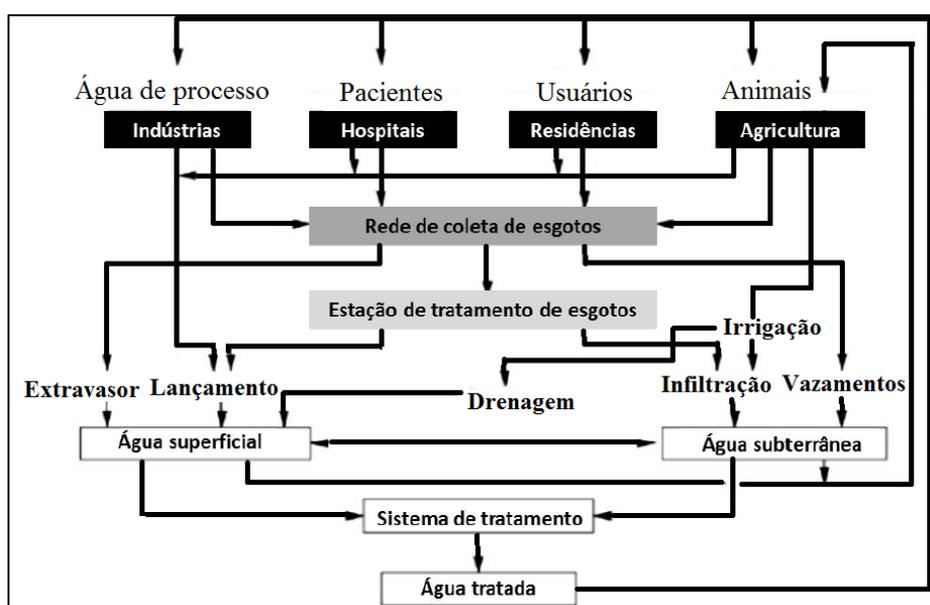
Recentemente, inúmeros efeitos causados pelos interferentes endócrinos têm sido relatados, incluindo anomalias no sistema reprodutivo de animais (peixes, répteis e pássaros); indução da síntese de vitelogenina (VTG) no plasma de peixes e efeitos na saúde de humanos, tais como, redução na

produção de esperma em homens, aumento da incidência de alguns tipos de câncer (mama, sistema reprodutivo, intestino, dentre outros), diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminização de peixes machos, dentre outros (BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007).

3.2.4. Fontes do IEs

Toneladas de substâncias sintéticas e naturais são lançadas anualmente no meio ambiente, das quais a maior parte são consideradas como interferentes endócrinos, que podem chegar até a água para consumo humano por meio do lançamento de efluente doméstico ou industrial, sem passar por tratamento, em mananciais hídricos. Mas também podem ocorrer a contaminação da água para o consumo humano através dos efluentes industriais, apesar de estes passar por tratamento, podem apresentar na sua composição final contaminantes em concentrações traços. A Figura 3.3 ilustra as principais rotas desses IE nos mananciais de água (BILA; DEZOTTI, 2007; PÁDUA *et al.*, 2009).

Figura 3. 3- Principais rotas de transporte dos IEs para os mananciais



Fonte: Adaptado de PÁDUA *et al.*, 2009.

Os interferentes endócrinos e outros poluentes ambientais podem ser introduzidos no meio ambiente por dois tipos de fontes: Pontuais e difusas (não-pontuais). As fontes pontuais apresentam um ponto de entrada no ambiente bem caracterizado como por exemplo, descargas de efluentes industriais e esgotos domésticos, isto é, descargas diretas para os corpos d'água. As fontes difusas são quando não apresentam um ponto de entrada bem definido no ambiente e que não são facilmente

identificadas, tais como deposições atmosféricas, lixiviação de compostos no solo e escoamentos superficiais, provenientes de práticas agrícolas (GHISELLI; JARDIM, 2007; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2007).

Um exemplo dessas fontes é o bisfenol A, que pode surgir em águas superficiais tanto por meio de fontes pontuais, associados à fabricação de produtos industrializados, quanto a partir de fontes difusas associadas aos mecanismos de lixiviação em produtos manufaturados (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2007).

Em alguns estudos citado por Sodré *et al* (2007), considerando-se o bisfenol A e os ftalatos empregados em ambientes industriais e domésticos,   esperado que estes compostos estejam presentes tanto no esgoto bruto quanto em efluentes industriais. Fromme e colaboradores (2002) em seus estudos encontraram concentra es relativamente significativas de bisfenol A em águas superficiais (0,5 a 410 ng L⁻¹), em amostras de efluentes de uma esta o de tratamento de esgoto (ETE) (18 a 702 ng L⁻¹), em sedimentos (10 a 190 ng L⁻¹) e no lodo de esgoto (4 a 1360 µg kg⁻¹) (FROMME *et al.* 2002; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2007).

Para os seres humanos a mais importante fonte de contamina o dos interferentes endócrinos   através da alimenta o, uma vez que muitas destas substâncias, como por exemplo o bisfenol A, são utilizadas durante a produ o de alimentos industrializados e/ou no processo de embalagens dos mesmos, ou ainda através da ingestão de água potável contaminada (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Além de quantidades de bisfenol A encontrado no meio ambiente, muitos hormônios podem também surgir nesses meios, principalmente por meio da excre o de urina ou fezes por seres vivos. Como exemplo, pode-se citar os estrogênios naturais ou sintéticos que são excretados na urina em suas formas biologicamente ativas, isto  , como conjugados solúveis em água e, em menor propor o, por meio das fezes. Porém, vários seres vivos excretam quantidades de hormônios em propor es diferentes dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gesta o (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2007). A Tabela 3.3 mostra uma estimativa das taxas diárias dos principais estrógenos naturais excretados pelos seres humanos. Sendo que mulheres em período de gesta o pode excretar quantidades de estrog nio até mil vezes maior que uma mulher em atividade normal, isto  , na ordem de 2 a 20 µg estrona/dia, 3 a 65 µg estriol/dia, e 0,3 a 5 µg estradiol/dia isso dependendo do estágio da gravidez (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Tabela 3. 3- Taxa da excreção diária (μg) de estrogênios em humanos

CATEGORIA	ESTRONA	17 β -ESTRADIOL	ESTRIOL	17 α -ETINILESTRADIOL
Homens	39	1,6	1,5	-
Mulheres em menstruação	8	3,5	4,8	-
Mulheres em menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres em gestação	600	259	6000	-
Mulheres	-	-	-	35

Fonte: Adaptado de SODRÉ *et al.*, 2007.

Em um estudo realizado na ETE da Penha/RJ, Brasil, foi monitorado a quantidade de estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos encontrados no esgoto doméstico. Sendo, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona encontrados em concentrações de 0,021 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A taxa de remoção desses estrogênicos foi de 67% (efluente tratado com filtro biológico) e 83% (efluente tratado de processo de lodos ativados) para a estrona. Já, o 17 β -estradiol apresentou uma taxa de remoção de 92 e 99,9% para o efluente tratado por filtro biológico e processo de lodos ativados, respectivamente. Também foi monitorada a taxa de remoção na ETE do 17 α -etinilestradiol apresentando remoção de 64 e 78% para efluente tratado por filtro biológico e por processo de lodos ativados, respectivamente (BILA; DEZOTTI, 2007). Conclui-se que o processo do lodo ativado é um dos melhores para a remoção desses estrogênios naturais e sintéticos presentes na ETE.

3.2.5. Substâncias classificadas como IEs

Muitos dos interferentes endócrinos estão enquadrados em uma série de grupos orgânicos potencialmente tóxicos, tais como micropoluentes orgânicos, substâncias persistentes, poluentes orgânicos persistentes (POP), poluentes emergentes, dentre outros. Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como, hormônios sintéticos (etinilestradiol, mestranol, alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCB), bisfenol A, substâncias farmacêuticas, dentre outras) e substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios), algumas destas substâncias estão mostradas na Tabela 3.4 (BILA; DEZOTTI, 2007; GHISELLI; JARDIM, 2007; ROCHA; JÚNIOR, 2014; SODRÉ *et al.*, 2007).

Tabela 3. 4- Algumas substâncias químicas classificadas como IE

Esteroides	Alquilfenóis
Etinilestradiol 17 β -Estradiol Estrona Dietilestilbestrol	Nonilfenol Nonilfenol Etoxilado Octilfenol Octilfenol Etoxilado
Compostos Poliaromáticos	Compostos com Oxigênio
Bifenilas Policloradas Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) Retardantes de Chama	Ftalatos Bisfenol A
Pesticidas: Inseticidas, Herbicidas e Fungicidas	Outros
Atrazina Dieldrin Propiconazol	Dioxinas e Furanos Tributilestanho

Fonte: Adaptado de GHISELLI; JARDIM, 2007.

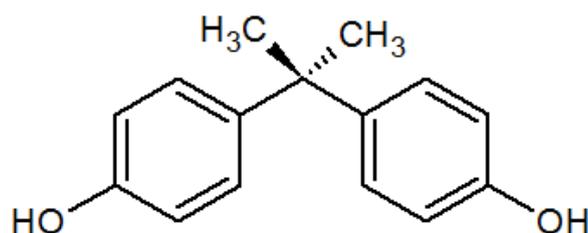
Dentre estas substâncias químicas, o bisfenol A tem chamado muita atenção da comunidade científica por interferir com o sistema endócrino, imitando, bloqueando e desencadeando ações dos hormônios e implicando em efeitos tóxicos sobre a saúde dos seres vivos.

3.3. Interferente Endócrino - Bisfenol A

3.3.1. Características e aplicações

O bisfenol A (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano, CAS 000080-05-7) (BFA) cuja estrutura química está mostrada na Figura 3.4, é um dos produtos químicos de maior volume de produção em todo o mundo, usado amplamente na produção de plásticos policarbonatos e resinas epóxi (CHEN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2012).

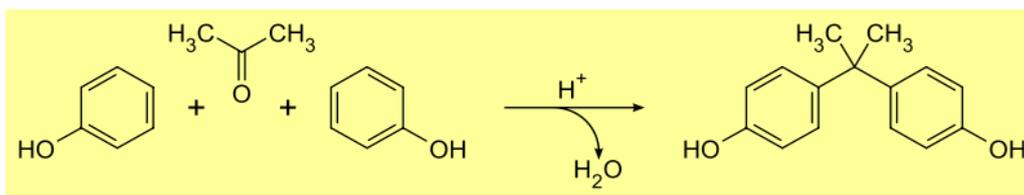
Figura 3. 4- Estrutura química do bisfenol A



Fonte: Arquivo pessoal.

O BFA foi descoberto e sintetizado como estrogênio sintético em 1891 pelo químico russo Alexander P. Dianin numa reação de condensação de duas moléculas de fenol e uma molécula de acetona na presença de um catalisador como cloreto de hidrogênio ou de resina de troca iônica conforme mostrada na Figura 3.5 (CHEN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2012; MIDORO-HORIUTI; GOLDBRUM, 2017; POLYCARBONATE/BPA GLOBAL GROUP, 2016; TOXIPEDIA, 2016).

Figura 3. 5- Síntese do bisfenol A



Fonte: Arquivo pessoal.

No entanto, somente em 1905, a síntese do BFA citada anteriormente foi reconhecida e patenteada pelo químico alemão Thomas Zincke, assim como também algumas das principais propriedades físico-químicas fundamentais do BFA mostradas na Tabela 3.5 (CHEN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2012; POLYCARBONATE/BPA GLOBAL GROUP, 2016; TOXIPEDIA, 2016). Entretanto, Zincke não propôs qualquer aplicação em relação ao seu uso.

Tabela 3. 5- Propriedades físico-químicas do BFA

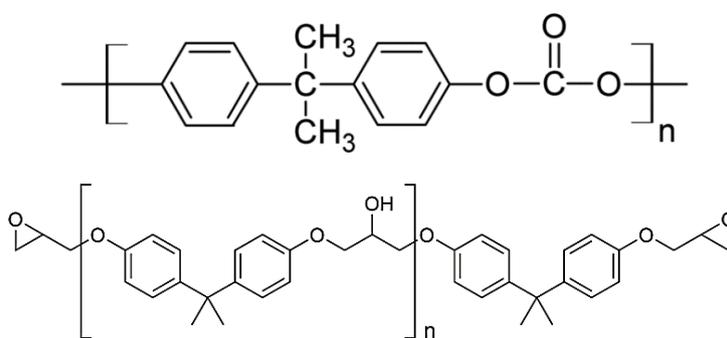
Propriedades	Valor
CAS	80-05-7
Massa Molar	228,28 g mol ⁻¹
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Densidade	1,20 g cm ⁻³
Ponto de fusão	158°C (760 mmHg)
Ponto de ebulição	220°C
PkA	9,59 a 11,30
Solubilidade em água	300 mg L ⁻¹
Pressão de vapor	5,3x10 ⁻⁶ kPa
Grau de pureza (%)	99-99,8%

Fonte: Adaptado de ROCHA; ALMEIDA, 2011.

O BFA em condições ambientes é sólido e de coloração branca, comercializado em forma de cristais ou pastilhas que pode ser utilizado tanto para a produção de resinas epóxi em revestimentos para aplicações industriais e de consumo, como latas de alimentos e bebidas e revestimentos,

protetores para usos eletrônicos e marítimos, quanto para produção de plástico policarbonato por ser muito versátil, duradouro, de grande transparência e alta resistência ao calor e ao impacto mecânico. As fórmulas estruturais desses dois compostos originados a partir do BFA estão ilustradas na Figura 3.6. Essas características fazem do policarbonato o material escolhido para uma ampla gama de aplicações destinadas ao usuário final, como mamadeiras, DVDs, computadores e eletrodomésticos, óculos, lentes e embalagens, entre outros produtos (HUANG *et al.*, 2012; RAJASÄRKKÄ *et al.*, 2014; REN *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2010).

Figura 3. 6- Fórmula estrutural do policarbonato e da resina epóxi



Fonte: Arquivo pessoal.

A capacidade de produção mundial de BFA na década 80 no século XX foi de 1 milhão de toneladas, e mais do que 2,2 milhões de toneladas em 2009 no século XXI. Em 2003, o consumo dos EUA foi de aproximadamente 8 milhões de toneladas, 72% das quais foram utilizadas para a produção de plástico policarbonato e 21% em resinas epóxi. Nos EUA menos de 5% do BFA produzido é utilizado em materiais que contenham alimentos (CHEN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2016).

Em 2010, a produção anual de BFA foi de aproximadamente 5 milhões de toneladas e esta produção de BFA ao longo dos anos vem só crescendo. Muitos dos países desenvolvidos têm grandes capacidades de produção de BFA, especialmente a Alemanha, China, Holanda, EUA e Japão. A capacidade de produção de BFA na Europa Ocidental foi estimado em 830 milhões de toneladas em 2000, cresceu 4% por ano entre 2000 a 2006 e teve um crescimento de 2% por ano no período 2006-2010 (ARISTIAPAN *et al.*, 2015; BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009; HUANG *et al.*, 2012). No Brasil, a capacidade de produção de BFA em 2008 foi em torno de 27 toneladas por ano e estima-se que essa produção cresça aproximadamente 5% até 2019.

A partir dos anos 1970, começaram a surgir as primeiras evidências sobre os malefícios do BFA na saúde humana. Mesmo assim, sua aplicação em plásticos só aumentou, e hoje em dia é onipresente em produtos feitos de policarbonato transparente, além de ser um negócio altamente lucrativo (HUANG *et al.*, 2012).

3.3.2. Toxicidade

O bisfenol A nos últimos anos tem sido amplamente estudado, por causar uma variedade de efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento em animais e seres humanos, incluindo os efeitos em doses muito inferiores às que mostram efeitos adversos em estudos de toxicidade de rotina (CHEN *et al.*, 2016; DEKANT; VÖLKELE, 2008).

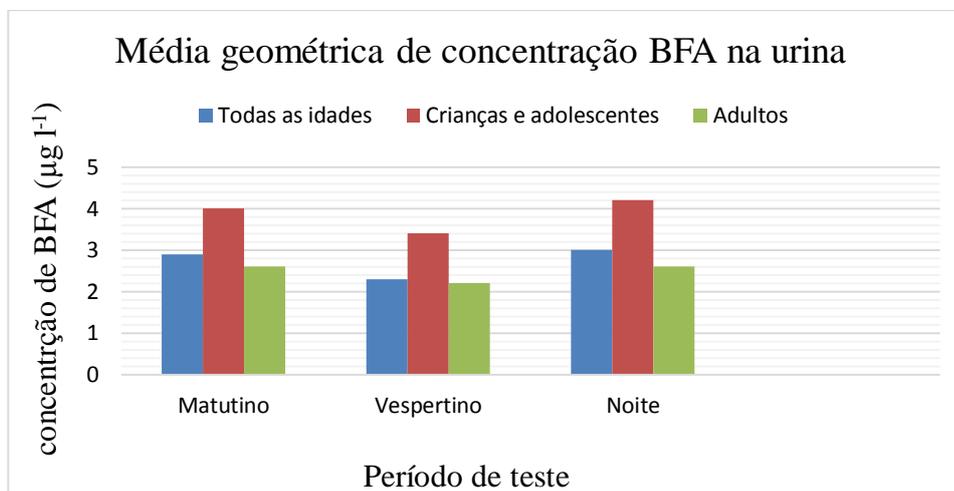
Em 1930, Dodds e Lawson descobriram as primeiras evidências de toxicidade do BFA, considerado como um estrogênio artificial. Nunca se utilizou o BFA como hormônio sintético com atividade farmacológica. Entretanto, o interesse pelo BFA neste contexto foi substituído por uma outra substância sintética, o Dietilestilbestrol (DES), com estrutura semelhante e propriedades estrogênicas ainda mais potentes. O DES foi posteriormente retirado de circulação devido à sua associação com cânceros do aparelho reprodutor em jovens, filhas de mulheres que durante a gravidez tomaram DES, servindo como primeiro sinal de alerta para propriedades tóxicas semelhantes do BFA, que vieram a ser confirmadas muitos anos mais tarde (FEITEIRA; DUARTE; LEAL, 2015).

No entanto, estudos realizados em 1936 por Dodds e Lawson confirmaram o efeito estrogênico do BFA sobre a saúde humana. Os seus primeiros experimentos foram conduzidos em ovários retirados das fêmeas de ratas. Após cada rata foi alimentada diretamente com BFA. Os resultados publicados a partir dessa pesquisa pioneira mostraram um excesso de ativação dos receptores de estrogênio mediante atividade agonista. Agonistas, como o BFA, são produtos químicos que imitam o substrato molecular original, suscitando numa reação química semelhante ou idêntica a original. Os dois pesquisadores estavam particularmente interessados nos componentes moleculares que acionavam o aumento da concentração do hormônio estrogênio e não tanto nos efeitos. Pesquisas recentes têm sido exaustivas e muito mais conclusivas, talvez estimuladas pela sua popularidade e porque o uso deste composto tem aumentado ao longo dos anos (FEITEIRA, DUARTE, LEAL, 2015; TOXIPEDIA, 2014).

Em um estudo recente realizado nos EUA foram medidos os níveis de BFA presente na urina de cerca de 3.000 pessoas selecionadas aleatoriamente (com idade de 6 anos para cima), e foi encontrada em mais de 92 por cento das pessoas testadas uma concentração alta de BFA. Uma análise

estatística mostrou que as crianças e adolescentes tinham uma concentração de BFA mais elevada do que os adultos, como pode ser mostrado na Figura 3.7 (TOXIPEDIA, 2014).

Figura 3. 7-Média geométrica de concentração BFA ($\mu\text{g L}^{-1}$) na urina das pessoas testadas

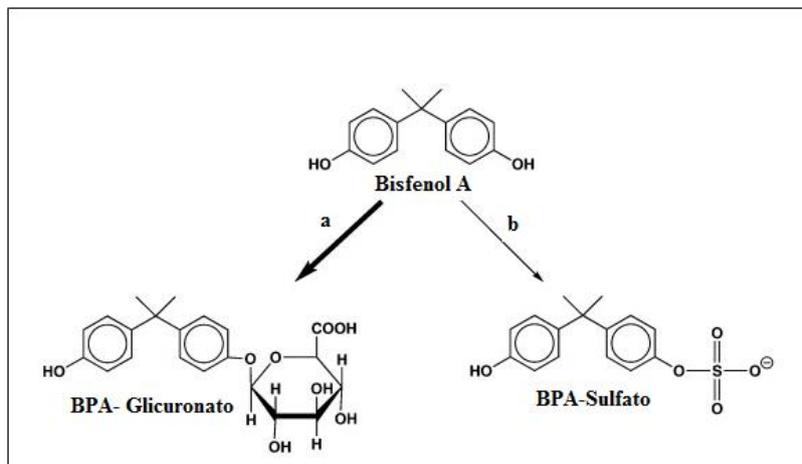


Fonte: Adaptado da TOXIPEDIA, 2014.

Calafat e colaboradores (2008) supuseram que as concentrações mais elevadas de BFA em crianças e adolescentes podem ser devido à alta taxa de consumo de alimentos industrializados e a inalação de ar. As diferenças entre os três grupos também podem estar relacionadas com diferentes taxas ou mecanismos de absorção, distribuição, metabolismo ou excreção de BFA pela urina (TOXIPEDIA, 2014).

Em um estudo, Dekant e Völkel (2008) relataram que, após administração oral, o BFA é rápida e eficientemente (>95%) absorvido pelo trato gastrointestinal, e, conseqüentemente, sofre uma biotransformação na mucosa intestinal e um extenso efeito de primeira passagem hepática na parede do intestino e no fígado. Durante esta primeira passagem hepática, a conjugação do ácido glicurônico em glicuronato é a principal rota de biotransformação deste xenobiótico em ratos e primatas, enquanto que, a sulfatação ocorre em menor proporção. A formação de BFA conjugado é considerado uma reação de detoxificação, uma vez que tanto o BFA-glicuronato e BFA-sulfato são ausentes de atividades estrogênicas enquanto que, o BFA livre tem uma fraca afinidade com receptores estrogênicos, sendo assim um processo de bioativação (DEKANT; VÖLKEL, 2008; VANDENBERG *et al.*, 2012). A Figura 3.8 representa as principais vias de biotransformação do BFA em roedores e humanos.

Figura 3. 8: Principais vias de biotransformação do BFA em roedores e humanos: (a) conjugação com ácido glicurônico e (b) conjugação com sulfato



Fonte: DEKANT; VÖLKEL, 2008 (modificada).

O BFA-glicuronato, como um principal metabólito é suficientemente único e estável para servir como um biomarcador para avaliar a exposição de BFA. Devido à solubilidade deste composto conjugado em água, o metabólito glicuronato é rapidamente eliminado e excretado da urina em humanos por um tempo de meia vida inferior a 6 horas, após a administração oral (CORRALES *et al.*, 2015; DEKANT; VOLKEL, 2008).

Para a verificação da quantidade de BFA livre ou metabolizado presente na urina de humanos foi realizado o seguinte estudo: 60-80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de BFA foi administrado oralmente em 6 voluntários adultos saudáveis, a urina foi recolhida e o BFA foi determinado por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por espectrometria de massas com um limite de detecção de 6×10^{-9} mol L^{-1} de BFA. No entanto, este método não conseguiu detectar BFA livre na urina dos voluntários, somente o BFA-glicuronato foi determinado após 6 a 34 horas de ingestão do BFA, e cerca de 96 horas, 100% da dose de BFA ingerida foi eliminada da urina ($t_{1/2}=5,4$ horas). Porém, quando se utilizou o método analítico LC-ESI-MS/MS (limite de quantificação de $1,5 \times 10^{-11}$ mol L^{-1} para BFA e $6,5 \times 10^{-11}$ mol L^{-1} para BFA-glicuronato, respectivamente), o BFA livre na urina foi observado em 2 dos 6 voluntários numa concentração muito baixa inferior a 2% da dose administrada ($1,0 \times 10^{-11}$ mol BFA/mg de creatina). Dentro de um tempo de 5 horas após administração oral do BFA, este foi recuperado na urina tanto na forma livre (homens: 97% e mulheres: 84%) como conjugado com glicuronato (homens: 75% e mulheres: 85%) (FEITEIRA; DUARTE; LEAL, 2015).

3.3.3. Aspectos legais

Em 2008, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (do inglês *European Food Safety Authority*, EFSA) emitiu um parecer científico adicional sobre o bisfenol A, referente à sua eliminação do corpo e avaliação de risco para seres humanos. O parecer concluiu que recém-nascidos poderiam efetivamente eliminar o bisfenol A em níveis muito mais altos do que a ingestão diária aceitável (IDA) de 0,05 mg kg⁻¹ de peso corporal. Em seu rascunho para publicação sobre a avaliação do bisfenol A em aplicações para contato com alimentos, a Administração de Alimentos & Medicamentos (do inglês *Food & Drug Administration*, FDA) estima que uma criança está exposta a 0,00242 mg de bisfenol A por quilo de massa corpórea por dia e um adulto a 0,000185 mg de bisfenol A por quilo de massa corpórea por dia. A polêmica sobre o bisfenol A surgiu a partir de estudos recentes que levantaram dúvidas quanto à sua segurança. Isso abriu discussão sobre o assunto em diversos países, demandando posicionamento de órgãos reguladores assim de organismos supranacionais, como a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Em 2010, a OMS realizou uma reunião com especialistas de vários países para discutir sobre o assunto BFA, destacando os seguintes pontos: para muitos dos desfechos estudados a exposição ao BFA é muito inferior aos níveis que causariam preocupações, não interferindo em problemas de saúde, em estudos de toxicidade sobre desenvolvimento e sobre reprodução, nos quais são avaliados os desfechos convencionais, somente apresentam problemas em doses elevadas de BFA com desenvolvimento neurológico específico ao sexo, ansiedade, mudanças pré-neoplásicas nas glândulas mamárias e próstata de ratos e parâmetros visuais do esperma. com doses. Segundo os especialistas, devido à considerável incerteza relacionada com a validade e relevância destas observações referentes a baixas doses de BFA seria prematuro afirmar que estas avaliações fornecem uma estimativa realista do risco à saúde humana. No entanto, estes resultados devem orientar estudos a fim de reduzir as incertezas existentes (ANVISA, 2008).

Em alguns países, inclusive no Brasil, foram proibidos a importação e fabricação de mamadeiras de policarbonatos que continham bisfenol A, considerando a maior exposição e susceptibilidade dos indivíduos usuários deste produto. Esta proibição está vigente desde janeiro de 2012 e foi feita por meio da Resolução RDC n°. 41/2011. Assim, mamadeiras em policarbonato não podem ser comercializadas no Brasil (ANVISA, 2008).

3.3.4. Presença de BFA no ambiente e alimentos

A exposição ao BFA e outros interferentes endócrinos podem ocorrer de diferentes formas, como através da ingestão de água, ar, ao contato com o solo e ingestão de alimento contaminado. No caso dos seres humanos estima-se que mais de 90% dessas substâncias ambientais são absorvidos por via digestiva, principalmente através de alimentos contaminados (BILA; DEZOTTI, 2007).

A presença de BFA no ambiente e em alimentos é resultante de atividades antrópicas. Os resíduos de BFA são diretamente ou indiretamente liberados em corpos d'água e na atmosfera por via de descarga industriais durante a produção de policarbonato/ resina epóxi, dentre outros produtos comerciais. Além disso, o BFA também pode ser liberado para o ambiente a partir de garrafas, embalagem que contêm alimentos, papel e plantas de plástico (HUANG *et al.*, 2012). Apesar de uma meia vida de apenas 1-10 dias no solo, sua onipresença torna um poluente extremamente importante para estudos. Qualquer resíduo remanescente de BFA, que não reagiu nos produtos de policarbonato e resinas epóxi podem lixiviar em alimentos ou no ambiente.

O BFA é descarregado no meio aquático (tanto na água doce quanto em água marinha), não só a partir da migração de produtos à base de BFA, mas também através de efluentes de estações de tratamento de águas residuais e aterros sanitários (HUANG *et al.*, 2012).

As estações de tratamento convencionais de água e esgoto não são especificamente concebidas para remover todo interferente endócrino (IE) presente e, assim, o BFA pode persistir através do tratamento e chegar a ser repassados para os consumidores de água. O BFA na água potável é relatado principalmente pelo contato com resinas epóxi e poliéster-estireno usados em revestimentos de tanques de concreto e de tubos de aço usados nos sistemas de abastecimento de água e esgoto. Rodriguez-Mozaz *et al.* (2004), em seu estudo realizado em rios da China relatou que a maior concentração de BFA encontrada foi no rio Llobregat (China) foi de $0,295 \mu\text{g L}^{-1}$ estava de acordo com os valores relatados por Fromme e colaboradores (2002) para outros rios na região da China. Nos EUA, Alemanha, Japão, Holanda os níveis de BFA na água de alguns rios foram de $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ou menos, exceto em algumas amostras de água que foi de $21 \mu\text{g L}^{-1}$ (LIANG, 2015).

Estudos recentes de monitoramento ambiental de resíduos de BFA indicam a presença de BFA em vários sistemas aquáticos naturais e águas residuais em concentrações variando de menos que $1 \mu\text{g L}^{-1}$ até $149 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOFFREDO *et al.*, 2010). Yamamoto *et al.* (2001), encontraram BFA nos lixiviados em aterros de resíduos perigosos, a uma concentração variando de $1300 \mu\text{g L}^{-1}$ a $17200 \mu\text{g L}^{-1}$.

L⁻¹ e em lamas de esgotos em concentrações que variaram de 0,033 mg kg⁻¹ a 36,7 mg kg⁻¹ (LOFFREDO *et al.*, 2010).

No estudo realizado por Corrales e colaboradores (2015), para a determinação de concentração de bisfenol A em efluentes nas Estações de tratamentos de esgotos foram detectados 370 µg L⁻¹, mas na maioria dos casos, níveis em efluentes são menores que 5 µg L⁻¹.

A presença de BFA nesses sistemas, é, portanto, de grande preocupação ambiental, e assim, o controle de remoção é necessário para reduzir o risco de contaminação da água natural e do solo.

3.4. Procedimentos Analíticos

3.4.1. Preparo de amostras

Uma análise química tem como objetivo obter dados qualitativos e/ou quantitativos a respeito de um ou mais componentes de uma amostra. Quando a técnica analítica cromatográfica é a escolhida, a mesma é dividida em três etapas: pré-cromatográficas, cromatográficas e pós-cromatográficas. A análise pré-cromatográfica é constituída por amostragem, transporte da amostra até o laboratório de análise, e o preparo da amostra, que é constituída pelas técnicas de extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS), microextração em fase sólida (MEFS), dentre outras. A técnica cromatográfica é utilizada para a separação do analito e de seus principais contaminantes, gerando dados necessários para sua identificação e/ou quantificação, que envolve as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (CL/EM/EM), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), etc. E por fim, a técnica pós-cromatográfica que objetiva tratar os dados qualitativa e quantitativamente (BORGES; PEREIRA; MANO, 2015).

As técnicas analíticas de preparo de amostras utilizadas no monitoramento e identificação de micropoluentes no meio ambiente são um importante tópico da química analítica. A escolha e o desenvolvimento de métodos analíticos que determinam com acurácia essas substâncias em concentrações na faixa de µg L⁻¹ e ng L⁻¹ em matrizes ambientais complexas, tais como, águas naturais, solo, sedimentos, lodo biológico e efluente de ETE, é um desafio para muitos pesquisadores (BILA; DEZOTTI, 2007).

Na determinação de estrogênios e outros contaminantes em concentração a níveis traços em amostras aquosas, os métodos analíticos mais utilizados são frequentemente baseados na extração por fase sólida (EFS), derivatização e detecção por CG/EM, CG/EM/EM ou CLAE/EM.

O preparo de amostras certamente é a etapa mais importante do processo analítico, principalmente porque é a maior fonte de erros de imprecisão e inexatidão. Essas técnicas de preparo de amostras têm como objetivos extrair, isolar, *clean up* e concentrar os analitos de interesse. Um preparo de amostras ideal deve agregar características tais como: eliminação de interferentes da matriz, perda mínima de amostra, pré-concentração do analito, boa recuperação, compatibilidade com a técnica de detecção, simplicidade, robustez, reprodutibilidade, rapidez e, preferencialmente, baixo custo (CHEN, 2008; SANTOS *et al.*, 2012). Além da extração em fase sólida (EFS), existe várias outras técnicas de extração que podem ser utilizadas para preparar uma amostra antes da sua análise em um equipamento analítico. Dentre essas técnicas de preparo de amostras, as mais utilizadas são a extração líquido-líquido, extração Soxhlet, microextração em fase sólida, extração sortiva em barra magnética, microextração líquido-líquido dispersiva, dentre outras.

3.4.2. Extração em Fase Sólida

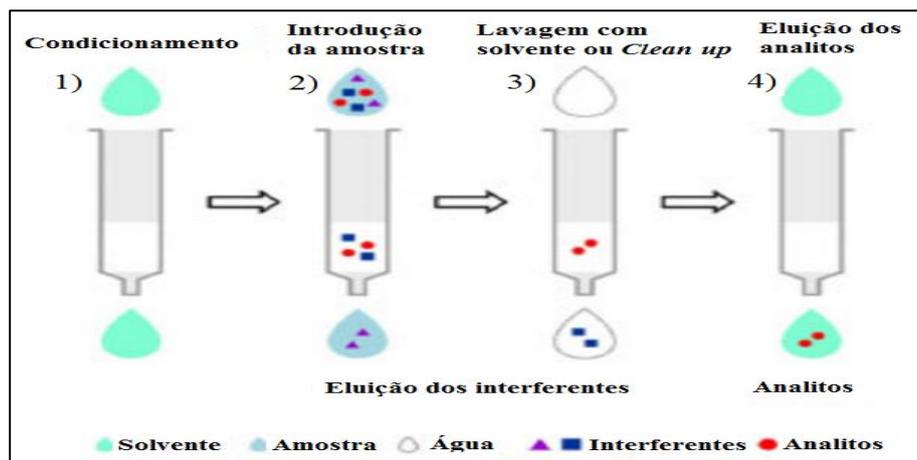
Dentre as técnicas de extração mais utilizadas, a extração em fase sólida (EFS) (*solid phase extraction - SPE*) é, atualmente, uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para extração e pré-concentração de compostos presentes em matrizes complexas em níveis de traços de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} (SANSON *et al.*, 2014).

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão que foi introduzida no início dos anos 1970 e disponível comercialmente desde 1978, na forma de cartuchos descartáveis recheados com adsorventes sólidos, modificados ou não, que possibilitam um mecanismo semelhante observado na cromatografia líquida, para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido (ELL), tais como, menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes para EFS. Porém, apresenta algumas desvantagens também como o tempo elevado de análise, o alto custo dos cartuchos (os cartuchos são utilizados uma única vez) e dos dispositivos comerciais multivias (*manifolds*) e a dificuldade de seleção de um sorvente adequado para a aplicação desejada.

Os principais objetivos da EFS são a extração e/ou concentração do analito, o isolamento dos analitos, remoção do interferentes da matriz ou limpeza da amostra (*clean up*) e estocagem da amostra. A execução da técnica de EFS mostrada na Figura 3.9 consiste em quatro etapas, sendo elas:

(i) o condicionamento do cartucho com um solvente adequado que objetiva-se ativar os sítios seletivos do adsorvente e também eluir algumas impurezas presentes no cartucho, (ii) a percolação da amostra no cartucho para retenção do analito de interesse, (iii) a limpeza (ou *clean up*) do cartucho com passagem de um solvente para eliminação de interferentes menos retidos que os analitos (etapa opcional) e (iv) a eluição dos compostos de interesse pré-concentrado.

Figura 3. 9- etapas da extração em fase sólida (EFS)



Fonte: Adaptado de CALDAS *et al.*, 2011.

A escolha do tipo e quantidade de adsorvente, volume de amostras e de solvente para o condicionamento do cartucho, para eliminação de interferentes e eluição dos analitos de interesses são alguns dos parâmetros extremamente importantes que devem ser considerados durante o preparo de amostra. Na escolha do adsorvente leva-se em conta as propriedades dos analitos de interesse e a natureza da matriz dos interferentes a serem eliminados. Na etapa de condicionamento do cartucho, o solvente empregado dependerá do adsorvente a ser ativado e da matriz a ser processada, optando-se por um solvente com características similares ao utilizado na amostra. É importante que o adsorvente não seque nesta etapa, para não haver a formação de caminhos preferenciais que comprometa a extração. O volume de amostra utilizado pode variar de μL a vários mL . A velocidade de aplicação da amostra, deve ser lenta, com uma vazão menor que 2 mL min^{-1} , podendo ser ajustada controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada no processo. Em alguns casos, o ajuste do pH das amostras é necessário para estabilizar os analitos e aumentar a sua retenção no adsorvente.

A etapa de *clean up* (limpeza) é de extrema importância para eliminar impurezas presentes na matriz do composto de interesse que podem interferir no processo analítico. Nesta etapa, deve-se utilizar um solvente que tenha força suficiente para a eliminação dos interferentes. Um solvente ideal

é o próprio solvente da amostra ou mistura com solvente orgânico, desde que ele não remova os analitos de interesse.

Para eluir o analito deve-se utilizar um volume reduzido de solvente, de forma que a solução eluída já se encontre em uma concentração apropriada para análise.

A concentração do analito se refere aos analitos que ficam retidos na fase sólida para uma posterior eluição, onde passa-se um volume grande de amostra pela fase sólida que retém os analitos, deixando passar o solvente e os interferentes. Em seguida, esses analitos são eluídos com um volume reduzido de solvente, para que estejam bem mais concentrados que na amostra original. A partir disso, obtém-se o fator de concentração pela razão entre o volume inicial de amostra aplicado no cartucho e o volume final de solução concentrada. A concentração pode ser aumentada por um fator de 100 a 5000 vezes, tornando possível a análise qualitativa e quantitativa a nível traços. Esse tipo de operação é muito utilizado nas análises de contaminantes emergentes em água potável de rios, lagos, represas, e de outras fontes, nas quais a determinação direta é inviável (CALDAS *et al.*, 2011; JARDIM, 2010; LANÇAS, 2010).

A EFS pode ser conduzida tanto nos modos *off-line* como no *on-line*. No modo *off-line*, a mais usada na EFS, o processamento das amostras e a separação cromatográfica ou eletroforética são conduzidos separadamente. Após a etapa de pré-tratamento, a amostra é introduzida de modo convencional no sistema cromatográfico. No modo *on-line*, o mesmo equipamento incorpora os dispositivos para extração, clean-up e eluição da amostra e o cromatógrafo (sendo o cromatógrafo a líquido o mais comum), resultando em uma operação sequencial e automatizada. Os sistemas *on-line* são extremamente convenientes para rotina analítica. Na Tabela 3.6 têm-se as comparações das características dos sistemas *off-line* e *on-line*.

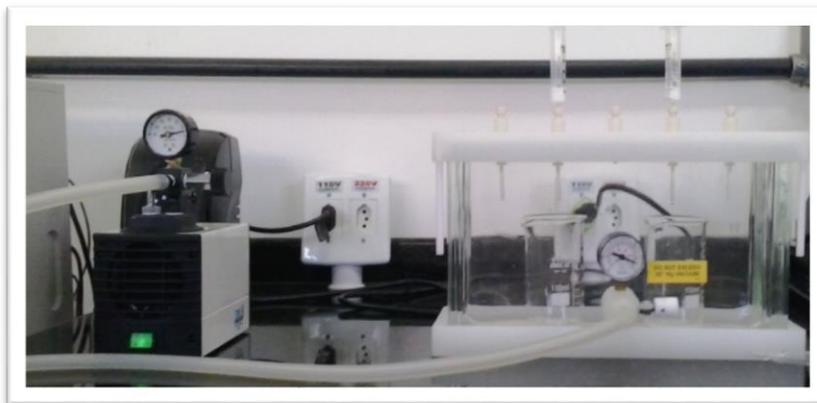
Tabela 3. 6- Comparações das características dos sistemas *off-line* e *on-line*

EFS <i>Off-line</i>	EFS <i>On-line</i>
Análise de uma alíquota do extrato	Análise de todo o extrato
Elevados volumes de amostra	Pequenos volumes de amostra
Cartuchos descartáveis	Cartuchos reutilizáveis
Possível perda de analito por evaporação	Não há perda de analito por evaporação
Consumo mais elevado de solventes orgânicos	Menor consumo de solventes orgânicos
Tempo de análise mais longo	Tempo de análise reduzido

Fonte: Adaptado de JARDIM, 2010.

Os equipamentos utilizados na EFS são, no mínimo, um *manifold* e uma bomba de vácuo, como pode ser ilustrado na Figura 3.10.

Figura 3. 10- Equipamento de extração em fase sólida usando *Manifold*

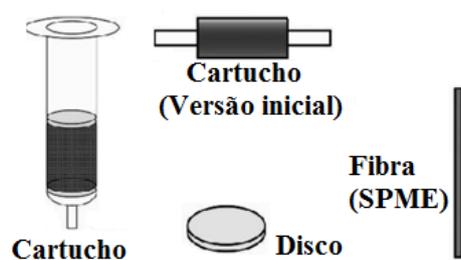


Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar de ser largamente utilizado e de ter se mostrado eficaz, o sistema para EFS usando *manifold* apresenta algumas desvantagens conforme referenciado por Sodré *et al.*, (2007). Dentre essas limitações observadas, pode-se destacar o controle combinado da vazão da amostra e da intensidade do vácuo, a contaminação cruzada por meio da lixiviação de compostos orgânicos contidos nos tubos flexíveis de bombeamento, contaminação da amostra uma vez que o cartucho de extração fica em contato com o ar, o uso prolongado da bomba de vácuo, que pode provocar falha momentânea ou permanente do equipamento e o elevado custo do material a ser empregado na extração.

A EFS, na sua forma mais comum, emprega fases sólidas (adsorventes), recheadas em cartuchos em formato de seringa, barril, ou disco que são formados por um tubo de polipropileno ou de vidro. Na Figura 3.11 está ilustrado alguns desses formatos empregados na EFS e o formato mais popular em EFS continua sendo, o tipo cartucho (CALDAS *et al.*, 2011; JARDIM, 2010; JARDIM, 2015; LANÇAS, 2008).

Figura 3. 11- Formatos empregados em EFS



Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2008.

As fases sólidas utilizadas na EFS são similares às fases estacionárias empregadas em cromatografia líquida em coluna, conseqüentemente os mecanismos de separação também são similares. Os principais mecanismos são: adsorção, partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão. Estes mecanismos estão associados aos processos químicos, físicos e mecânicos que atuam durante a separação. Dentre estas principais forças químicas e físicas que atuam entre o analito e adsorvente estão as interações de van der Waals, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica, no caso da fase reversa. Já na fase normal, as principais interações são entre grupos polares do analito e da fase sólida, por meio de ligação de hidrogênio, interações π - π , dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido. A maioria dos adsorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos como C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil e aminopropil (NH₂), ligados quimicamente à sílica, utilizados como fase reversa para extrair analitos apolares e de média polaridade (JARDIM, 2010; JARDIM, 2015).

A seleção de uma fase sólida em EFS segue, na maioria das vezes, as mesmas regras utilizadas para a escolha da fase estacionária em CLAE. O primeiro critério a ser considerado refere-se à estrutura química do analito, às propriedades do adsorvente e à composição da matriz da amostra. A Tabela 3.7 ilustra um guia geral da seleção de fases sólidas apropriadas para analitos orgânicos com massas moleculares inferiores a aproximadamente 2000 daltons (JARDIM, 2015).

Tabela 3. 7- Guia geral para seleção de fase sólida, empregando amostras orgânicas contendo analitos com massas moleculares inferiores a 2000 daltons

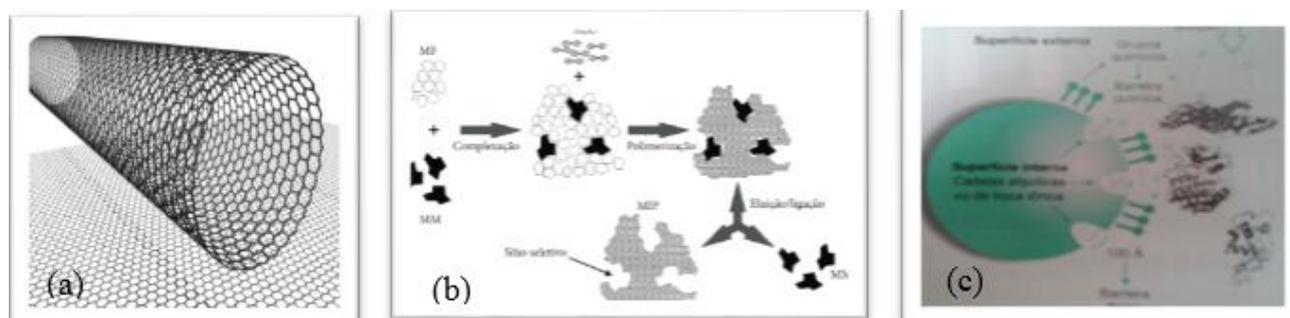
Mecanismo	Sorvente	Tipo de Analito	Tipo de Matriz	Eluente do Analito
Apolar (Fase Reversa) Partição e adsorção	C18, C8, C2, cicloexil, cianopropil, polimérico	Grupos funcionais apolares	Soluções polares (tampão aquoso)	Solventes polares como metanol, acetonitrila e água com pH ajustado
Polar (Fase Normal) partição e adsorção	Sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	Grupos funcionais polares	Solventes apolares, óleos	Solventes apolares como hexano e diclorometano

Troca catiônica	Forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	Grupos funcionais carregados positivamente	Aquosa, força iônica baixa	Tampão como acetato, citrato e fosfato
Troca iônica	Forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	Grupos funcionais carregados negativamente	Aquosa, força iônica baixa	Tampão como fosfato e acetato

Fonte: Adaptado de JARDIM, 2015.

Com o uso cada vez mais acentuado da EFS têm sido desenvolvidos novos tipos de fases sólidas mais seletivas e específicas que melhoram na interação entre o adsorvente e o analito alvo, tais como, os imunossorventes, nanotubos de carbono, os polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymer*) que será o foco principal deste trabalho, os materiais de acesso restrito (RAM, do inglês *restricted access material*) que estão ilustrados na Figura 3.12, dentre outras fases sólidas.

Figura 3. 12- (a) Esquema mostrando a formação de um nanotubo de carbono, a partir de uma camada, formada por anéis aromáticos, que se enrola entre si dando origem a uma estrutura tubular; (b) Esquema genérico da síntese de MIP: MF: monômero funcional; MM: molécula modelo; e ALC: agente de ligação cruzada. (c) Esquema ilustrativo dos mecanismos de exclusão das fases RAM, onde as pequenas moléculas aparecem interagindo com a fase ligada à superfície interna e as macromoléculas são excluídas pelas barreiras físicas ou químicas.



Fonte: Adaptado de JARDIM, 2015.

Os imunossorventes baseiam-se nas interações específicas entre antígeno e anticorpo biológico, em um suporte sólido, como agarose ou sílica, usando o mesmo princípio da cromatografia por afinidade. Apresenta como vantagens: seletividade alta; preferido para meio aquoso e aplicado em matrizes complexas na Química Analítica. E como desvantagens: custo elevado; requer sorventes

diferentes para novos analitos; instável em valores extremos de pH, solventes orgânicos e temperaturas altas; interações não seletivas com analitos ou componentes da matriz.

Os nanotubos de carbono são estruturas semelhantes a agulhas que consistem em uma lâmina de grafite laminada formando um tubo de carbono. Apresenta como vantagens: seletividade e detectabilidades altas, desenvolvimento rápido e fácil, extração rápida dos analitos e custo baixo. Como desvantagens: requer sorventes diferentes para novos analitos; instável em valores extremos e pH e em temperaturas altas

Os adsorventes RAM são materiais biocompatíveis que permitem a injeção direta de amostras, pois excluem os componentes de alta massa molecular da matriz enquanto que retém e separam as pequenas moléculas por meio de interações hidrofóbicas, hidrofílicas, iônica, de afinidade ou impressão molecular. Esses adsorventes previnem o acesso das macromoléculas aos sítios de retenção evitando a sorção irreversível devido à existência de uma barreira física ou química. Dessa forma, apenas pequenas moléculas são retidas. Apresenta como vantagens: seletividade alta; aplicação em matrizes biológicas (soro, plasma, urina, leite); permite a injeção direta da amostra e de fácil preparo em laboratório. Como desvantagens: custo elevado; permite a injeção de poucos microlitros de amostra, o que às vezes é insuficiente para atingir o limite de detecção do analito (JARDIM, 2015). (AUGUSTO *et al.*, 2010; JARDIM, 2010; NETO; LOPES; CASS, 2015).

Os MIP são obtidos por meio da preparação de polímeros com sítios seletivos/específicos de reconhecimento molecular pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor de uma molécula molde formando complexos estáveis, por meio de interação molecular entre esse monômero precursor e molde que será discutido em detalhe nas próximas seções.

3.5. Polímero de Impressão Molecular

A técnica de impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir polímeros dotados de sítios seletivos e específicos de reconhecimento molecular, estereoquimicamente moldados a partir de uma molécula molde (MM). Esses polímeros são chamados de polímeros de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymer*, MIP) (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016).

Os polímeros de impressão molecular (MIP) com capacidade de reconhecimento molecular, consistem em matrizes macromoleculares sintéticas, obtidas com base em métodos de moldagem molecular, que tem a capacidade de reconhecer específica e seletivamente moléculas biológicas tais como fármacos e proteínas. A especificidade desses polímeros impressos na detecção de substâncias

bioativas podem ser comparadas à dos anticorpos monoclonais utilizados em técnicas imunológicas (SOUSA; BARBOSA, 2009).

A partir disso, os polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly imprinted Polymers*) também chamados de materiais biomiméticos, podem ser definidos como um material tridimensional e rígido preparado ao redor de uma molécula molde (MM) que também é denominada *template*, por meio de ligações covalente ou não covalente, interações eletrostáticas ou intermoleculares, com um precursor monômero funcional (MF) (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

3.5.1. Histórico

As primeiras evidências do reconhecimento molecular surgiram na década de 30, quando o químico soviético Polyakov (1931) relatou que a presença de um certo aditivo durante a síntese de um polímero de sílica influenciava diretamente em sua seletividade, ou seja, esses aditivos eram considerados como moléculas moldes capazes de afetar a superfície do polímero resultando em distintas capacidades adsorptivas para moléculas de diferentes massas moleculares (ANSARI; KARIMI, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

O conceito de impressão molecular surgiu a partir da teoria de Pauling para a formação de anticorpos, onde um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respectiva cadeia de anticorpos. Na sua teoria Pauling preconizava que o antígeno se portava como uma molécula molde (MM) e os anticorpos eram modelados ao redor dessa molécula, gerando configurações complementares altamente seletivas. Fundamentado nas notáveis ideias de seu mestre, Dickey sintetizou os polímeros de sílica capazes de reconhecer seletivamente uma dada molécula, onde esse processo envolveu a polimerização de silicato de sódio na presença de diferentes corantes (alaranjado de metila, alaranjado de etila, alaranjado de n-propila ou alaranjado de n-butila), e após a síntese esses polímeros foram lavados e submetidos a experimentos de religação, sendo observado que o polímero na presença de um dado corante foi capaz de se religar mais a esse corante do que aos demais. A partir daí, tornou-se de grande interesse elaborar materiais com seletividade atribuída principalmente à sua estrutura tridimensional complementar a da molécula-molde (MM) (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Em 1972, Wulff e Sarhan sintetizaram um polímero orgânico enantioseletivo para ácido glicérico, utilizando interações covalentes entre a molécula molde (MM) e os monômeros funcionais

(MF). Esses MIPs obtidos por meio da interação covalente apresentavam alta seletividade, como consequência da boa interação entre os monômeros funcionais (MF) e a molécula molde (MM). Porém, a retirada da molécula molde (MM) do sítio de ligação mostrou-se difícil, sendo necessário o emprego de condições drásticas de hidrólise (FIGUEREIDO; DIAS; ARRUDA, 2008; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Na década de 80, Arshady e Mosbach sintetizaram um MIP que interagiu com a MM por meio de interações não-covalentes, permitindo que o processo de desligamento fosse suscetível a fatores como modificação do pH, força iônica, solvente, dentre outros.

Na década de 90 surgiram os primeiros polímeros de impressão molecular aplicados como adsorventes em extração em fase sólida, microextração em fase sólida, extração sortiva em barra magnética, sensores químicos e biológicos, dentre outras aplicações (ANSARI; KARIMI, 2017).

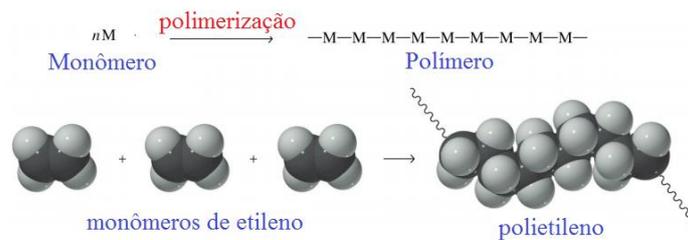
No presente momento, o processo de síntese do MIP não covalente é o mais utilizado, pois esse processo proporciona a obtenção de uma grande variedade de receptores, que apresentam elevadas capacidade e eficiência de reconhecimento molecular em meio aquoso (ANSARI; KARIMI, 2017).

3.5.2. Polímeros

Os polímeros representaram uma imensa contribuição para a Química durante o desenvolvimento industrial no século XX. Em torno de 1920, Staudinger apresentou em um de seus trabalhos em que considerava, embora sem provas concretas, que a borracha natural e outros produtos de síntese, de estrutura química até então desconhecida na época, eram na verdade materiais consistindo de moléculas de cadeias longas, e não agregados coloidais de pequenas moléculas (MANO; MENDES, 2004).

A partir daí, podemos definir um polímero originado do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição), como uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição denominada de meros, ligadas por interação covalente ou por forças intermoleculares (AKCELROUD, 2007). O número de *meros* presente na cadeia polimérica é denominado de *grau de polimerização*, sendo geralmente simbolizado por *n* ou DP (do inglês *degree of polymerization*) (MANO; MENDES, 2004). A Figura 3.13 representa a equação geral de formação de um polímero a partir de um monômero.

Figura 3. 13- Esquema genérico de formação de um polímero



Fonte: Adaptado do https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2254368/mod_resource/content/0/QFL-2349_2016%20Aula%2006%20Polimeros.pdf.

Um polímero pode ser fabricado a partir de matéria-prima de origem mineral, vegetal ou animal. A matéria-prima de origem mineral mais utilizada é o petróleo, gás natural ou hulha para a obtenção de plásticos sintéticos. De origem vegetal tem o látex produzido em certos tipos de árvores tropicais para a obtenção de gomas e borrachas, e a partir da celulose obtém-se o celofane e celuloide. E de origem animal, a caseína produzida no leite é utilizada na síntese da galalita na fabricação de pentes e botões (MANO; MENDES, 2004). Logo, os polímeros podem ser classificados de acordo com sua origem e propriedades tais como:

- (a) Naturais: polinucleotídeos, proteínas, polissacarídeos, gomas e resinas;
- (b) Sintéticos: termoplásticos, cristalinos, amorfos, termorrígidos;
- (c) Elastômeros: borracha, látex.

Os polímeros de origem sintética podem ser classificados como:

- (a) Polímeros de crescimento em cadeia ou por radicais livres: ocorre por meio de adição de monômeros ao final da cadeia em crescimento que é mais reativa, pois o radical é um cátion ou um ânion;
- (b) Polímeros por condensação: combinação de duas moléculas, ocorrendo geralmente a saída de pequenas moléculas tais como, a água ou etanol.

No entanto, para a síntese de polímeros, a polimerização mais utilizada é via formação de radicais livre ou por crescimento de cadeia que será abordada resumidamente na próxima seção.

3.5.3. Polimerização por Radicais livres

A polimerização por radicais livres consiste numa reação em cadeia na qual converte os monômeros em uma cadeia polimérica através da quebra da dupla ligação. Esse método pode ocorrer em condições de temperatura ambiente, pressão atmosférica normal, em polimerização em *bulk* ou solução (SOUSA; BARBOSA, 2004).

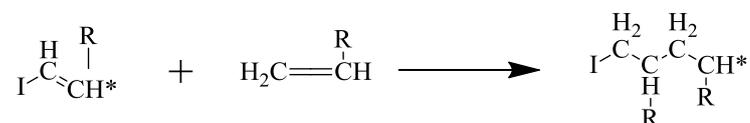
A polimerização por radicais livres pode ser caracterizada por três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (COMARCK; ELORZA, 2004).

A etapa de iniciação ocorre através do uso de iniciadores termicamente instáveis (I-I), que são decompostos com a formação de dois centros ativos (2I*) denominados de radicais livres. Esses radicais livres (I*) atacam a dupla ligação do monômero (C=C) transferindo o centro ativo e dando início a polimerização conforme ilustra as Equações 3.1 e 3.2:

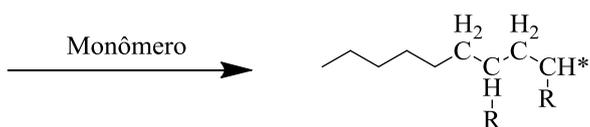


A iniciação pode ser influenciada por alguns parâmetros tais como calor, radiação, concentração do iniciador e a temperatura.

A propagação envolve o crescimento da cadeia polimérica, ou seja, transferência do centro ativo de monômero a monômero, levando ao crescimento da cadeia polimérica em alta velocidade e baixa energia de ativação conforme ilustre a Equação 3.3



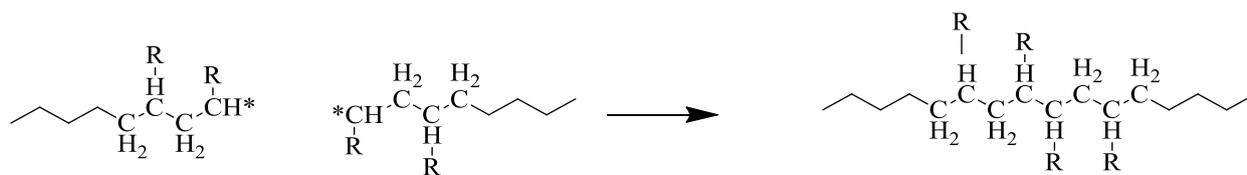
Eq.3.3



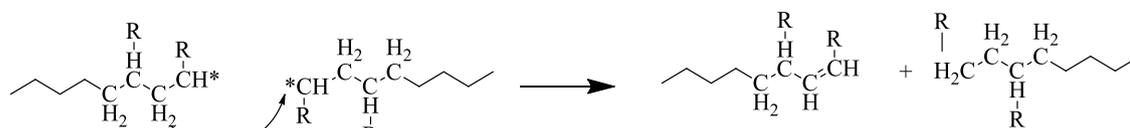
Cadeia Polimérica

E por fim, a etapa de terminação, interrupção do crescimento da cadeia polimérica quando o centro ativo se adiciona a outras espécies presentes no sistema, que ocorre de várias maneiras, dependendo do tipo de monômeros e condições polimerização:

(a) Combinação de dois macros radicais:



(b) Desproporcionamento:



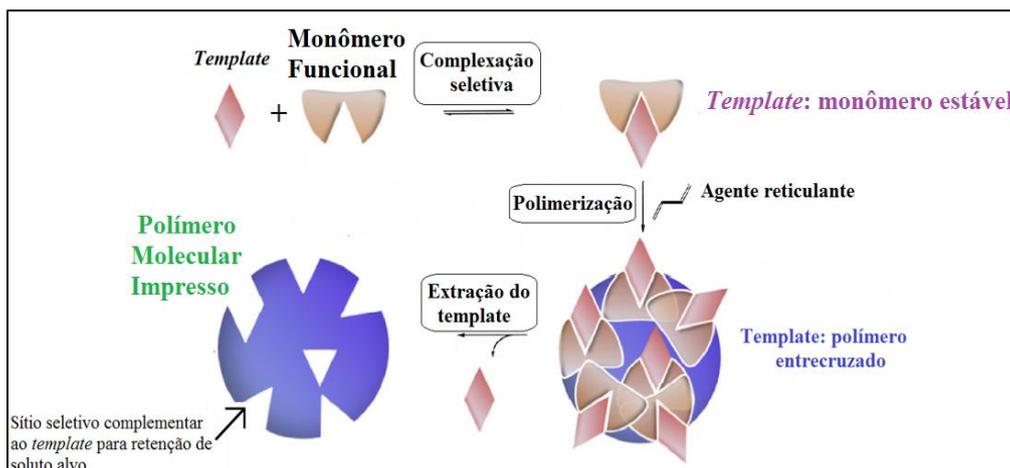
Cadeia com insaturação tipo vinil

A polimerização por radicais livres têm sido uma das técnicas mais utilizadas para o preparo dos MIPs e NIPs por ser considerado um método mais viável em questão de custo e condições reacionais (à temperatura ambiente e à pressão atmosférica).

3.5.4. Síntese do MIP

A síntese do MIP ilustrada na Figura 3.14 ocorre após a formação de um complexo mecanicamente estável entre o monômero funcional (MF) e a molécula molde (MM), com adição de um agente de ligação cruzada que promoverá a formação de ligação cruzada no polímero a fim de formar uma matriz polimérica rígida. Para ocorrência da reação de polimerização é adicionado um iniciador radicalar. A reação de polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz UV na ausência de oxigênio. Por fim, a MM é removida da matriz polimérica por meio de extração com solvente, ou, quando necessário, por meio de clivagem química se a molécula estabelecer ligação covalente com o monômero. Com a remoção da molécula molde, o polímero resultante fica com microcavidades seletivas complementares à molécula molde para retenção de amostras complexas (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005; CORMACK; ELORZA, 2004).

Figura 3. 14- Esquema genérico da síntese do MIP



Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2016.

A técnica de impressão molecular também envolve a preparação de um polímero não impresso (NIP), um polímero controle, que segue o mesmo protocolo do MIP, porém, a diferença é a ausência da molécula molde (MM). No NIP, ocorre a formação de sítios não específicos, desprovidos de cavidades complementares a MM para retenção do analito alvo.

Além do caráter seletivo, os MIPs demonstram vantagens em relação aos materiais biológicos (enzimas e anticorpos) no tocante à estabilidade química, capacidade de adsorção, fácil reprodutibilidade no preparo do polímero, baixo custo e possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou apresenta um alto custo. Outra vantagem do MIP, é que podem ser armazenados secos em temperatura ambiente por longos períodos de tempos, sem perda do seu desempenho inicial (ALVES, 2015; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Nos últimos anos, observou-se um grande aumento do número de trabalhos sobre MIP, denotando sua importância em diversas áreas da Química, com destaque para a Química Analítica, Bioquímica e Ciências Farmacêuticas (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

3.5.5. Variáveis no processo de síntese do MIP

A síntese do MIP segue um protocolo contendo molécula molde (MM), monômero funcional (MF), agente de ligação cruzada (ALC), iniciador radicalar (IR) e um solvente porogênico.

Para o preparo de MIPs com uma elevada capacidade de reconhecimento molecular, são realizadas várias tentativas de sínteses, uma vez que a reação de polimerização pode ser afetada por vários fatores, tais como concentração e quantidade de MM, MF, ALC, IR e solvente (CHEN *et al.*,

2016). No entanto, alguns parâmetros com o objetivo de auxiliar no processo de síntese do MIP, tais como temperatura, tempo de reação, razão molar MF/ALC, razão molar MF/IR, razão molar MF/MM, nem sempre vão garantir a formação eficiente de sítios específicos e seletivos de reconhecimento molecular, logo a necessidade de um estudo individual de cada uma dessas variáveis na busca de uma melhor seletividade (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

(a) Molécula molde (*Template*)

Em todo processo de impressão molecular, a molécula molde assume um papel importante para a geração de MIPs com afinidade e especificidade comparáveis aos dos receptores biológicos para que estes possam ser substituídos pelos MIPs. Então, para serem compatíveis com o processo de polimerização por radicais livres, a moléculas molde deve apresentar grupos funcionais que não impedem a polimerização, estabilidade química durante a reação de polimerização, ser quimicamente inerte e, além disso, deve conter grupos funcionais que podem formar complexos com os monômeros funcionais (CHEN *et al.*, 2016). E por fim, a MM deve ser estável a uma temperatura de aproximadamente 60°C, caso 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN) é usado como iniciador radicalar (IR) ou após exposição a irradiação UV (CORMACK; ELORZA, 2004).

(b) Monômeros funcionais

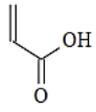
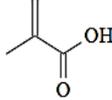
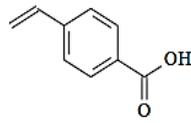
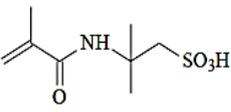
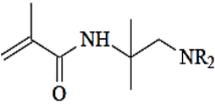
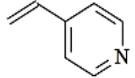
Os monômeros funcionais (MF) são responsáveis pelas interações não covalente com a molécula molde (MM) para formar um complexo monômero-molde estável. Por isso, é importante selecionar um MF adequado que possa interagir fortemente com a MM e formar um complexo estável antes da reação de polimerização (CHEN *et al.*, 2016).

Na maioria dos casos é usado um excesso de monômeros funcionais em relação a quantidade de molécula molde, de modo a favorecer a associação desse com o monômero funcional (em razão MM e MF da ordem de 1:4 e superiores) (CORMACK; ELORZA, 2004).

Atualmente na literatura, encontra-se disponíveis comercialmente vários monômeros funcionais com estruturas e polaridades diversas. Na Tabela 3.8 estão listados alguns destes monômeros mais empregados para o preparo de MIPs. Destes, o ácido meta-acrílico (MAA) têm sido o monômero mais utilizado; no entanto, a escolha dos monômeros depende da natureza da molécula molde. Sendo que, a molécula molde que possuem grupos básicos (acceptor de prótons) interagem mais facilmente com monômeros que contenham grupos ácidos (doador de prótons), ou vice-versa.

Logo, o MAA e a 4-vinilpiridina (VP) são os monômeros mais utilizados na síntese de MIP para moléculas molde básicas e ácidas, respectivamente (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Tabela 3. 8- monômeros mais empregados para o preparo de MIPs

Monômero funcional	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

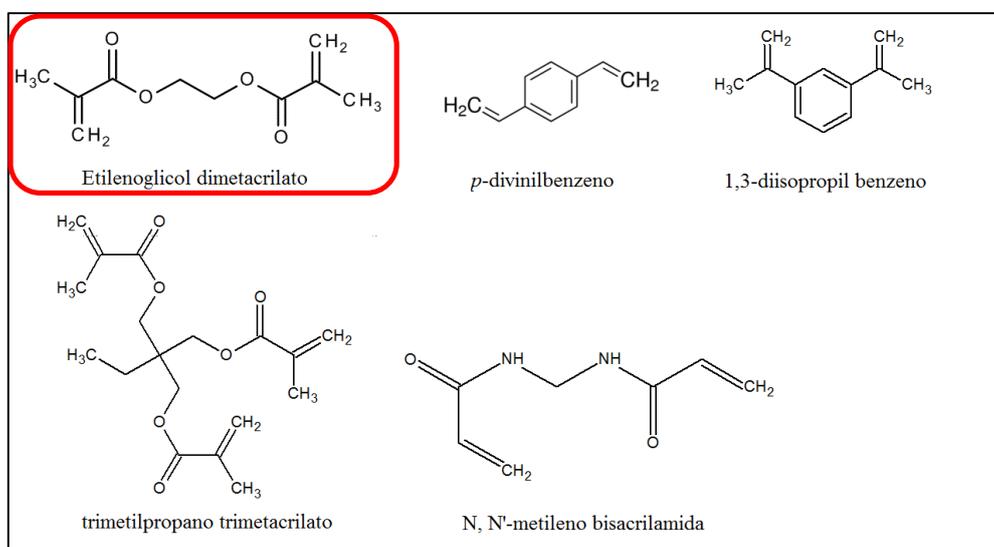
Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2008.

(c) Agente de ligação cruzada

No processo de polimerização, utiliza-se um agente de ligação cruzada (ALC) para estabilizar os monômeros funcionais em torno da molécula molde, formando um polímero de estrutura rígida e altamente reticulada mesmo após a remoção da molécula molde. A natureza e a quantidade de ALC têm profundas influências na seletividade e na capacidade de ligação dos MIPs. Conseqüentemente, uma quantidade bem baixa de ALC irá resultar em propriedades mecânicas instáveis devido ao baixo grau de reticulação, mas se essa quantidade de ALC for extremamente elevada reduzirá o número de locais de reconhecimento molecular dos MIPs (CHEN *et al.*, 2016).

Diversos ALC têm sido usados em impressão molecular com destaque para o etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) devido à sua capacidade de formar polímeros térmica e mecanicamente estáveis e por possibilitar uma rápida transferência de massa durante a síntese. A Figura 3.15 ilustra os principais agentes de ligações cruzadas empregada para o preparo de MIPs.

Figura 3. 15- Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada, usualmente empregados na síntese de MIP



Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2008.

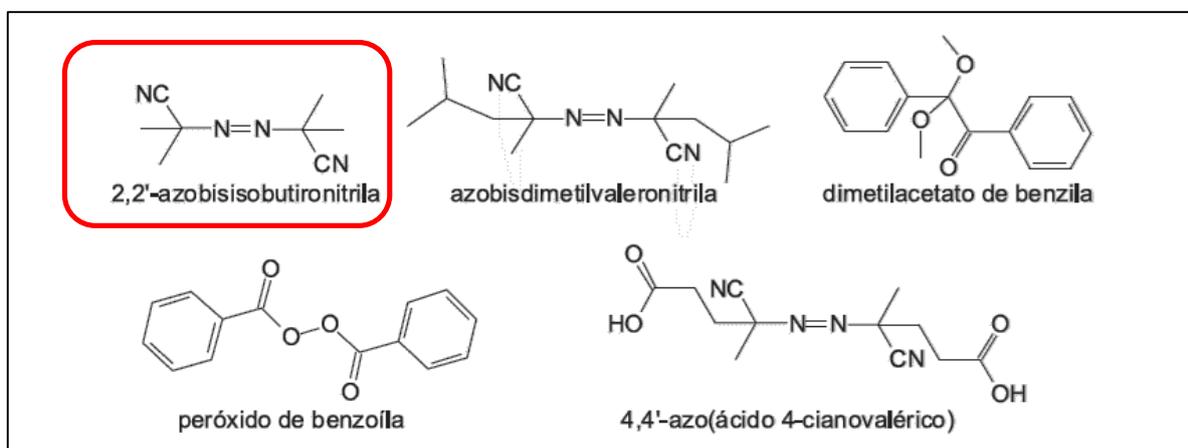
(d) Iniciador radicalar

A grande maioria dos MIPs são normalmente preparados por polimerização via radicais livres, fotopolimerização ou eletropolimerização. A polimerização por radicais livres pode ser iniciada térmica ou fotoquimicamente para uma ampla gama de grupos funcionais e estruturas molde (CHEN

et al., 2016). Na Figura 3.16 está ilustrado alguns dos principais iniciadores radiculares empregados na síntese de MIP, com destaque para o 2,2'-azobisisobutironitrila (AIBN).

O iniciador radicalar (IR) tem como função criar radicais livres para possibilitar o início da reação de polimerização. Contudo, para o início da reação, é necessário algum estímulo físico como o aumento da temperatura ou a incidência de radiação UV. Esse estímulo é determinante na escolha do IR, pois outros reagentes da síntese (MM, MF, ALC) podem ser termo ou fotossensíveis (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008).

Figura 3. 16- Estrutura química dos iniciadores radiculares mais empregados na síntese de MIP



Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO *et al.*, 2008.

(e) Solvente porogênico

Os solventes porogênicos atuam como meios de dispersão e agentes formadores de poros durante o processo de polimerização do MIP e não devem interferir na interação molde-monômero (CHEN *et al.*, 2016).

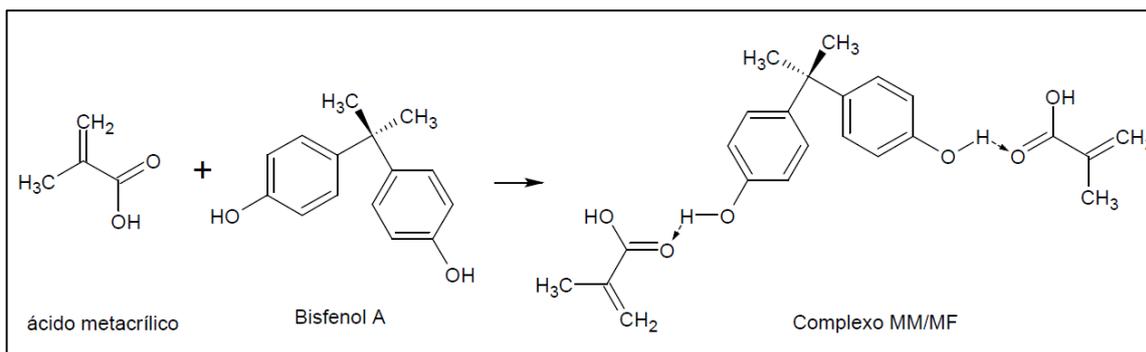
Quando a interação ocorre por meio de forças eletrostáticas ou por ligação de hidrogênio, solventes apolares apróticos (clorofórmio e tolueno) com constante dielétrica baixa oferecem um meio adequado para estabilizar as referidas interações. Por outro lado, solventes com constante dielétrica maior (acetonitrila) também podem ser utilizados, mas os polímeros obtidos podem apresentar afinidade menos acentuada em se ligar novamente a molécula molde. Já os solventes polares próticos (água e metanol) são pouco utilizados neste caso, pois de maneira geral, atuam como competidores no meio reacional interferindo na formação de interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio entre molde e monômero (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Os solventes com características apolares e com baixa constante dielétrica são os mais indicados para síntese do MIP. Entretanto, cabe ressaltar que, como regra geral, após o preparo do polímero e a extração da molécula molde da cavidade seletiva, o MIP resultante terá elevada afinidade pela molécula molde quando o mesmo estiver num meio similar àquele empregado na síntese. 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. Neste caso, para melhor desempenho dos MIP faz-se necessário efetuar uma etapa prévia de extração líquido-líquido da molécula molde (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Normalmente, os solventes utilizados para a síntese de MIP são 2-metoxietanol, tetrahydrofurano (THF), acetonitrila, dicloroetano, clorofórmio, N, N-dimetilformamida (DMF) e tolueno (CHEN *et al.*, 2016).

Dentre as variáveis da síntese tanto do MIP quanto do NIP monômeros funcionais, agente de ligação cruzada, solvente e iniciador radicalar abordadas anteriormente, para o trabalho de pesquisa utilizou-se como monômero funcional o ácido metacrílico (MAA), como solvente acetonitrila, clorofórmio ou tolueno, como agente de ligação cruzada o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e como iniciador radicalar o 4-4'-azo-(ácido-4-cianoaléico). A escolha do monômero MAA é pelo fato deste apresentar grupos aceptores de hidrogênio do radical -OH na carboxila (C=O) e formar ligações de hidrogênio com a molécula molde BFA que apresenta grupos -OH por meio da interação não covalente formando um complexo com BFA: MAA-[OH] mecanicamente estável, conforme mostra a Figura 3.17 (ALVES, 2015; PEÇANHA *et al.*, 2013).

Figura 3. 17- Representação da formação do complexo MAA-BFA



Fonte: Arquivo pessoal.

O EGDMA foi o agente de ligação cruzada escolhido para esta síntese, devido a formação de uma cadeia polimérica de estrutura mais rígida. A utilização dos solventes acetonitrila, clorofórmio ou tolueno na síntese foi devida a sua polaridade moderada que permite o emprego da técnica de impressão molecular para moléculas polares como o BFA e um polímero como maior capacidade de reconhecimento molecular (PEÇANHA *et al.*, 2013).

3.5.6. Tipo de impressão: covalente, não covalente ou semi covalente

Os polímeros de impressão molecular são preparados ao redor de uma molécula molde (MM) com um monômero funcional (MF) por meio de duas principais interações covalentes ou não covalentes. No entanto, também pode-se utilizar a interação semi covalente para o preparo dos MIPs.

As interações não covalentes têm sido amplamente utilizadas no preparo de MIP, devido a sua simplicidade em termos experimentais, obtendo-se MIPs com uma elevada afinidade para o reconhecimento molecular de diversos compostos e aplicabilidade. A etapa de religação da molécula molde pelo MIP também é realizada por interações não covalentes (ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e forças de dispersão de London) (ALVES, 2015; SOUSA; BARBOSA, 2009).

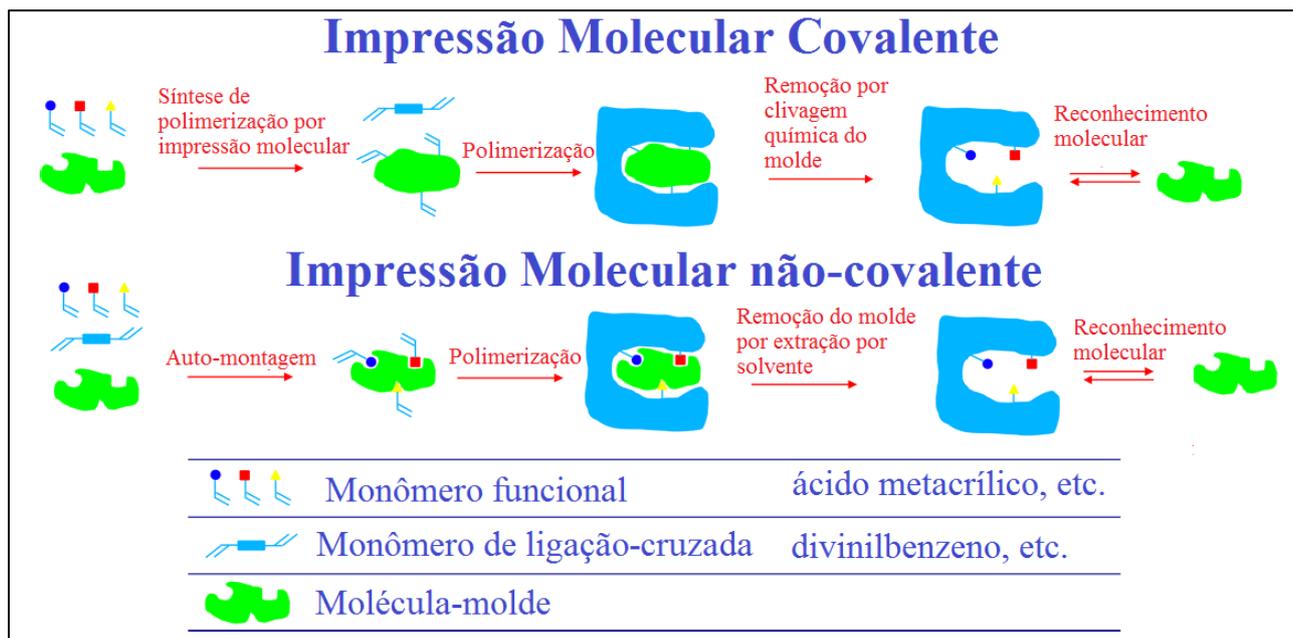
A interação não covalente apresenta como vantagens, uma maior flexibilidade de aplicação dos MIPs para diferentes analitos (molécula molde) e maior facilidade de remoção da MM. E como desvantagens, a heterogeneidade das cavidades receptores produzidas. O excesso de monômeros funcionais distribuídos ao redor da matriz polimérica, conduz a existência de muitos pontos de interação não específica entre a molécula molde e o polímero e um baixo rendimento das cavidades receptoras, devido à quantidade adicionada de molécula molde presente na mistura de pré-polimerização (SOUSA; BARBOSA, 2009).

Durante o preparo de MIPs a interação entre a molécula molde e o monômero funcional pode ocorrer também por ligação covalente. Posteriormente, no decorrer do processo de reconhecimento molecular, volta a ocorrer novamente a ligação covalente entre a molécula molde e o polímero. No entanto, a extração dessa molécula molde da matriz polimérica é extremamente difícil, sendo necessário realizar uma clivagem química para romper essas ligações presentes no molde-polímero (SOUSA; BARBOSA, 2009).

As vantagens de preparar polímeros por ligação covalente é que possuem sítios mais seletivos, maior rendimento e uniformidade destes sítios seletivos. E apresentam como desvantagem, um número limitado de monômeros e molde que estabeleçam ligação covalente, podendo ser empregada somente para moléculas pertencentes à classe dos álcoois, aldeídos, cetonas, aminas e ácidos carboxílicos (ALVES, 2015; SOUSA; BARBOSA, 2009).

Então, uma alternativa de otimizar um processo de impressão molecular mais eficiente e seletiva, surge a técnica de impressão semi covalente. Nesse tipo de interação a síntese do MIP ocorre por interação covalente e religação do molde-polímero por interação não covalente (ALVES,2015). A Figura 3.18 ilustra uma representação esquemática dos principais tipos de interações utilizadas na impressão molecular.

Figura 3. 18- Tipos de ligação na impressão molecular: A) Impressão não covalente; e B) Impressão covalente/semi covalente



Fonte: Adaptado de YOSHIKAWA; THARPA; DIMA, 2016.

3.5.7. Mecanismo de polimerização do MIP e NIP

A seleção de uma técnica apropriada de polimerização depende do tipo de aplicação preferida dos MIPs nas diferentes áreas químicas, tais como em Química Analítica pode ser utilizado como fase estacionária para CLAE ou como adsorvente para EFS (CHEN *et al.*, 2016).

Até agora, diversos métodos diferentes têm sido desenvolvidos para a preparação de MIP. A técnica de polimerização mais utilizada para o preparo dos MIPs é via radicais livres (ou crescimento em cadeia) que constitui um método de síntese importante para a conversão de monômeros a polímeros. Este tipo de método pode ser realizado em condições reacionais suaves (à temperatura ambiente e à pressão atmosférica normal), por meio da polimerização em *bulk* (massa), por precipitação, por emulsão e por expansão em multi etapas (*multi step swelling*). Outro método recente de preparo de MIP que está sendo muito utilizado é a polimerização sobre superfície de sílica modificada (SOUSA; BARBOSA, 2009; TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA 2005).

(a) Polimerização em *bulk* (massa)

Na polimerização em *bulk* o molde (MM), monômero funcional (MF), agente de ligação cruzada e iniciador radicalar são adicionados a um tubo de vidro e começa a iniciação da polimerização por radiação térmica ou UV, na ausência de oxigênio sob o fluxo de nitrogênio, pois o oxigênio inibe a reação de polimerização. Após a polimerização, o monólito obtido precisa de ser triturado, moído, e em seguida, a partícula com uma determinada distribuição de tamanho pode ser utilizada diretamente como a fase estacionária em CLAE e EFS (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). A Figura 3.19 ilustra o processo de síntese de MIP via polimerização por radicais livres.

Figura 3. 19- Esquema genérico da síntese do MIP via polimerização por radicais livres



Fonte: Adaptado de TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005; SAAVEDRA, 2017.

O processo de polimerização em *bulk* é fácil de operar, mas demorado e trabalhoso, tipicamente menos do que 50% das propriedades do polímero é recuperada na forma de partículas utilizáveis. A cavidade de religação pode ser destruída durante os procedimentos de britagem e moagem e partículas irregulares geralmente são menos eficientes no pré enchimento da coluna cromatográfica (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). Os MIPs obtidos por esta técnica de polimerização são mais indicados para as técnicas de extração em fase sólida (EFS).

No entanto, a polimerização em *bulk* apresenta algumas desvantagens, tempo reacional longo, baixo rendimento, tamanho de partículas irregulares e heterogêneas, perda de alguns sítios seletivos durante a trituração do polímero que diminui a sua capacidade seletiva de retenção do analito alvo. Para contornar essas desvantagens de partículas irregulares obtidas pela polimerização em *bulk* um método alternativo foi introduzido denominado de geração de micro pérolas ou microesferas. A grande vantagem do uso destas micropérolas é o tamanho uniforme das partículas obtidas. Partículas destes tipos podem ser preparadas pela polimerização por precipitação, por suspensão, por emulsão e por expansão em multi etapas (*multi step swelling*) que são consideradas métodos mais econômicos e menos trabalhosos frequentemente utilizados para a preparação de MIP com forma uniforme e bom rendimento. E um método recente de preparo de MIP que está sendo muito utilizado é a polimerização sobre superfície de sílica modificada (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA 2005).

(b) Polimerização por precipitação

Este método se mostra bastante semelhante à polimerização em *bulk*, porém, grandes volumes de solventes (5 vezes maior) são adicionados aos reagentes (MF, MM, ALC e IR) para a formação de um precipitado. A mistura reacional (reagentes e solvente) é degaseificada e acondicionada em um banho-maria à temperatura de 60°C por 24 horas. A síntese do MIP por este método é induzida por

luz ou aquecimento na ausência de oxigênio, quando os monômeros e a molécula molde são dissolvidos em um solvente, seguido da adição do agente de ligação cruzada e do iniciador radicalar e as micropartículas são obtidas por meio de centrifugação (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA 2005).

A precipitação das partículas de MIP também pode ser fundamentada em face da formação de ligações cruzadas no polímero, tornando-o pouco solúvel no solvente reacional. A formação de microesferas na forma de precipitado não necessita de agentes dispersantes. A polimerização por precipitação comparada com a de *bulk*, produz partículas de tamanhos uniformes com diâmetro igual ou inferior a 0,1 µm com um maior rendimento de reação, em torno de 85% (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

A desvantagem desse método de polimerização é que a produção de partículas com tamanhos uniformes e diâmetros reduzidos não podem ser utilizadas como fases estacionárias em CLAE, devido a elevada pressão resultante dentro da coluna cromatográfica (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

(c) Polimerização por suspensão

A polimerização por suspensão tem como objetivo a obtenção de microesferas com mais homogeneidade de tamanho. Os reagentes de síntese (MF, MM, ALC e IR) são dissolvidos em um solvente orgânico apolar, em seguida, é adicionada água formando uma emulsão normalmente estabilizada pela adição de um tensoativo, cuja função é evitar a coagulação das gotas dos monômeros durante o processo de polimerização. Para a ocorrência da polimerização, a emulsão é agitada e colocada em um banho-maria (em torno de 50°C), resultando na formação das partículas de MIP com tamanhos uniformes (ARRUDA; DIAS; FIGUEIREDO, 2008; KUBOTA; SOTOMAYOR; TARLEY, 2005).

Apesar da uniformidade do tamanho das partículas ser uma vantagem dessa técnica de polimerização, algumas gotas de água podem-se dissolver na mistura polimérica interferindo na interação monômero-molde, principalmente quando se dá por ligação de hidrogênio. Além disso, quando os monômeros e moléculas moldes possuem alta solubilidade em água, há a possibilidade de ocorrer partição desses reagentes da fase orgânica para a aquosa, resultando em um polímero de baixo reconhecimento molecular. No entanto, a polimerização por suspensão é ideal quando os monômeros e moléculas moldes interagem por interações hidrofóbicas e iônicas (KUBOTA; SOMOTAYOR; TARLEY, 2005).

Para solucionar essa limitação constatada no método de polimerização por suspensão em meio aquoso, foi empregado o agente dispersante perfluorcarbono (perfluoro metil-ciclohexano, PMC) que é imiscível em muitos compostos orgânicos e, conseqüentemente, permite a formação de uma fase inerte ideal para a polimerização. Com o uso de PMC na polimerização por suspensão é possível controlar o tamanho das partículas poliméricas de 5 a 50 μm alterando a massa do dispersante. Os MIPs produzidos por este método em questão são ideais para serem utilizados como fase sólida em CLAE. Porém, a única desvantagem é o alto custo do perfluorcarbono (KUBOTA; SOMOTAYOR; TARLEY, 2005).

(d) Polimerização por expansão em multi etapas

Para suprir as limitações da polimerização por precipitação foi desenvolvido a polimerização por expansão em multi etapas. Esse método é trabalhoso e envolve o emprego de partículas poliméricas com diâmetro bem definido (normalmente poliestireno com diâmetro de 1 μm), nas quais sofrem uma expansão com o monômero e solvente antes da reação de polimerização do MIP. Neste método, as partículas poliméricas atuam como solvente, permitindo a produção de polímeros com tamanhos e poros maiores. Para o preparo dos MIPs, uma microemulsão de partículas de poliestireno é preparada em água contendo o tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS) mais o solvente dibutil ftalato, agita-se até a eliminação da microemulsão. Em seguida, a expansão das partículas de poliestireno é realizada adicionando-se uma microemulsão preparada a partir de iniciador radicalar, solvente e álcool polivinílico como agente dispersante agitando-se novamente. Após a agitação, a molécula molde e o agente de ligação cruzada são adicionados e continua agitando-se, caracterizando a segunda expansão das partículas de poliestireno. E para a obtenção das partículas de MIP, inicia-se a reação de polimerização sob agitação e induzida por aquecimento em atmosfera inerte. As partículas de MIP obtidas são separadas do sobrenadante e submetida a uma lavagem com solvente para a remoção da molécula molde. As partículas de MIP obtidas por este método de polimerização apresentam tamanhos de 5 a 10 μm de diâmetro (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008; CHEN *et al.*, 2016).

(e) Polimerização por emulsão em partículas core-shell

A polimerização por emulsão (ou *in situ*) envolve a formação de um núcleo polimérico em fase aquosa contendo o monômero, solvente, iniciador e emulsificante (sabão) com controle de temperatura e agitação. As partículas formadas são filtradas e colocadas para reagir com uma nova

fase aquosa contendo o monômero, molécula molde, iniciador e emulsificante. Durante a reação de polimerização vai formando partículas de MIP ao redor do núcleo polimérico, em forma de concha (do inglês *core-shell*) com tamanho coloidal de 0,05 a 2 μm (ALVES, 2015).

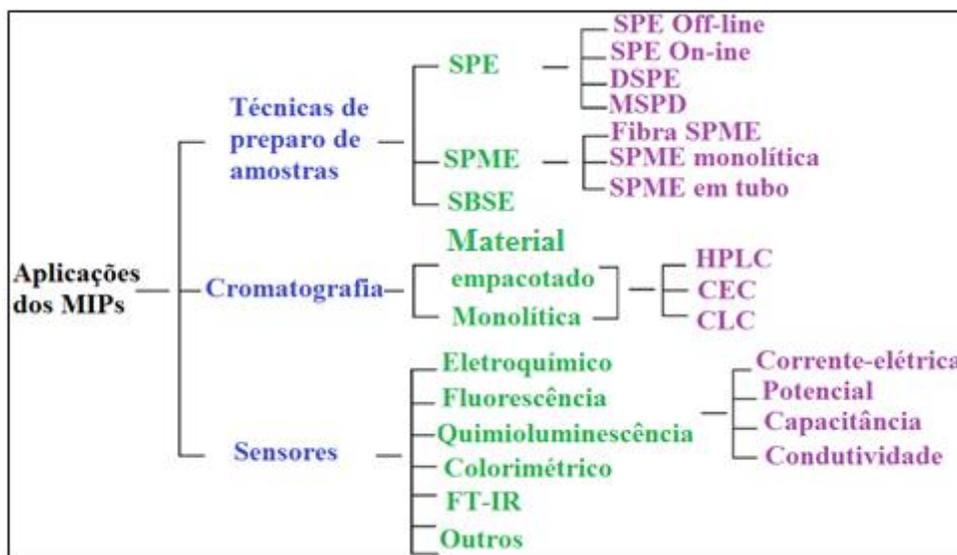
(f) Polimerização sobre a superfície de sílica modificada

Primeiramente, as partículas de sílica com diâmetro de 10 μm , são modificadas com tri- etoxi- aminopropilsilano. A reação de polimerização ocorre após a adição do monômero, iniciador radicalar, agente de ligação cruzada e molécula molde dissolvidos no solvente sobre a superfície da sílica modificada, formando micropartículas de MIP com características uniformes e mecanicamente estáveis (CHEN *et al.*, 2016).

3.6. Aplicação dos MIPs como adsorvente

A aplicabilidade da tecnologia de impressão molecular para o preparo dos MIP em diferentes segmentos da Química, vem alcançando um rápido desenvolvimento, juntamente com o aperfeiçoamento estratégico das técnicas de polimerização tradicionais (em *bulk*, precipitação, suspensão, dentre outras), que estimulam fortemente o avanço da impressão molecular para o preparo de novos MIP mais seletivos. A Figura 3.20 ilustra algumas aplicações dos MIPs seletivos nos diversos segmentos da Química Analítica. Como visto, os MIPs são amplamente utilizados no preparo de amostras, nas separações cromatográficas (EFS, cromatografia em coluna monolítica, CLAE, etc.) e na detecção (detectores por fluorescência, eletroquímicos, sensores e dentre outros) de moléculas bioativas, farmacêuticas, poluentes ambientais, interferentes endócrinos, água, alimentos e dentre outros (CHEN *et al.*, 2016).

Figura 3. 20- Diagrama estrutural das aplicações de MIPs em técnicas de preparo de amostras, cromatografia e sensores



Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2016.

3.7. Adsorção

O fenômeno de adsorção está englobado a uma série de processos de extrema significância tecnológica, ambiental e/ou biológicas, na qual está presente desde o início do século 20. É muito utilizado na indústria em questões relacionada ao meio ambiente. Por exemplo, a adsorção de substratos é uma das primeiras etapas de muitos processos catalíticos, além de também ser utilizada em separações e purificações de misturas em laboratórios e em escalas industriais, e utilizada como técnica para remoção de poluentes presentes em matrizes ambientais (DABROWSKI, 2001).

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos novos tipos de adsorventes sólidos, como fibras de carbono ativados, fulerenos, heterofulerenos, polímeros de impressão molecular (MIPs) e dentre outros adsorventes.

O fenômeno de adsorção é um processo físico-químico onde há a migração de componentes presentes em íons, moléculas ou partículas de uma fase líquida ou gasosa para uma superfície de uma fase sólida. Os componentes que sofrem adsorção são chamados de adsorvato, enquanto que a fase sólida é chamada de adsorvente. A remoção das substâncias presentes na superfície sólida é denominada de dessorção. Dependendo das fases em contato, podemos considerar o processo de adsorção para interface sólido-líquido, gás-líquido, líquido-líquido, sólido-sólido e sólido-gás (XU *et al.*, 2014).

Os componentes presentes em uma substância permanecem adsorvida na superfície sólida por diversas forças intermoleculares, tais como: ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, forças de Van der Waals ou por dispersão de London. Essas forças intermoleculares desequilibradas na

superfície do sólido, como no caso dos MIPs, produzem uma atração ou repulsão das moléculas presente na superfície sólida, isto é, entre uma solução líquida e a superfície de um sólido (SAAVEDRA, 2017). Os processos que sofrem adsorção podem ser classificados como: adsorção física ou fisiosorção e adsorção química ou quimiosorção.

3.7.1. Adsorção Física ou fisiosorção

A adsorção física ou fisiosorção é causada principalmente pelas forças fracas de Van der Waals ou força eletrostática, como as de dipolo-dipolo entre as moléculas do adsorvato e os átomos constituintes do adsorvente na superfície do sólido. Logo, este tipo de adsorção na maioria dos casos pode ser considerado como um processo exotérmico com uma entalpia (ΔH°) de aproximadamente 20-40 kJ mol⁻¹ ocorrendo em temperaturas baixas (SAAVEDRA, 2017).

3.7.2. Adsorção Química ou quimiosorção

Na adsorção química ou quimiosorção ocorre uma interação química, covalente ou iônica, entre o fluido adsorvido e o sólido adsorvente, onde há a transferência de elétrons formando assim as ligações químicas entre o adsorvato e a superfície do sólido, tornando-a extremamente reativa.

Ao contrário da adsorção física, esse processo ocorre em temperaturas mais altas, sendo necessário um controle rigoroso da faixa de temperatura ideal durante a reação química. Esse tipo de adsorção pode ser irreversível ou até mesmo endotérmica, isso quando ocorre a dissociação da molécula e completa mobilidade bidimensional, causando assim um aumento do grau de liberdade e valores positivos na entropia e entalpia (GUELF; SCHEER, 2007).

A capacidade de re-ligação de um determinado adsorvente devido à atração física ou química depende em grande parte da sua capacidade de adsorção. Isto é um parâmetro muito importante para a quantificação do valor da capacidade de adsorção do adsorvente, ou seja, permite prever se este adsorvente é apto para ser utilizado em processo de adsorção (SAAVEDRA, 2017). Esta quantificação da capacidade adsorvativa é dada pela Equação 3.4:

$$Q_{eq} = \frac{(C_0 - C_f)v}{m} \quad (\text{Eq.3.4})$$

Onde, C_0 e C_f ($\mu\text{mol L}^{-1}$) são as concentrações do adsorvato antes e após o processo de adsorção, respectivamente; v (L) é o volume total da solução presente na amostra, m (g) é a massa de adsorvente a ser aplicada; e Q_{eq} ($\mu\text{mol g}^{-1}$) é a capacidade de adsorção no equilíbrio.

3.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupar um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS *et al.*, 2006).

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma *fase móvel* (FM), que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico, que são classificados como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (do inglês *high performance liquid chromatography*, HPLC), cromatografia gasosa (CG) (do inglês *gas chromatography*, GC) (COUCH; HOLLER; SKOOG, 2009; SANSON *et al.*, 2014). Essa FM é forçada a passar através da *fase estacionária* (FE) imiscível fixa, colocada em uma coluna ou sobre uma superfície sólida. Os componentes que são retidos mais fortemente na FE movem-se mais lentamente no fluxo da FM, ou caso contrário, se os componentes interagem mais fracamente com a FE movem-se mais rapidamente no fluxo da FM formando os primeiros picos cromatográficos (CROUCH; HOLLER; SKOOG, 2009).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação cromatográfica importante, uma vez que ela consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões, com a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala e tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade. Utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados e é constituído por: um reservatório de FM, bomba de alta pressão, injetor de amostra, coluna, detector e sistema de aquisição de dados (COLLINS; SILVA, 2006).

Muito detectores de cromatografia líquida frequentemente têm sido, instrumentos analíticos adaptados com células de fluxo para medir baixas concentrações de solutos no fluxo líquido. O detector ideal para a cromatografia líquida deve apresentar um detectabilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade, resposta linear para os solutos que se estenda por várias ordens de grandeza, tempo de resposta curto e independente da vazão da FM, alta confiabilidade e facilidade de uso, similaridade na resposta para todos os solutos e não contribuir para o alargamento dos picos (CROUCH; HOLLER; SKOOG, 2009). A classe de detectores mais usadas em CLAE é a óptica que engloba os de absorvância (fotométricos de comprimento de onda fixo, espectrofotométrico de

comprimento de onda variável, espectrofotométrico por arranjo de diodos), fluorescência, índice de refração e espalhamento da luz (COLLINS, 2006).

3.9. Parâmetros de Validação da Metodologia Analítica

Novos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a determinação de resíduos de contaminantes em alimentos, água ou amostras biológicas como ferramenta principal para assegurar que os produtos estejam nas determinações legais. Para que estes métodos garantam confiabilidade, comparabilidade, rastreabilidade e eficiência nos resultados obtidos, são delineados procedimento de validação do processo analítico empregado, como garantia de qualidade das medições químicas (RATH *et al.*, 2008; RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011).

Um método será considerado validado se suas características estiverem em conformidade com os pré-requisitos estabelecidos na literatura (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2003).

De acordo com o documento do ANVISA-EURACHEM (2004), INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2010) e MAPA (2011), a validação de um método analítico pode ser feita pelos seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão/recuperação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. A determinação desses parâmetros depende da ordem de grandeza da concentração do analito e do equipamento a ser utilizado no método.

3.9.1. Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal analítico, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2010).

A seletividade avalia e quantifica com exatidão o grau de interferência de espécies presentes na amostra, garantindo que o pico de resposta (tempo de retenção característico do analito) seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for bem sucinta, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RATH *et al.*, 2008; RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com Ribani e colaboradores (2004), a seletividade pode ser obtida de duas maneiras. A primeira consiste em comparar uma matriz isenta da substância de interesse (branco) e uma matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. A segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos

(arranjos de diodos, espectrômetro por massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com de um padrão e utiliza-se como indicação de composto puro (RIBANI *et al.*, 2004).

3.9.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em análise, dentro de uma determinada faixa de trabalho. Pode ser obtida através da curva analítica que expressa a relação sinal (resposta) em função da concentração do analito (RATH *et al.*, 2008; RIBANI *et al.*, 2004). Para a determinação da linearidade o número mínimo de níveis de concentração das soluções padrões da curva de calibração deve ser no mínimo cinco (≥ 5) (MAPA, 2011). A Equação da reta que relaciona estas duas variáveis é:

$$y = a + bx \quad (\text{Eq.3.5})$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com eixo y, quando x=0;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

Esta equação pode ser obtida através do método de regressão linear, determinado pelo método de mínimos quadrados (INMETRO, 2010). Além desses coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular o coeficiente de correlação **r**. Esse parâmetro permite estimar a qualidade da curva analítica, de acordo com Brito *et al.* (2003), quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto dos pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Neste caso considera-se:

R=1	Correlação perfeita
0,91<R<0,99	Correlação fortíssima
0,61<R<0,91	Correlação forte
0,01<R<0,30	Correlação fraca
R=0	Correlação nula

Através da curva analítica pode-se determinar a faixa de trabalho e faixa linear de trabalho do método. O intervalo de trabalho do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível

que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método (BRITO *et al.*, 2003).

3.9.3. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com um determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. É determinada pelo coeficiente angular da curva analítica.

Em métodos sensíveis, uma diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal do analito medido que pode levar a um baixo limite de detecção (LD) (INMETRO, 2010).

3.9.4. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e da precisão intermediária (ou reprodutibilidade interna ou intralaboratorial), sendo usualmente expressada pelo desvio padrão e coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2010; MAPA, 2011):

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100\% \quad (\text{Eq.3.6})$$

Onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

Em métodos de análises traços ou impurezas, são aceitos DPR ou CV de até 45%, dependendo da complexidade da amostra (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A repetitividade de um método representa a concordância entre resultados de medições sucessivas realizadas por um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo dia (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária ou reprodutibilidade, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, porém, diferentes analistas e diferentes tempos. Também é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR). Para avaliação da repetitividade e da precisão intermediária o INMETRO recomenda sete ou

mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão (INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004).

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor para diferentes níveis de confiança, calculada pela equação 3.7:

$$\text{Intervalo de confiança (IC)} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Eq.3.7})$$

Em que: t_{n-1} = valor crítico da distribuição de *Student* com n-1 graus de liberdade. O valor de t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança (RIBANI et al., 2004).

3.9.5. Exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Para avaliar a exatidão normalmente são utilizados materiais de referências certificados (MRC) (CRM, do inglês *Certificatted reference materials*), comparação de método, adição de padrão e ensaios de recuperação (RIBANI et al., 2004).

Na ausência de MRC, é feito os ensaios de recuperação, conforme as definições das agências reguladoras ANVISA, IUPAC e INMETRO, é realizado mediante a adição do analito em diferentes níveis de concentrações (baixo, médio e alto) nas amostras brancos em triplicata (n=3). As análises são realizadas conforme procedimento estabelecido e as respectivas concentrações experimentais são calculadas pela curva analítica obtendo a média, estimativa do desvio padrão, o CV das medidas e a recuperação (RATH et al., 2008; RIBANI et al., 2004). A recuperação pode ser expressa pela equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração fortificada}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.3.8})$$

De acordo com Brito et al. (2002), em análise traços o intervalo de aceitação de recuperação do analito em função da concentração pode variar de 40 a 120%, 80 a 110% e 70 a 130%. A Tabela 3.9 mostra os valores de recuperação considerados adequados em função da concentração do analito.

Tabela 3. 9- Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
≥ 10	98-102
≥ 1	97-103
$\geq 0,1$	95-105
$\geq 0,01$	90-107
$\geq 0,001 \geq 0,00001$	80-110
$\geq 0,000001$	60-115
$\geq 0,0000001$	40-120

Fonte: Adaptado de BRITO *et al.*, 2003.

3.9.6. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. Pode ser calculado de três maneiras: método visual, relação sinal-ruído e através dos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Os mais utilizados são: o método relação sinal-ruído que é aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído na linha de base, no qual estabelece uma relação sinal-ruído de 3:1 ou 2:1 na comparação entre a medição dos sinais de amostras de baixas concentrações conhecidas e o branco (RIBANI *et al.*, 2004). O limite de quantificação (LQ) apresenta a mesma definição e mesmo critério do LD, utilizando a relação sinal-ruído de 10:1 para a sua determinação pelo método relação sinal-ruído. Baseando-se no método do parâmetro da curva analítica LD e LQ podem ser calculados pelas equações 3.9 e 3.10, respectivamente.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq.3.9})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq.3.10})$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica;

S = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

3.9.7. Robustez

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta com pequenas variações de alguns parâmetros tais como, vazão da FM, composição da FM, temperatura, concentração, etc. um método diz-se robusto revela-se praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Quanto maior for a

robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (INMETRO, 2010).

3.10. Análise Estatística

Nos últimos anos, as ferramentas quimiométricas têm sido frequentemente aplicadas para a otimização de métodos analíticos, considerando-se as suas vantagens, tais como uma redução no número de experimentos que necessita de ser executados, resultando em menor consumo de reagentes e consideravelmente menos trabalho de laboratório. Além disso, estes métodos permitem o desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem a avaliação da relevância, bem como a significância estatística dos efeitos do fator a serem estudados, bem como avaliar os efeitos de interação entre os fatores. Quanto maior for o efeito da interação maior a diferença de que será encontrada usando estratégias de otimização uni e multivariada (FERREIRA *et al.*, 2007).

3.10.1. Planejamento de Experimentos-Análise multivariada

Com o advento da quimiometria, o uso de experimentos estatisticamente planejados cresceu rapidamente em vários campos de pesquisa no Brasil, especialmente na Química, Engenharia Química, Engenharia de Alimentos e Biotecnologia (BARROS NETO *et al.*, 2006).

Em todas as áreas da Química, é essencial realizar a otimização do processo em geral, principalmente quando estes são inéditos ou precisam ser adaptados à realidade de um laboratório. A etapa de otimização pode ser considerada uma das mais cruciais de uma metodologia, pois garantem resultados melhores e confiáveis. Pode ser univariada, quando cada parâmetro (fator ou variável) do sistema é investigado separadamente enquanto os outros fatores são mantidos constantes, porém, esse processo pode falhar pelo fato do número de experimentos ser muito grande. Por outro lado, a otimização chamada multivariada, que consiste na realização de experimentos com diferentes combinações de níveis para mais de uma variável (fator), tais combinações são organizadas de forma específicas que damos o nome de planejamentos experimentais (FERREIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

As principais vantagens do uso de planejamento de experimentos multivariados, é o número reduzido de experimentos, custo, tempo, conhecer o sistema de maneira abrangente, isto é, os fatores são analisados simultaneamente. Essa ferramenta estatística é essencial quando se tem pouca informação sobre o sistema a ser otimizado, sendo possível determinar, por meio de uma triagem, quais variáveis são realmente importantes, ou significativas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

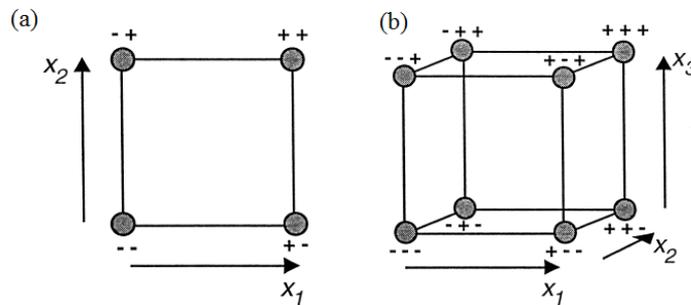
Em um planejamento fatorial a variável independente é denominada de níveis, codificados em baixo, central e alto (-, 0, +), enquanto que a variável dependente de fatores do sistema. O planejamento de experimentos mais simples que existe é o planejamento fatorial 2^2 , ou seja, dois fatores e dois níveis para cada fator, sendo necessário a realização de no mínimo quatro experimentos ($2^2=4$). A partir daí é possível aumentar o número de fatores e níveis em função da necessidade do sistema sob investigação (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A resposta de um dado experimento é descrita em função das variáveis independentes deste mesmo experimento representa por:

$$Y_i=f(x_i) \quad (\text{Eq.3.11})$$

Onde, Y_i é a variável resposta ou dependente de x_i a variável independente. A função $f(x)$ pode ser aproximada por uma função polinomial que representa a relação entre as variáveis experimentais e a resposta dentro de um domínio experimental limitado. Os domínios de dois fatores estão localizados nos vértices de um quadrado e três fatores nos vértices de um cubo, conforme ilustra a Figura 3.20.

Figura 3. 21: (a) Modelo de experimentos com duas variáveis; (b) Modelo de experimento de três variáveis.



Fonte: Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2007.

Para avaliar e quantificar o experimento, são utilizados modelos matemáticos polinomiais lineares com duas variáveis x_1 e x_2 , exemplo: modelo linear de primeira ordem é considerado um dos mais simples onde descreve a relação entre as variáveis experimentais e a resposta que é expressada como:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \text{residual} \quad (\text{Eq.3.12})$$

O modelo linear de segunda ordem contém adicionais que descrevem a interação entre diferentes variáveis, como pode ser expressada pela equação 3.13:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \text{residual} \quad (\text{Eq.13})$$

Para a determinação do ponto óptimo (máximo ou mínimo) do experimento, os termos quadráticos são inseridos no modelo matemático. Esse modelo quadrático deve permitir a determinação da relação não-linear entre as variáveis experimentais e respostas, conforme expressada pela equação 3.14:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \text{residual} \quad (\text{Eq. 3.14})$$

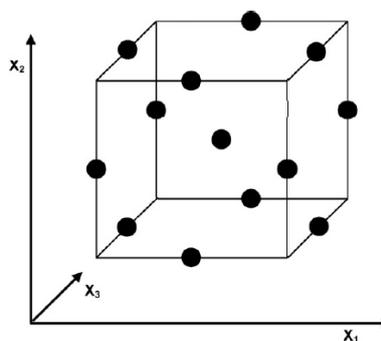
Em todas as funções polinomiais citadas, Y é a variável resposta, x as variáveis experimentais em estudo a um termo independente, β_0 , β_1 , β_2 , etc., são os coeficientes dos termos lineares, quadráticos e de interação respectivamente, a serem determinados, e o residual é a diferença entre o resultado calculado e o erro experimental.

Esses resultados experimentais obtidos pelas funções polinomiais podem ser visualizados pelos gráficos de superfície resposta que tem como objetivo de otimizar a variável resposta, isto é, informar quais são as melhores condições das variáveis escolhidas.

Os planejamentos experimentais, mais utilizados para a otimização de multivariadas são os fatoriais, completos ou fracionários, os planejamentos compostos centrais, Doehlert e Box-Behnken (FERREIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O modelo Box-Behnken é uma classe de modelos rotativos ou quase rotativos de segunda ordem baseado em três níveis fatoriais incompletos, conforme ilustrado a Figura 3.22.

Figura 3. 22- Modelo Box-Behnken



Fonte: FERREIRA *et al.*, 2007

O número de experimentos conforme mostra a figura 3.22 são de 12, sendo 3 réplicas no ponto central do cubo, totalizando assim 15 experimentos, que podem ser obtidos pela equação 3.15:

$$N = 2k \cdot (k-1) + C_0 \quad (\text{Eq.3.15})$$

Onde: N é o número de experimentos, k o número de fatores e C_0 número de pontos centrais.

3.11. Técnicas de caracterização

A formação de polímeros porosos com matrizes altamente reticuladas que constituem os MIPs são reconhecidamente difíceis de caracterizar, em grande parte devido à sua insolubilidade e ao fato de se apresentarem na forma sólida, não podendo ser caracterizados por métodos comuns, como a cromatografia em gel, as técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em solução e as determinações por ultravioleta (UV) efetuadas diretamente nos polímeros. Porém, existem alguns métodos que conseguem caracterizar estes polímeros, que incluem a espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido que caracteriza os aspectos moleculares dos MIPs e a determinação da superfície específica, porosidade e grau de intumescimento os aspectos macroscópicos (BARBOSA; SOUSA, 2009; CORMACK; ELORZA, 2004; SPIVAK, 2005).

Com o objetivo de conhecer os aspectos químicos, morfológicos e porosidade dos MIPs, foram utilizados as seguintes técnicas e métodos analíticos: espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, análise térmica (termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial), análise de tamanho dos poros e área superficial e porosidade.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais, reagentes, padrões, solventes e equipamentos

- Padrão - O padrão de bisfenol A com pureza $\geq 99\%$ foi obtido da Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil.
- Solventes - Acetonitrila de grau HPLC/UV foi obtida da Dinâmica Química Contemporânea Ltda., metanol grau HPLC/UV foi obtido da Vetec Química Fina, Alemanha, tolueno P.A foi obtido do Proquímios e água ultrapura do purificador Millipore da *Direct-Q® 3 with Pump*.
- Cartuchos para EFS- Seringas descartáveis fabricadas pelo Sello da marca IRAM.
- Reagentes - Ácido metacrílico com pureza 99% contendo 250 mg L⁻¹ de MEHQ como inibidor, etilenoglicol dimetacrilato com pureza 98% contendo 90-110 mg L⁻¹ monometílico de hidroquinona como inibidor de éter, 4,4'-azo (4- ácido ciano valérico) com pureza $\geq 98\%$ foram obtidos da Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil, ácido acético glacial P.A foi obtido da Alphatec, clorofórmio da Proquímios, Rio de Janeiro e fenol da Proquímios, Rio de Janeiro.
- Materiais - Papel de filtro Quantitativo JP41-Faixa preta e filtro para seringa da marca Millex® *Syringe-driven Filter Unit* com porosidade de 0,45 μm , diâmetro de 13 mm, tipo de membrana PTFE. Membrana filtrante de Nylon adquirido da Agilent Technologies com porosidade de 0,45 μm ; seringa de vidro 20,00 mL da fabricante Art Glass; pipetas automáticas volumétricas da marca *LabMate Soft*; termômetro; erlemeyers; béqueres; pipeta de Pasteur; balões volumétricos e dentre outras vidrarias que foram necessárias durante os experimentos.
- Equipamentos - Banho ultrassônico, modelo Digital soniClean 2; chapa aquecedora NOVA; banho-maria (Béquer) acoplado com termômetro; estufa a vácuo NOVUS da Biopar Equipamentos Eletroeletrônicos Ltda.; moinho de bolas Planetary, modelo ball mill NQM-0.4 (Yangzhou Nuoya Co. Ltda., Japão) bomba de vácuo; Extrator Soxhlet equipado com um balão de fundo redondo de 250,00 mL, condensador de refluxo, garras, suportes universais, mangueiras e uma manta aquecedora da NOVA; Extrator em fase sólida modelo Supelco (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil); balança analítica de precisão da *Marte®* e sistema de purificação de água MILLI-Q. Um Cromatógrafo Líquido de Alta de Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), modelo 1200 Infinity Series (Agilent Technologies, São Paulo, Brasil) e uma coluna ZORBAX-SB-C8, Rapid Resolution HT (3,0x150mm, 1,8 micrômetro); Espectrofotômetro de Absorção Molecular da região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), modelo Spectrum 100 (Perkin Elmer, EUA); Termogravimetria: DTA Netzsch modelo STA449F3 e DCS:

TA, modelo DSC 220 com refrigerador; Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo Evoma 15 (ZEISS); analisador de partículas modelo Bluewave (MicrotracTurbotrac Ind.) e um Analisador de Área Superficial modelo NOVA 1200e (QUANTACHROME INSTRUMENTS).

4.2. Preparo de soluções

Foi preparada uma solução padrão estoque de BFA e fenol na concentração de 1000 mg L⁻¹. Pesou-se 100,00 mg de BFA em uma balança analítica de precisão. Esta massa pesada foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100,00 mL e avolumado com mistura de acetonitrila/água (60:40, v/v), acondicionou-se em frasco de vidro e armazenou-se sob refrigeração. Para o preparo da solução padrão estoque de fenol uma alíquota de 94,34 µL foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100, 00 mL e avolumado com mistura de acetonitrila/água (60:40, v/v), acondicionou-se em frasco de vidro e armazenou-se sob refrigeração.

Já a solução padrão de trabalho de BFA e fenol foram preparadas através da diluição da solução padrão estoque, transferindo-se quantitativamente 1,00 mL da solução estoque para um balão volumétrico de 100,00 mL e avolumando com mistura de acetonitrila/água (60:40, v/v), acondicionada em frasco vidro e armazenada sob refrigeração.

Também foi preparada uma solução de bisfenol A e fenol para água ultrapura fortificado para uso na extração em fase sólida. Através da diluição da solução padrão de trabalho, transferiu-se quantitativamente 0,375 mL desta solução padrão de trabalho para um balão volumétrico de 25,00 mL e avolumou-se com água ultrapura para uso imediato.

4.3. Validação do Método

A validação da metodologia analítica para a determinação de bisfenol A por cromatografia líquida foi baseada nos trabalhos de AMARANTE JUNIOR *et al.* (2001); RIBANI *et al.* (2004) e nas orientações do INMETRO (2010). Os parâmetros que foram avaliados, foram: seletividade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão/recuperação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Para cada um destes parâmetros foram realizados uma série de experimentos em um número estatisticamente significativos e posteriormente os tratamentos dos dados estatísticos obtidos foram tratados com auxílio do *software* Origin Pro 8 e Excel.

4.3.1. Seletividade

Para avaliar e comprovar a seletividade da separação cromatográfica do analito de interesse, foi preparada uma solução padrão trabalho de 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BFA em mistura de acetonitrila e água (60:40, v/v).

4.3.2. Linearidade

A linearidade pode ser verificada pelo coeficiente de correlação (r^2), resultante da equação da regressão linear obtida dos quatorze pontos da curva analítica do BFA com detecção pelo DAD (220, 228 e 280 nm) e pelo FLD ($\lambda_{\text{excitação}}=275$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=300$ nm), respectivamente. Foram preparadas quatorze soluções em diferentes concentrações de BFA, a partir da diluição da solução padrão de trabalho em mistura de acetonitrila e água (60:40, v/v). As soluções nas concentrações de 5; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram injetadas no CLAE em triplicata ($n=3$). A construção da curva analítica para o fenol com detecção por FLD ($\lambda_{\text{excitação}}=275$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=300$ nm), utilizado para o estudo da seletividade do MIP e NIP, foi realizada com seis pontos nas concentrações de 100; 200; 400; 600; 800 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, preparadas a partir da solução padrão trabalho de fenol 10 mg L^{-1} em mistura de acetonitrila e água (60:40, v/v).

4.3.3. Sensibilidade

A sensibilidade do método analítico em questão foi avaliada através do coeficiente angular das curvas analíticas obtidas pela equação de regressão linear do BFA em cada comprimento de onda pelo DAD (220, 228 e 280 nm) e pelo FLD ($\lambda_{\text{excitação}}=275$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=300$ nm).

4.3.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados pela relação sinal/ruído (S/N), considerando que uma relação sinal/ruído de 3:1 (LD) e 10:1 (LQ). O LD e LQ também podem ser determinados nos parâmetros da curva analítica de acordo com a equação 3.9 e 3.10 (RIBANI *et al.*, 2004) mostrada na seção 3.9.6. Então, para determinar os limites da razão S/N, o sinal e o ruído do analito de interesse obtido foram medidos com o auxílio de uma régua (RIBANI *et al.*, 2004).

4.3.5. Precisão

A precisão do método foi determinada pela preparação de dez soluções de BFA a partir da solução padrão de trabalho 10 mg L^{-1} na concentração $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em mistura de acetonitrila e água (60:40, v/v). As dez soluções foram preparadas por dois analistas. No primeiro dia, o analista 1 preparou dez soluções de BFA e injetou no sistema de CLAE. E no dia seguinte, o analista 2 preparou outras dez soluções e injetou no sistema de CLAE. Todas essas soluções preparadas pelos dois analistas foram injetadas no CLAE em triplicata ($n=3$).

Os resultados encontrados foram expressos em porcentagens e avaliados pelo teste F e pelo teste t. Os valores de F e t calculados, foram comparados com F e t tabelados em um intervalo de confiança de 95%.

4.3.6. Exatidão

Como não havia disponibilidade de Material de Referência Certificado (CRM) de água contaminada com BFA em estudos, foram preparadas em triplicatas três soluções de BFA para água ultrapura fortificado a partir da solução padrão de trabalho de 10 mg L^{-1} em concentrações alta, média e baixa sendo: $700 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A exatidão do método foi avaliada pela eficiência de extração do analito (E) em triplicata, em cada nível de concentração e os resultados foram expressos em porcentagem. Para o cálculo da concentração experimental, foi utilizada a equação da curva de calibração e a partir desse valor foi determinado a recuperação em porcentagem de cada analito.

4.3.7. Robustez

A robustez do método analítico em questão foi determinada utilizando-se soluções de concentração $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, variando em $\pm 5\%$ quatro condições cromatográficas: Volume de injeção da amostra no CLAE, temperatura do compartimento da coluna, composição da fase móvel (FM) e vazão da fase móvel. Os resultados obtidos foram comparados com as condições originais do método analítico.

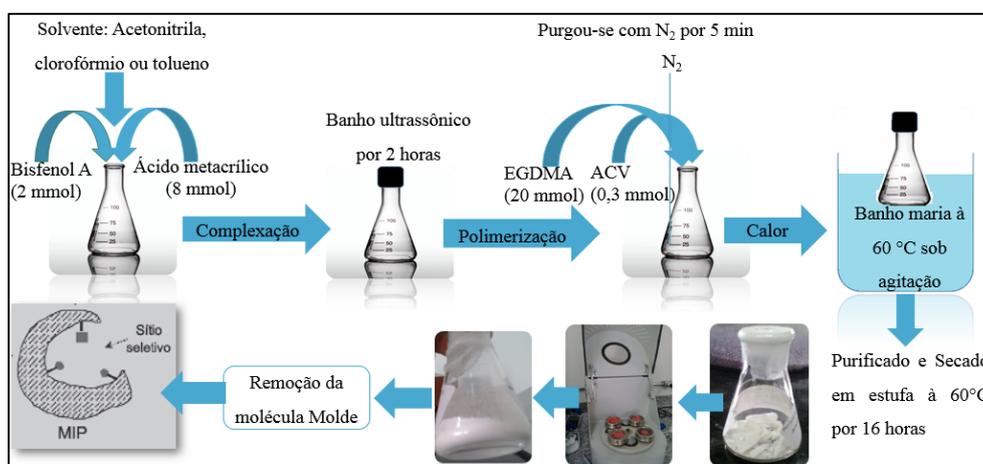
4.4. Síntese do MIP e NIP

O processo de síntese do polímero impresso e não impresso foi via polimerização em “bulk” em um sistema homogêneo e fechado, a interação entre a molécula molde e o monômero funcional

foram por ligação não covalente (ligação de hidrogênio). A síntese foi adaptada nos trabalhos de CORMACK; ELORZA, 2004 e FIGUEIREDO; SANTOS, 2012.

Para preparação do polímero de impressão molecular (MIP), adicionou-se em uma ampola de síntese o BFA (2 mmol) como molécula molde, o ácido metacrílico (8 mmol) (MAA) como monômero funcional em 12,00 mL de solvente porogênico (acetonitrila, clorofórmio ou tolueno) e deixou-se em um banho ultrassônico por 2 horas para interação molde-monômero. Em seguida, adicionou-se o etileno glicol dimetacrilato (20 mmol) (EGDMA) como agente ligação cruzada e o ácido 4,4'-azo-(ácido-4-cianovalérico) (ACV) como iniciador radicalar. Para ocorrência da reação de polimerização o meio reacional deve estar isento de oxigênio. Então, para remoção do oxigênio, o gás nitrogênio foi borbulhado à solução por aproximadamente 5 minutos, em seguida, a ampola de síntese foi então lacrada com filme de PVC e mantida em um banho-maria à 60°C durante o tempo de 3, 4 ou 5 horas sob agitação de 300, 400 ou 500 rpm para a ocorrência da reação de polimerização. A síntese do NIP, um polímero não impresso, seguiu o mesmo protocolo do MIP, mas na ausência da molécula molde. Os polímeros resultantes de estrutura rígida foram purificados com 50,00 mL de mistura de metanol e ácido acético (9:1, v/v) seguido de mais 50,00 mL de solvente acetonitrila para remoção de resíduo de ácido acético e dos resíduos dos materiais poliméricos. Após, secou-se os polímeros em uma estufa a vácuo à 60°C durante 16 horas, em seguida, pesou-se esse material polimérico, moeu-se em um moinho de bolas analítico para diminuição do tamanho das partículas, removeu-se a molécula molde do material sintetizado para análises posteriores e aplicação como adsorvente na extração em fase sólida. A Figura 4.1 ilustra o esquema genérico da síntese do MIP e NIP.

Figura 4. 1-Esquema genérico da síntese do MIP



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5. Validação da síntese do MIP

Para a validação do processo de síntese do MIP foi montado um planejamento de experimentos de triagem estatística Box-Behnken utilizando o *Minitab 15*®, com três níveis e três fatores a serem alterados, tais como: tempo da reação de polimerização; tipo de solvente e agitação magnética (FERREIRA *et al.* 2007).

Por meio do tratamento estatístico dos dados obtidos no planejamento Box-Behnken foi possível construir uma tabela de análise de variância (ANOVA) onde relacionam-se diversos parâmetros. Os parâmetros verificados foram: Soma quadrática da regressão (SQR), soma quadrática dos resíduos (SQ_{res}), soma quadrática total (SQT), soma quadrática do erro puro (SQ_{ep}) e soma quadrática da falta de ajuste (SQ_{faj}).

A Tabela 4.1 mostra de forma resumida todas as características da SQ descrita anteriormente (PEREIRA FILHO, 2015).

Tabela 4. 1- Descrição sucinta das SQ da tabela ANOVA

Parâmetro	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)
Regressão, SQR	$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1
Resíduo, SQ _{res}	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	n-p
Total, SQT	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	n-1
Erro puro, SQ _{rep}	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n _i -m
Falta de ajuste, SQ _{faj}	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p

P=número de coeficientes; n=número de experimentos; m=número de experimentos independentes; (\hat{y}_i)=resposta prevista; (\bar{y})=médias das respostas experimentais.

Fonte: Adaptado de PEREIRA FILHO, 2015.

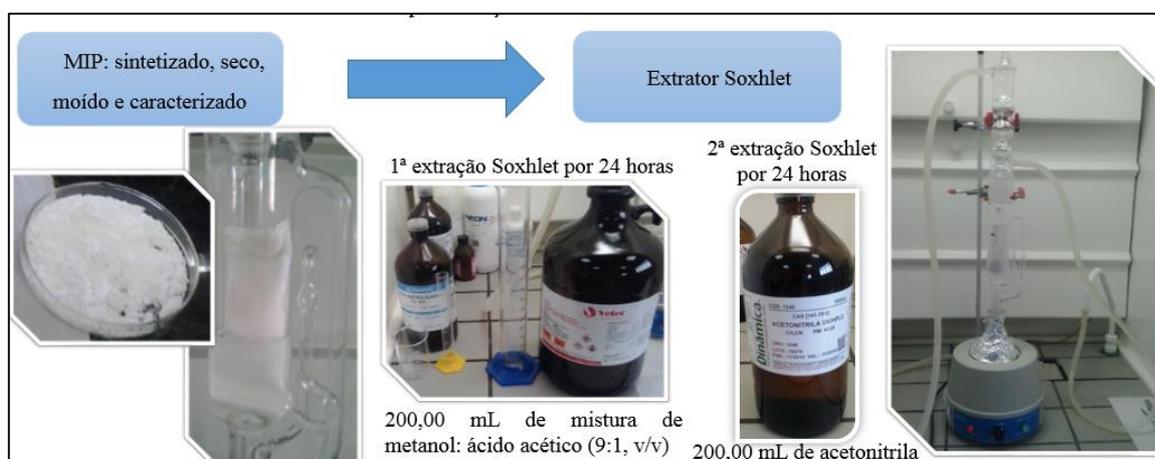
Após realizar todos os experimentos do planejamento Box-Behnken foram selecionadas as melhores condições de síntese do MIP. Essa avaliação foi feita a partir dos valores de remoção de BFA obtidos em cada experimento. Pela melhor condição de síntese do MIP também foi realizada a síntese do NIP.

4.6. Remoção da molécula molde (*template*) do MIP

Após a síntese procedeu-se a remoção da molécula molde do MIP. Para remoção da molécula molde foi utilizado o método por extração Soxhlet.

A remoção da molécula molde do MIP por extração Soxhlet se deu da seguinte forma: o polímero (MIP) foi colocado em um papel de filtro Quantitativo JP41-Faixa preta, sendo o papel fechado em forma de cartucho e transferido para o Soxhlet. Conectou-se ao Soxhlet, um balão de fundo redondo contendo inicialmente 200,00 mL da mistura de metanol e ácido acético (90:10, v/v) deixou-se por 24 horas em ciclos entre 24 a 30 minutos. Após, retirou-se essa mistura de metanol e ácido acético e colocou-se 200,00 mL de acetonitrila e deixou-se mais 24 horas em ciclos de 24 a 30 minutos para a remoção da molécula molde do MIP. Em seguida, deixou-se secar na estufa a vácuo à 60°C por 6 horas. Para averiguação da remoção da molécula molde do MIP, foi realizado o empacotamento deste adsorvente em um cartucho para extração em fase sólida em triplicata (n=3) passando somente água ultrapura na etapa de introdução da amostra com será explicado na próxima seção 4.7. A Figura 4.2 mostra um esquema genérico do processo de remoção da molécula-molde.

Figura 4. 2- Esquema genérico da remoção da molécula molde por extração Soxhlet



Fonte: Arquivo pessoal.

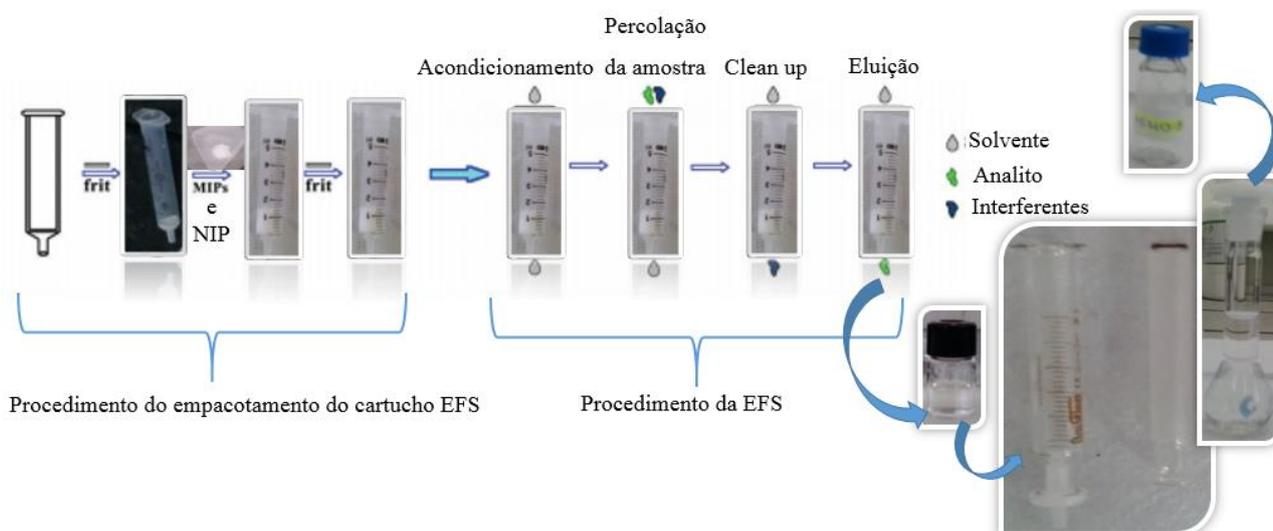
4.7. Empacotamento do MIP e NIP no cartucho de EFS

Para a verificação da capacidade de adsorção e seletividade tanto do MIP quanto do NIP, estes foram empacotados em cartuchos para extração em fase sólida. Utilizou-se seringa de farmácia descartável com volume de 3,00 mL.

Primeiramente, empacotou-se 150 mg de adsorvente MIP ou NIP devidamente pesados em uma balança analítica de precisão em cartuchos para extração em fase sólida (seringa de farmácia

descartável) em triplicata ($n=3$). Os cartuchos foram acondicionados com 3 mL de acetonitrila, 3 mL de metanol e 3 mL de água em uma vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. A amostra de BFA para água ultrapura fortificado foi percolada a uma vazão constante de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ em *Manifold* a vácuo. Os cartuchos foram lavados com 3 mL de água ultrapura obtida do sistema de purificação MILLI-Q para remoção de possíveis interferentes e/ou impurezas na etapa de *clean-up*. Finalmente, o BFA foi eluído com 3 mL de acetonitrila. O eluato foi filtrado em uma seringa de vidro utilizando filtro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade, transferido para um balão volumétrico de 5,00 mL e avolumado com acetonitrila. Alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ foi injetada no sistema CLAE com detector por fluorescência em triplicata ($n=3$) para posterior análise cromatográfica. A Figura 4.3 ilustra todo o processo realizado desde o empacotamento do cartucho até alíquota retirada para análise cromatográfica. O mesmo processo foi feito para o NIP. Também foi realizado o empacotamento do cartucho de EFS do MIP em triplicata ($n=3$) para verificação da remoção da molécula molde utilizando no lugar da solução de BFA somente água ultrapura.

Figura 4. 3- Esquema genérico do processo de EFS dos polímeros sintetizados



Fonte: Arquivo pessoal.

4.8. Avaliação do efeito de impressão no MIP e NIP

Para avaliar e quantificar o efeito de impressão ou seletividade no MIP e NIP foi realizado o mesmo procedimento na seção 4.7, mas na etapa de percolação da amostra foi utilizado solução de fenol em água ultrapura fortificada ($150 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$). Uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ da solução extraída foi injetada no sistema CLAE com detector por fluorescência em triplicata ($n=3$) para posterior análise cromatográfica.

A partir dos dados obtidos pelo sistema CLAE-FLD, foram determinados os parâmetros relacionados ao desempenho da seletividade dos adsorventes MIP e NIP, tais como a capacidade de adsorção (q), recuperação (R), o coeficiente de distribuição (k_d), o coeficiente de seletividade (k) e o coeficiente de seletividade relativa (k').

O primeiro parâmetro determinado foi a capacidade de adsorção (q) e recuperação (R) calculados conforme mostras as seguintes equações (REN *et al.*, 2014):

$$q = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

$$R(\%) = \frac{C_f}{C_i} \times 100\% \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde q ($\mu\text{g g}^{-1}$) é a capacidade de adsorção e R é a recuperação do adsorvente, C_i e C_f ($\mu\text{g L}^{-1}$) são as concentrações iniciais e finais dos adsorvatos, respectivamente, V (L) é o volume da solução, m (g) é a quantidade de amostra de adsorvente MIP e NIP no cartucho de extração em fase sólida.

O coeficiente de distribuição (k_d) é definido como a razão da concentração do adsorvato de uma fase sólida para a solução no equilíbrio, e foi calculado conforme a equação 4.3 (REN *et al.*, 2014).

$$k_d = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] \times \frac{V \text{ (mL)}}{m \text{MIP (g)}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Onde, C_i , C_f e V representam a concentração inicial, final e o volume da solução eluída, respectivamente.

O coeficiente de seletividade (k) do MIP para a adsorção de BFA em relação a outros compostos que no caso foi o fenol pode ser obtido a partir da equação 4.4.

$$k = \frac{k_d(\text{BFA})}{k_d(\text{fenol})} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Onde K representa a seletividade do MIP, $k_d(\text{BFA})$ e $k_d(\text{fenol})$ são os coeficientes de distribuição do MIP para BFA e fenol, respectivamente.

Para fazer a comparação dos valores da seletividade (k) entre MIP e NIP com respectivas espécies competidoras (fenol, é obtido o coeficiente de seletividade relativa (k'), conforme a equação 4.5.

$$k' = \frac{k_{\text{MIP}}}{k_{\text{NIP}}} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

4.9. Validação das condições cromatográficas

A análise cromatográfica para quantificação e validação do método foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), modelo 1200 Infinity Series (Agilent Technologies, São Paulo, Brasil) equipado com uma bomba quaternária, um injetor de amostra, um compartimento de aquecimento de coluna, um detector de ultravioleta e de fluorescência. A coluna utilizada foi uma ZORBAX-SB-C8, Rapid Resolution HIT para partículas, também da Agilent Technologies. As condições cromatográficas que foram utilizadas para validação do método analítico, mostrada na Tabela 4.2, foram baseadas nos trabalhos de ARISTIAWAN *et al.* 2015 e BALLESTEROS-GÓMEZ *et al.* 2009.

Tabela 4. 2- condições cromatográficas para determinação de bisfenol A

Composição da fase móvel (FM)	Acetonitrila/ Água (60:40, v/v); modo isocrático
Vazão da fase móvel (FM)	0,200 mL min ⁻¹
Tipo de coluna	ZORBAX- SB-C8, Rapid Resolution HIIT
Temperatura da coluna	45 °C
Comprimentos de onda do detector por Arranjo de Diodos (DAD)	$\lambda_1= 220$ nm; $\lambda_2=228$ nm e $\lambda_3=280$ nm
Comprimento de onda do detector por Fluorescência (FLD)	$\lambda_{\text{excitação}} = 275$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}= 300$ nm

Fonte: Arquivo pessoal.

4.10. Técnicas de caracterização

No presente estudo, os polímeros MIP's e NIP's foram caracterizados de acordo com as seguintes técnicas:

- Caracterização química do polímero por meio da espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Caracterização morfológica do polímero por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Caracterização do tamanho das partículas do MIP e NIP por meio do analisador de partículas;
- Caracterização térmica utilizando-se a análise termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Caracterização da área de superfície, de volume dos poros e a distribuição de meso e microporos na superfície do polímero por meio do analisador de área superficial B.E.T.

4.10.1. Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção molecular na região do infravermelho para as amostras, na faixa de 4000 a 450 cm^{-1} , foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR (PERKIN ELMER, modelo Spectrum 100), utilizando pastilha de KBr com 16 varreduras e 16 de resolução.

4.10.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos MIP e NIP, foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As microscopias obtidas para os materiais foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, modelo EVO|MA15) na voltagem de 15kV e uma distância de trabalho de 6 a 8,2 mm. As imagens foram obtidas pelo próprio MEV. Antes de serem analisadas no MEV as amostras passaram por um recobrimento (metalização), pois os polímeros em estudo são materiais não condutores.

4.10.3. Análise térmica

4.10.3.1. Análise termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas tanto do MIP quanto do NIP foram realizadas no equipamento DTA Netzsch modelo STA449F3 no Laboratório de Caracterização Estrutural, localizado no Instituto de Engenharia Mecânica, IEM-UNIFEI. Utilizaram-se aproximadamente 5 mg de MIP e NIP, colocados em cadinho de alumina. O aquecimento foi realizado desde a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) até 1000°C , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera inerte de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} .

4.10.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A DSC tanto do MIP quanto do NIP foi realizada no equipamento da TA, modelo DSC 220 no Laboratório de Caracterização Estrutural, localizado no Instituto de Engenharia Mecânica, IEM-UNIFEI. Utilizaram-se aproximadamente 5 mg de MIP e NIP, colocados em cadinho de alumina. O aquecimento foi realizado desde a temperatura ambiente até 300°C , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera inerte de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} .

4.10.4. Analisador de tamanho de partículas

O tamanho das partículas de MIP (antes da remoção da molécula e após remoção da molécula molde) e NIP, foram obtidos pelo analisador de partículas da MicrotracTurbotrac Ind., modelo Bluewave, localizado no Laboratório de Caracterização Estrutural do Instituto de Engenharia Mecânica, IEM-UNIFEI. O princípio fundamental do equipamento consiste em determinar o tamanho de partículas por difração a laser.

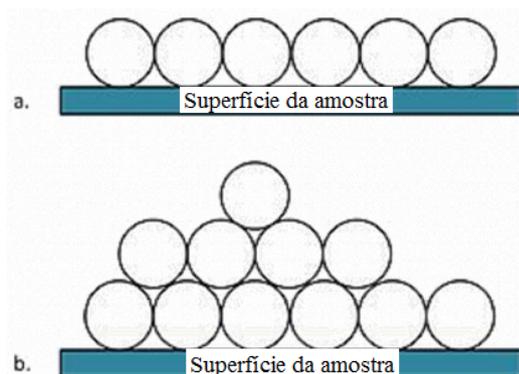
4.10.5. Área superficial e porosidade

A área específica superficial e a distribuição de tamanhos dos poros dos MIPs e NIP, foram obtidas no analisador da área superficial e porosidade da QUANTACHROME INSTRUMENTS, modelo NOVA 1200e, no Laboratório de Caracterização Estrutural, localizado no Instituto de Engenharia Mecânica, IEM-UNIFEI. O princípio fundamental do equipamento consiste na adsorção de gás nitrogênio sobre a superfície das amostras sólidas de MIPs e NIP. As isotermas de adsorção-desorção de N₂ foram medidas usando N₂ líquido a 77K e analisadas através do método padrão de *Brunauer-Emmett-Teller* (B.E.T) e pelos métodos matemáticos de HK e SF conforme explicado na seção 4.10.5.1. Todas as amostras de polímeros foram degaseificadas à 100°C por 8 horas.

4.10.5.1. Modelo Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T)

Brunauer, Emmett e Teller propuseram um modelo de adsorção baseado no mesmo mecanismo de adsorção utilizado na Teoria de Langmuir sobre condensação-evaporação e introduziram algumas hipóteses de que uma camada tem a capacidade de produzir sítios de adsorção sobre uma segunda camada denominada como multicamada, conforme ilustrado na Figura 4.4, a adsorção em uma única camada proposta por Langmuir e adsorção em multicamadas por B.E.T (SAAVEDRA, 2017).

Figura 4. 4- (a) Demonstração de adsorção em uma única camada (Teoria de Langmuir) e (b) modelo de multicamadas por B.E.T



Fonte: Adaptado de SCHONS.

As principais hipóteses desse método são: (a) a força de Van der Waals ou Eletrostáticas são as únicas responsáveis pela adsorção (física ou química); (b) homogeneidade na superfície do sólido, isto é, de modo que a primeira camada adsorvida participe como uma série de sítios de adsorção para a segunda camada, esta segunda camada para a terceira camada e assim sucessivamente até adquirem uma adsorção por multicamadas; (c) esse método não se aplica a pressões relativas (P/P_0) inferiores a 0,05 devido à presença de heterogeneidade na superfície sólida e nem a pressões relativas maiores que 0,35 devido a condensação capilar (SAAVEDRA, 2017).

A equação 4.6 representa matematicamente a teoria do B.E.T:

$$V_A = \frac{V_m C_t P}{(P_0 - P) [1 + (C_t + 1) \frac{P_0}{P}]} \quad (\text{Eq.4.6})$$

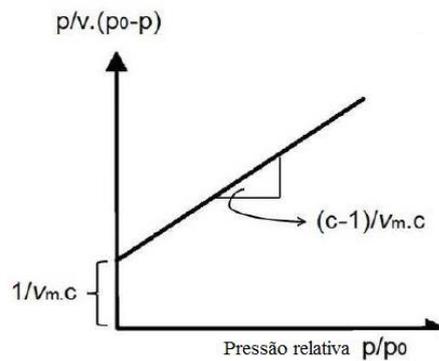
Onde: P é a pressão, C_t a constante relacionada com o tamanho dos poros que indica a medida direta da diferença entre o calor de interação na primeira camada e da condensação do adsorvato, P_0 é a pressão de saturação do gás, V_A (mL g^{-1}) é a quantidade de gás adsorvido à pressão P e V_m é a capacidade de adsorção na monocamada (GRITTI; GUIOCHON, 2003).

A partir, do modelo matemático, pode-se obter a forma linear da equação 4.6 expressa na equação 4.7:

$$\frac{P/P_0}{V_A(1 - P/P_0)} = \frac{1}{V_m C_t} + \frac{C_t - 1}{V_m C_t} \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (\text{Eq.4.7})$$

A representação gráfica dessa equação 4.7 mostrada na Figura 4.5 resulta em uma linha reta, obtendo-se os valores de V_m e C_t .

Figura 4. 5: Representação esquemática da curva linear do método B.E.T



Fonte: Adaptado de SHONS.

4.10.5.2. Método matemático HK e SF

Os métodos HK e SF são utilizados para calcular a distribuição de tamanho de poro em um determinado material.

O método HK é a relação matemática direta entre a pressão relativa (P/P_0) e o tamanho dos poros. É calculado a partir da equação de Young-Laplace modificada mostrada na equação 4.8. Esse método é baseado na geometria dos poros em forma de fenda (DIAS *et al.*, 2004).

$$P_C = \gamma_{LA} * \cos \theta_{SL} * \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) * \left(\frac{K}{d_m} \right) \quad (\text{Eq. 4.8})$$

Onde:

P_C = Pressão capilar;

γ_{LA} = Tensão superficial na interface do N_2 líquido;

$\cos \theta_{SL}$ = Ângulo de contato;

ε = Porosidade do sólido;

K = constante (microporos é aproximadamente 5);

D_m = diâmetro dos poros.

O método SF é similar ao modelo matemático HK, mas baseado na geometria cilíndrica dos poros. O cálculo tanto para o HK quanto para SF é restrito para região de microporos inferior a 5 nm.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

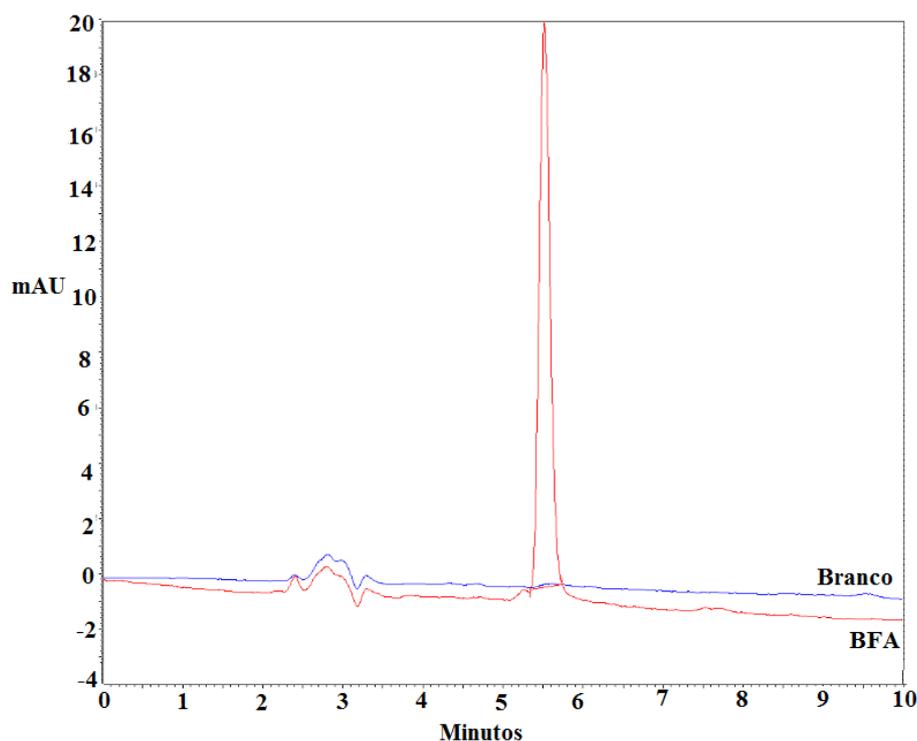
5.1. Validação da metodologia analítica para determinação de bisfenol A por cromatografia

5.1.1. Seletividade

Nas figuras 5.1 a 5.4 estão representados os cromatogramas da separação do bisfenol A (BFA) $800 \mu\text{g L}^{-1}$, por ultravioleta (DAD) em 220, 228 e 280 nm e por fluorescência em $\lambda_{\text{excitação}} = 275 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 300 \text{ nm}$, respectivamente. Como pode ser observado o BFA apresentou uma satisfatória separação cromatográfica, comprovando assim que o método proposto foi seletivo, usando o FLD. A Tabela 5.1 mostra os tempos de retenção do padrão de BFA detectado pelo DAD e FLD.

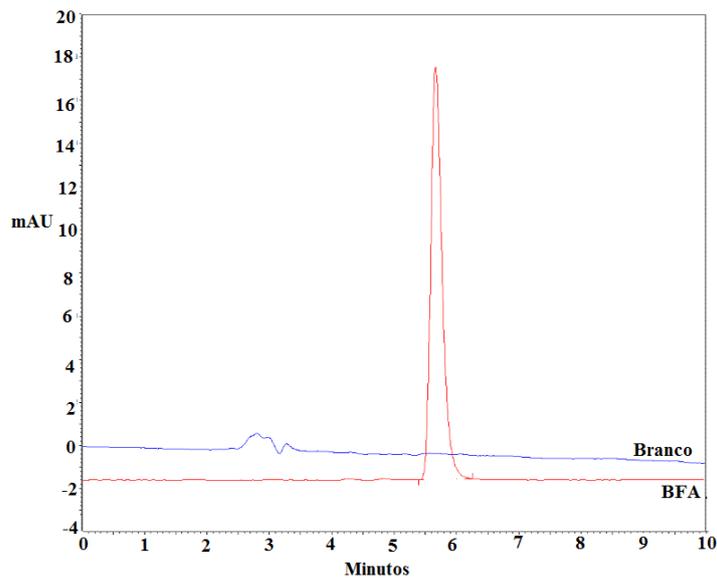
A seletividade também pode ser confirmada pelo cromatograma do “branco” (ausência de analito) com detecção pelo DAD e FLD, respectivamente. Nesses cromatogramas, como pode ser observado nas Figuras 5.1 a 5.4, não há nenhum pico observado no tempo de retenção do analito de interesse. Somente apareceu um pico antes do tempo de retenção que pode ser alguma impureza ou até mesmo solvente da fase móvel.

Figura 5. 1- Cromatograma referente à separação do padrão BFA $800 \mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo DAD 220 nm



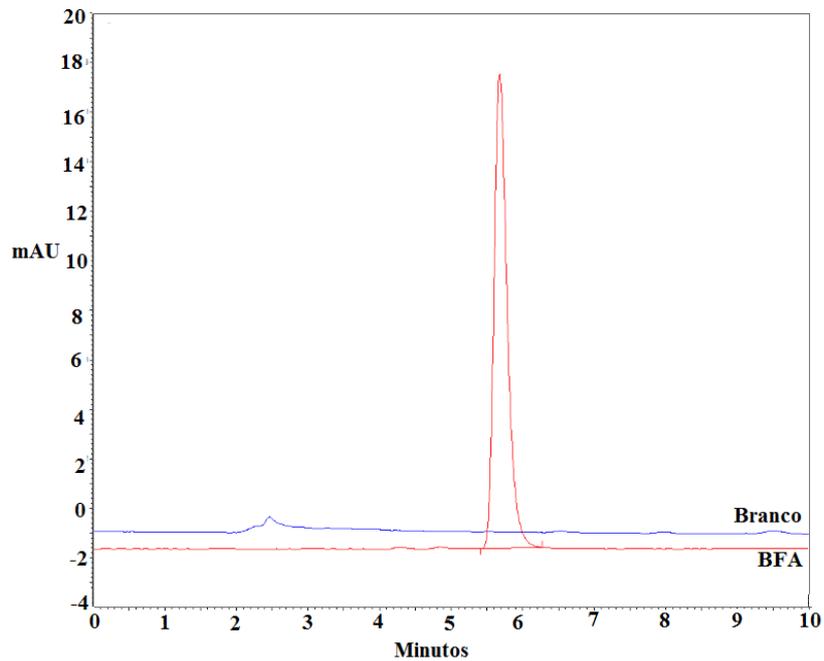
Fonte: arquivo pessoal.

Figura 5. 2- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo DAD 228 nm



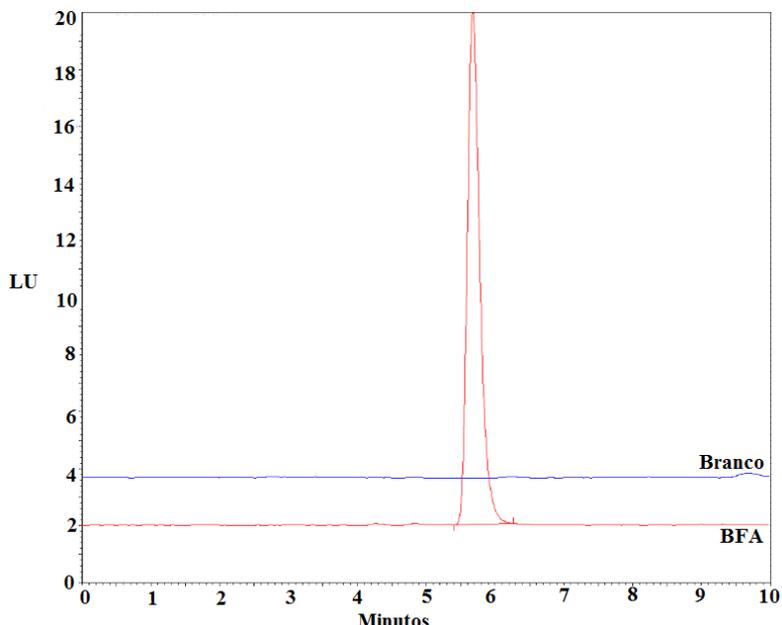
Fonte: arquivo pessoal.

Figura 5. 3- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sobreposto com o branco detectado pelo DAD 280 nm



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 5. 4- Cromatograma referente à separação do padrão BFA 800 µg L⁻¹ sobreposto com o branco detectado pelo FLD



Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 5. 1- Tempos de retenção do hormônio BFA com detecção pelo DAD e pelo FLD

Hormônio	BFA
Tempo de retenção (minutos) com detecção pelo DAD 220 nm	5,502 (±0,004)
Tempo de retenção (minutos) com detecção pelo DAD 228 nm	5,502 (±0,004)
Tempo de retenção (minutos) com detecção pelo DAD 280 nm	5,505 (±0,004)
Tempo de retenção (minutos) com detecção pela FLD	5,668 (±0,004)

Fonte: Arquivo pessoal.

E conforme pode observar pela Tabela 5.1 o BFA detectado por DAD apresentou um tempo de retenção inferior ao do FLD, devido eles estarem em serie e o FLD fica após o DAD, isto é, a amostra demora mais tempo para chegar no FLD logo o tempo de retenção de 5,6.

5.1.2. Linearidade

O método analítico validado se mostrou linear para ambos os detectores (DAD e FLD) utilizados, pois os coeficientes de correlação (R^2) obtidos foram superiores a 0,99, conforme apresentado nas Tabelas 5.2 e 5.3. E de acordo com BRITO *et al.* (2003) os valores desses coeficientes de correlação são considerados como fortíssimas entre as variáveis área do pico cromatográfico e concentração do analito.

Tabela 5. 2- Equação da reta e coeficiente de correlação (R²) do BFA detectados por DAD

Bisfenol A	Equação da reta	Coefficiente de correlação (R ²)
220 nm	$y = 324,20327x + 6532,81181$	0,99974
228 nm	$y = 346,00989x + 3992,1291$	0,99979
280 nm	$y = 80,96106x + 443,08761$	0,99982

Fonte: Arquivo pessoal.

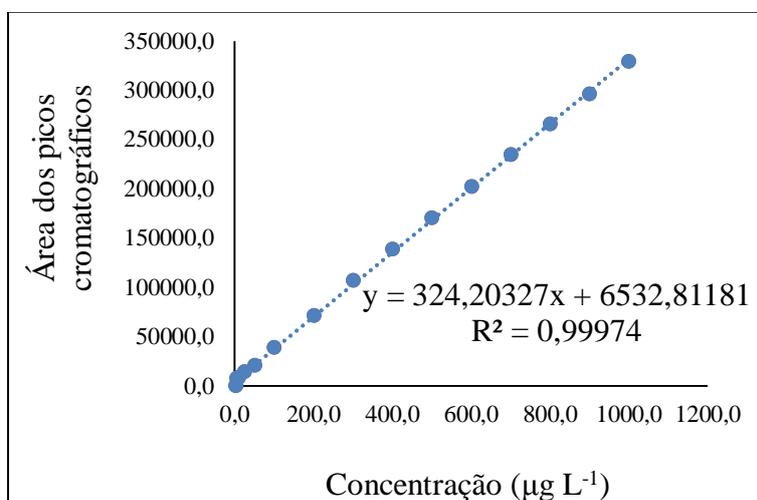
Tabela 5. 3- Equação da reta e coeficiente de correlação (R²) do BFA detectado por FLD

Bisfenol A	Equação da reta	Coefficiente de correlação (R ²)
275/300 nm	$y = 30070,02096x + 148179,79713$	0,99948

Fonte: Arquivo pessoal.

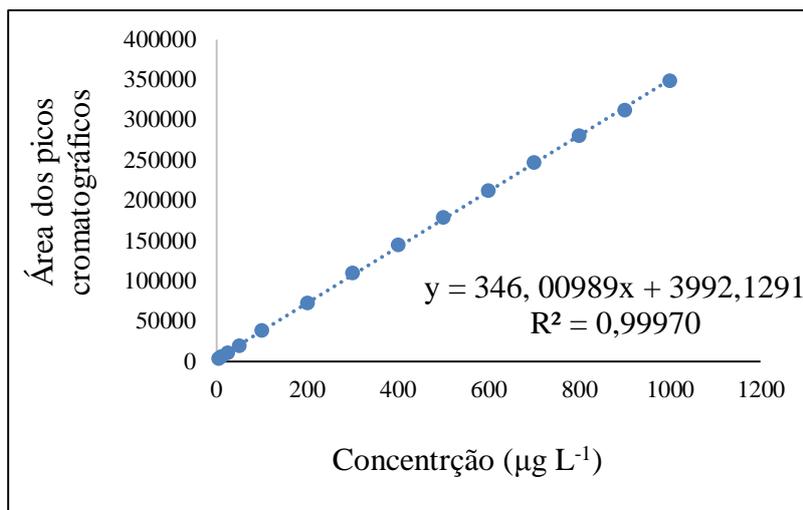
Pelas Figuras 5.5 a 5.8 pode-se observar que o BFA detectado pelo DAD nos comprimentos de onda de 220 e 228 nm e por FLD mostraram ser linear numa faixa de 5 a 1000 µg L⁻¹. Enquanto que, o BFA detectado pelo DAD no comprimento de onda de 280 nm se mostrou linear na faixa de 10 a 1000 µg L⁻¹.

Figura 5. 5- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo DAD a 220 nm



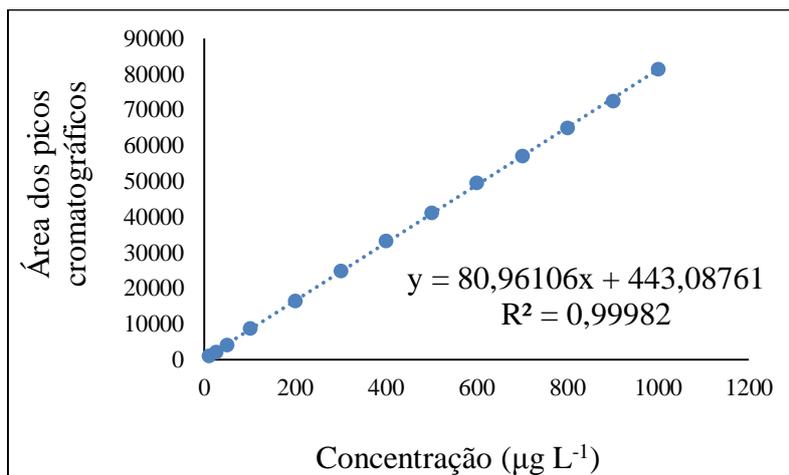
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 6- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo DAD a 228 nm



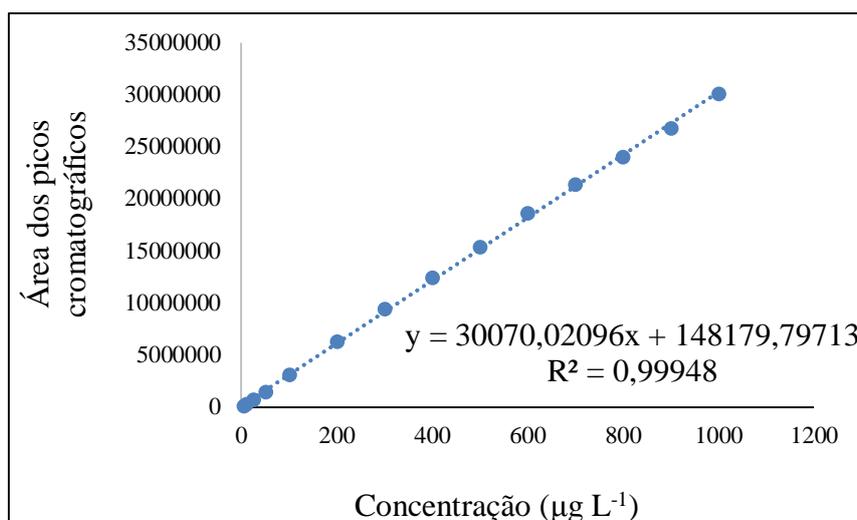
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 7- Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo DAD a 280 nm



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 8-Linearidade do BFA na faixa estudada, com detecção pelo FLD a 275/300 nm



Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.3. Sensibilidade

A sensibilidade do método foi determinada utilizando as equações das retas obtidas das curvas de calibração do BFA, sendo avaliado o coeficiente angular como mostra na Tabela 5.4.

Tabela 5. 4- Coeficiente de correlação referente as curvas de calibração do BFA

Bisfenol A	Deteção por DAD	Deteção por FLD
220 nm	324,20327	
228 nm	346,00989	
280 nm	80,96106	
275/300 nm		30070,02096

Fonte: Arquivo pessoal.

Logo, o método validado se mostrou mais sensível com o detector FLD, pois este apresentou maior coeficiente angular em relação ao detector ultravioleta (DAD).

5.1.4. Limite de Deteção e Limite de Quantificação

Para a determinação do LD e LQ foram utilizados os parâmetros da curva analítica de acordo com as Equações 3.9 e 3.10. Os resultados expressos em µg L⁻¹ estão na Tabela 5.5.

Tabela 5. 5- LD e LQ do BFA detectado no DAD e FLD

Detector	BFA-concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	LD	LQ
DAD (220 nm)	8,98	27,20
DAD (228 nm)	4,20	12,74
DAD (280 nm)	6,57	19,90
FLD (275/300 nm)	3,64	11,03

Fonte: Arquivo pessoal.

O LD e o LQ também podem ser determinados através da relação sinal/ruído (S/N), considerando uma relação de 3:1 para o LD e 10:1 para o LQ. As amostras foram diluídas em mil vezes (1 mL para 1 L). Os resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$ estão na Tabela 5.6.

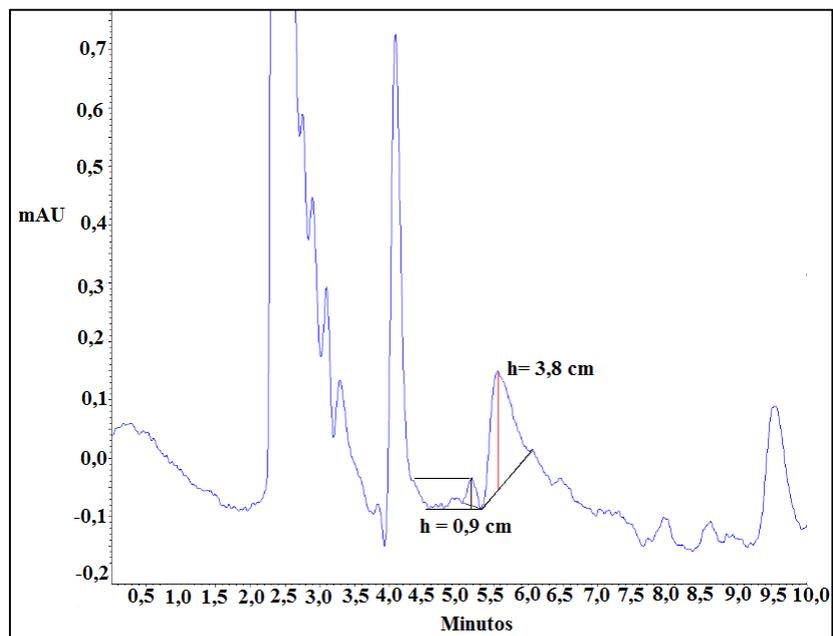
Tabela 5. 6- LD e LQ instrumental do BFA detectado no DAD e FLD

Detector	BFA- concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	LD	LQ
DAD (220 nm)	5,00	25,00
DAD (228 nm)	5,00	25,00
DAD (280 nm)	10,00	100,00
FLD (275/300 nm)	5,00	10,00

Fonte: Arquivo pessoal.

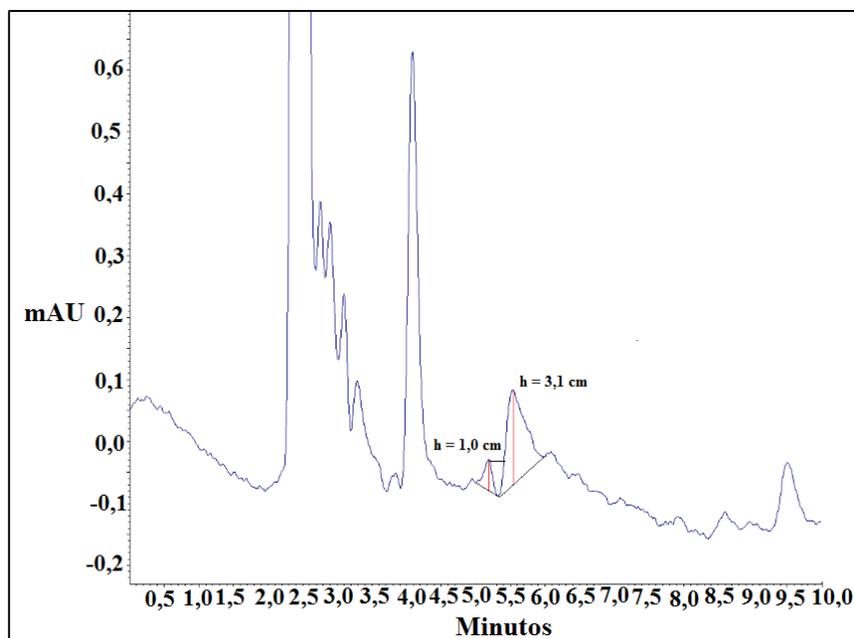
Os cromatogramas ilustrados nas Figuras 5.5 a 5.12 mostram como foi determinado o limite de detecção e quantificação pelo método sinal/ruído. A relação sinal/ruído foi obtida através da medição com uma régua, pois os valores do LD e LQ obtidos pelo *Software* do sistema CLAE utilizado neste estudo, apresentaram valores discrepantes.

Figura 5. 9- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 220 nm



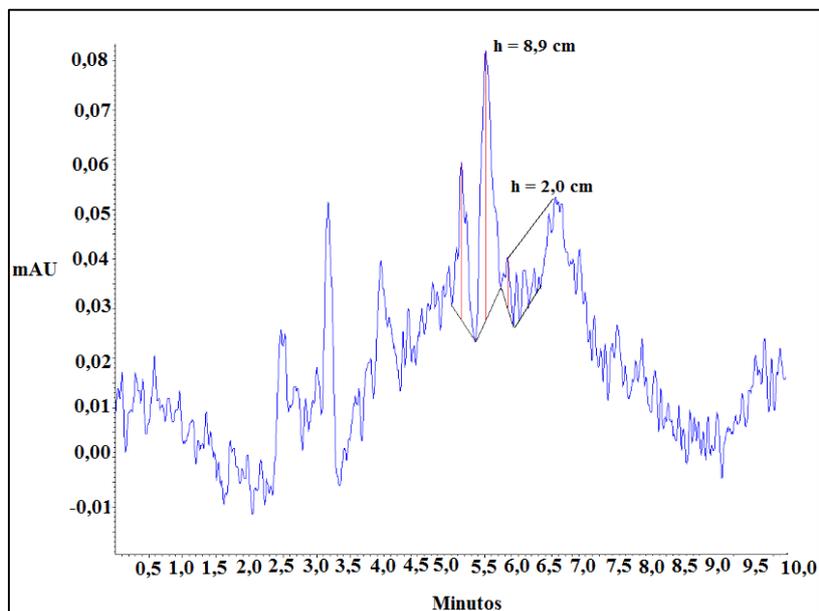
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 10- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 228 nm



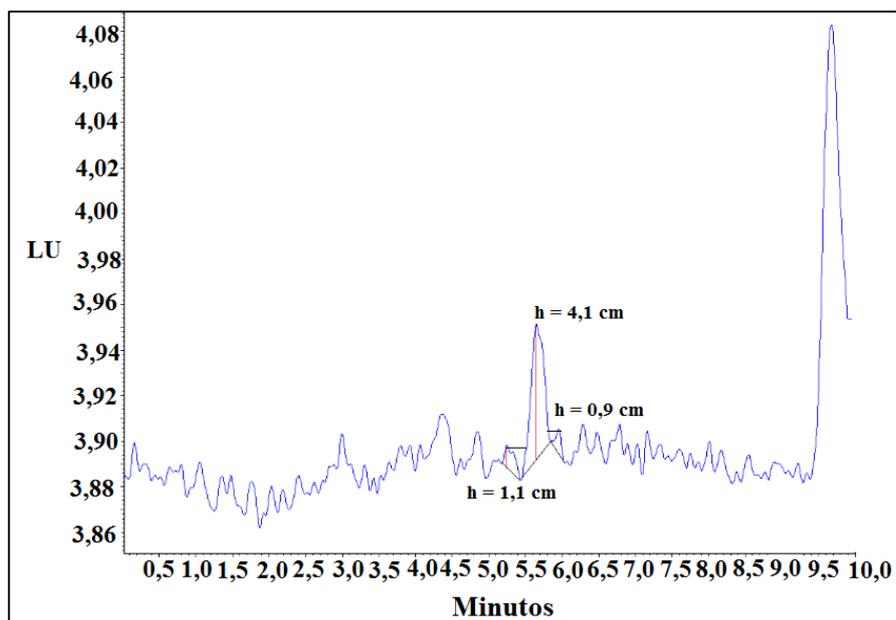
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 11- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 280 nm



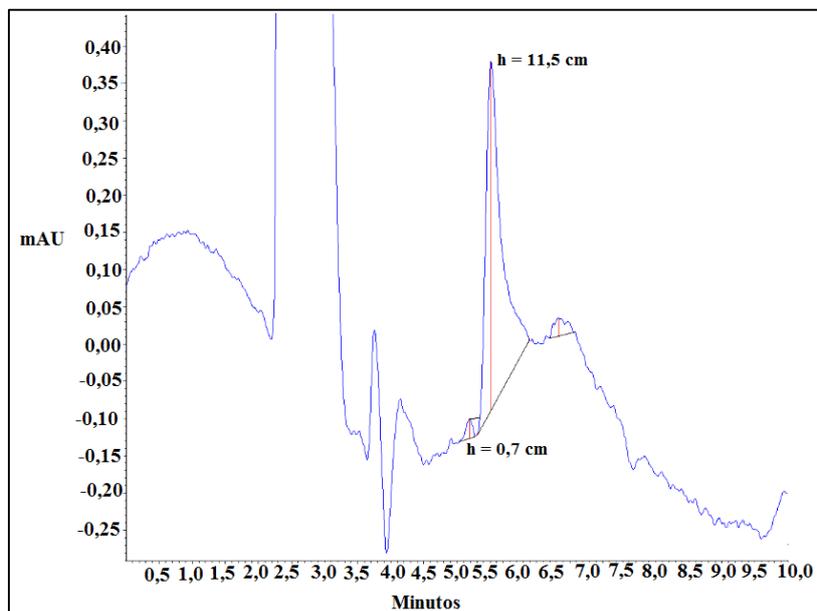
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 12- Cromatograma referente ao limite de detecção da solução padrão de concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo FLD (275/300 nm)



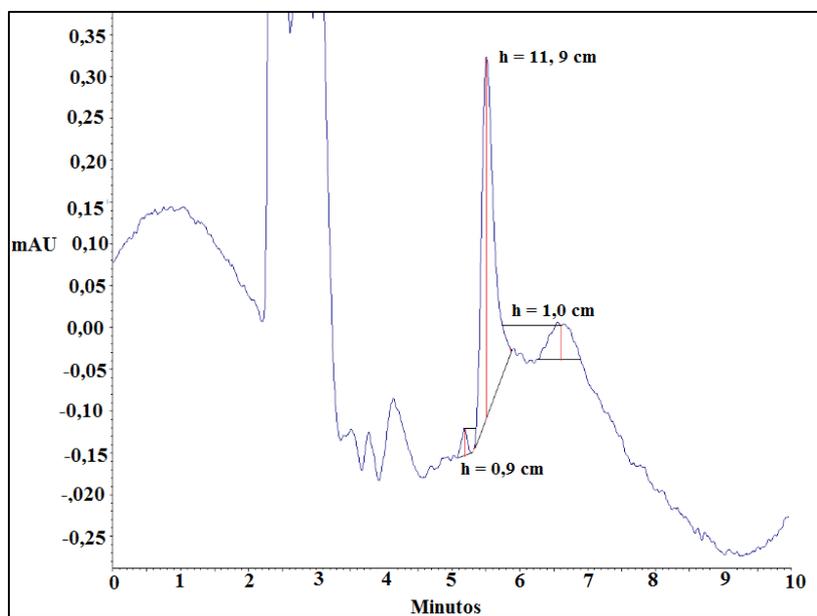
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 13- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração $25 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 220 nm



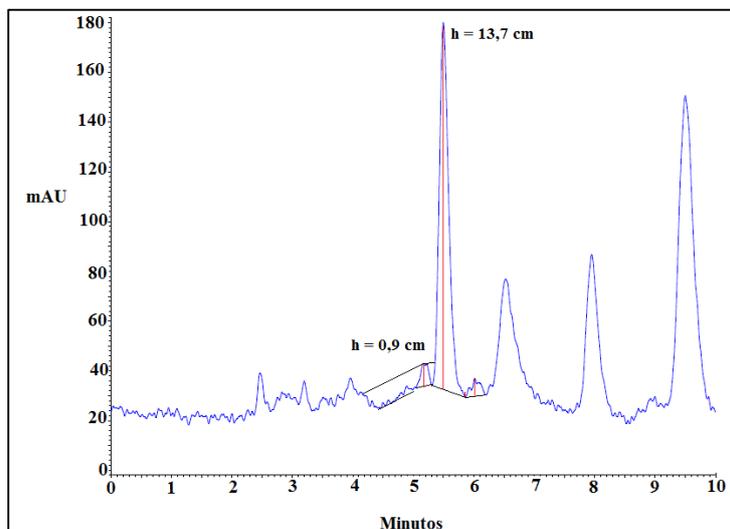
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 14- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração $25 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 228 nm



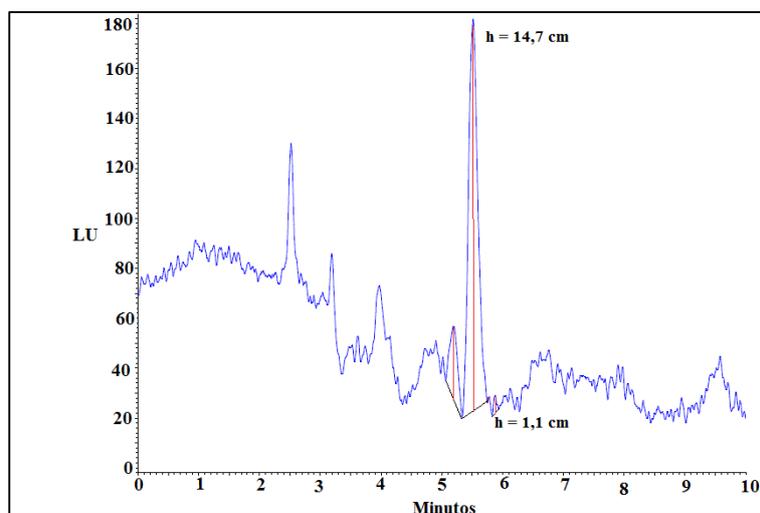
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 15- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo DAD a 280 nm



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 16- Cromatograma referente ao limite de quantificação da solução padrão de concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$ detectado pelo FLD (275/300 nm)



Fonte: Arquivo pessoal.

Pode-se observar que tanto os valores do LD e LQ obtidos pelo método da curva analítica como pela relação sinal/ruído se mostraram bem semelhante. Sendo assim, pode-se trabalhar com qualquer um desses dois métodos para detectar e quantificar o BFA com detecção pelo DAD, numa concentração de 5 e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ no comprimento de onda em 220 nm e 228 nm , 10 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ no de 280 nm , respectivamente. Enquanto que o BFA com detecção por FLD podem ser detectados e quantificados em concentração de 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

5.1.5. Precisão

A precisão de um método validado pode ser considerada em dois níveis diferentes: repetitividade e precisão intermediária.

A precisão intermediária avalia o efeito das variações dos dados obtidos dentro de um mesmo laboratório, mas em diferentes dias, analistas, equipamentos, dentre outras condições (BRITO *et al.*, 2003). A repetitividade avalia o efeito de variações dos dados obtidos dentro de um mesmo laboratório, com o mesmo analista, num mesmo dia.

A avaliação da precisão do método foi realizada pela comparação entre o valor experimental e o valor tabelado obtidos pelo teste F em um intervalo de confiança de 95%, de duas amostras reais ($n = 10$) analisadas por dois analistas, em dias diferentes. A Tabela 5.7 apresenta os valores da eficiência de extração média, %CV, F_{CAL} e F_{TAB} das amostras analisadas pelos dois analistas.

Tabela 5. 7- Resultados da precisão dos conjuntos de dados dos analistas 1 e 2

Eficiência de extração média (%)				
	DAD			FLD
	220 nm	228 nm	280 nm	275/300 nm
Analista 1 (n=10)	98,90%	98,02%	96,60%	96,58%
Analista 2 (n=10)	99,12%	99,66%	97,06%	96,66%
%CV (Analista 1)	2,54%	2,48%	2,38%	2,52%
%CV (Analista 2)	3,72%	3,68%	2,57%	3,01%
Equação de Horwitz (Analista 1)	6,28%	6,30%	6,31%	6,31%
Equação de Horwitz (Analista 2)	6,28%	6,28%	6,31%	6,31%
F_{CAL}	2,16	2,28	1,18	1,43
F_{TAB}	3,18	3,18	3,18	3,18
t_{CAL}	0,15	1,18	0,42	0,066
t_{TAB}	2,10	2,10	2,10	2,10

Fonte: Arquivo pessoal.

Pelos resultados obtidos, o método analítico validado para determinação de BFA por detecção DAD nos comprimentos de onda de 220, 228 e 280 nm se mostrou repetitivo com um coeficiente de variação compreendido na faixa de 2,38 - 2,54% para o analista 1 e de 2,57 – 3,72% para o analista 2. Já pelo FLD apresentou-se um CV de 2,52% para o analista 1 e de 3,01% para o analista 2. Pela equação de Horwitz também se observou que o método validado se mostrou repetitivo tanto pelo DAD quanto pelo FLD com um CV inferior a 10% para ambos analistas (1 e 2). De acordo com Brito *et al.* (2003), em amostras para análises traços, a eficiência de extração média está numa faixa de 40 a 120% com um coeficiente de variação aceitável de até 45%.

De acordo com os valores obtidos pelo teste F (razão entre as variâncias $=s_1^2/s_2^2$), pode-se concluir que os métodos usando tanto o detector ultravioleta (DAD) com comprimento de onda de 220, 228 e 280 nm quanto o detector FLD com $\lambda_{\text{excitação}} = 275$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 300$ não apresentaram diferenças significativas entre si a um nível $\alpha = 5\%$ de probabilidade de erro. Pelo teste “*t Student*” pode-se observar também que não houve diferença significativa entre as médias a um nível $\alpha = 5\%$ de probabilidade de erro. Logo, o método validado apresentou-se preciso, pois as F_{CAL} foram menores que os valores do F_{TAB} para grau de liberdade $(n_1-1) = 9$, e também o $t_{\text{CAL}} < t_{\text{TAB}}$ para grau de liberdade $(n_1+n_2-2) = 18$, uma aceitável para análises traços ($\mu\text{g L}^{-1}$).

5.1.6. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em triplicata em três níveis de concentração (baixa, média e alta) (300; 500 e 700 $\mu\text{g L}^{-1}$) pela determinação da eficiência de extração (E) e do coeficiente de variação (CV) de cada analito analisado no DAD e FLD. A Tabela 5.8 mostra os resultados obtidos para a eficiência de extração média de cada analito em triplicata e o erro relativo.

Tabela 5. 8- Dados da exatidão do método detectados por DAD e FLD

$\mu\text{g L}^{-1}$	DAD (220 nm)			
	Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Desvio padrão médio	Eficiência de extração média (%)	%CV
300	285,86	14,95	95,29%	5,24%
500	493,20	13,09	98,64%	2,65%
700	695,91	4,87	99,42%	0,70%
DAD (228 nm)				
300	291,10	13,69	97,03%	4,70%
500	497,96	9,90	99,59%	1,99%
700	698,57	5,18	99,80%	0,74%
DAD (280 nm)				
300	288,11	6,57	96,04%	2,28%
500	502,87	2,46	100,57%	0,50%
700	702,36	5,57	100,34%	0,79%
FLD (275/300 nm)				
300	298,53	2,70	99,50%	0,90%
500	509,47	3,25	101,89%	0,64%
700	703,94	4,18	100,56%	0,59%

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dados apresentados na Tabela 5.8 mostram que o BFA detectado pelo DAD a exatidão ficou compreendida na faixa de 95,26 - 100,57% com um coeficiente de variação compreendido na faixa de 0,50 - 5,24%. Já o BFA detectado pelo FLD, a exatidão ficou compreendida na faixa de 99,50 - 101,89% com um coeficiente de variação entre 0,59 - 0,90%. O método se mostrou satisfatório para

a eficiência de extração e %CV obtidos para ambos detectores para as análises traços, de acordo com Brito *et al.* (2002), amostras em concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$ estão em uma faixa aceitável de eficiência de extração entre 40 a 120% com um coeficiente de variação (CV) menor que 45%.

5.1.7. Robustez

A robustez do método validado foi determinada variando em $\pm 5\%$ quatro condições cromatográficas: volume de injeção da amostra no CLAE, temperatura do compartimento da coluna, vazão da fase móvel e composição da fase móvel (FM). Os resultados obtidos da eficiência de extração média e do %CV estão mostrados na Tabela 5.9.

Tabela 5. 9- Dados da robustez do método de BFA detectados por DAD e FLD

Condições cromatográficas alteradas	DAD (220 nm)		
	Eficiência de extração média (%)	%CV	Desvio padrão
Volume de injeção: 9,5 μL	136,62%	0,62%	4,23
Volume de injeção: 10,5 μL	151,46%	0,72%	5,49
Temperatura da coluna: 42,8°C	144,77%	0,27%	1,97
Temperatura da coluna: 47,3°C	143,70%	0,27%	1,95
FM: 57% ACN e 43% H ₂ O	143,39%	0,14%	1,00
FM: 63% ACN e 37% H ₂ O	140,24%	1,20%	8,46
Vazão da FM: 0,19 mL min ⁻¹	107,00%	0,99%	5,30
Vazão da FM: 0,21 mL min ⁻¹	152,28%	1,58%	12,04
DAD (228 nm)			
Volume de injeção: 9,5 μL	110,66%	0,54%	3,03
Volume de injeção: 10,5 μL	122,86%	0,68%	4,20
Temperatura da coluna: 42,8°C	116,14%	0,099%	0,58
Temperatura da coluna: 47,3°C	116,00%	0,15%	0,88
FM: 57% ACN e 43% H ₂ O	116,15%	0,038%	0,22
FM: 63% ACN e 37% H ₂ O	114,75%	0,026%	1,53
Vazão da FM: 0,19 mL min ⁻¹	106,90%	0,72%	3,86
Vazão da FM: 0,21 mL min ⁻¹	124,09%	1,94%	12,03
DAD (280 nm)			
Volume de injeção: 9,5 μL	100,38%	0,93%	4,66
Volume de injeção: 10,5 μL	111,68%	0,71%	3,95
Temperatura da coluna: 42,8°C	107,04%	0,37%	1,99
Temperatura da coluna: 47,3°C	105,49%	0,86%	4,56
FM: 57% ACN e 43% H ₂ O	106,68%	1,50%	8,02
FM: 63% ACN e 37% H ₂ O	109,50%	0,43%	2,37
Vazão da FM: 0,19 mL min ⁻¹	107,44%	0,24%	1,32
Vazão da FM: 0,21 mL min ⁻¹	102,74%	1,92%	9,90
FLD (275/300 nm)			
Volume de injeção: 9,5 μL	96,38%	0,61%	2,93
Volume de injeção: 10,5 μL	106,43%	0,48%	2,57
Temperatura da coluna: 42,8°C	98,80%	0,68%	3,40
Temperatura da coluna: 47,3°C	98,86%	1,02%	5,04
FM: 57% ACN e 43% H ₂ O	93,12%	0,06%	0,28

FM: 63% ACN e 37% H ₂ O	103,64%	0,34%	1,76
Vazão da FM: 0,19 mL min ⁻¹	104,38%	0,15%	0,80
Vazão da FM: 0,21 mL min ⁻¹	96,58%	0,82%	3,95

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dados apresentados na Tabela 5.9 mostram que os valores obtidos da eficiência de extração média do BFA detectado por DAD está compreendida na faixa de 100,38 a 152,28% com coeficientes de variação (CV) inferior a 2%. E o BFA detectado por FLD apresentou uma eficiência de extração média compreendida na faixa de 93,12 a 106,43% com um coeficiente de variação (CV) também inferior a 2%.

De acordo, com as condições estudadas e o %CV apresentou um valor inferior a 45% e a eficiência de extração está compreendida na faixa de 40-120% somente para o FLD, enquanto a do DAD ultrapassou limite. No entanto, nenhum dos parâmetros avaliados mostrou-se efeito significativo, indicando que o método pode ser considerado como robusto frente a estas variações experimentais.

5.1.8. Condições cromatográficas otimizadas

A partir da validação pode-se concluir que o método cromatográfico para determinação de BFA detectados por DAD e FLD se mostrou aceitável na literatura conforme foi previsto por Gómez, Aristiawan e colaboradores (2015). No entanto, para verificação da eficiência de extração do BFA para água ultrapura fortificada foi utilizado o detector por fluorescência devido apresentar uma melhor resolução dos picos cromatográficos conforme a Tabela 5.10.

Tabela 5. 10- Condições cromatográficas validadas para determinação de BFA

Composição da fase móvel (FM)	Acetonitrila/ Água (60:40, v/v); modo isocrático
Vazão da fase móvel (FM)	0,200 mL min ⁻¹
Tipo de coluna	ZORBAX- SB-C8, Rapid Resolution HIIT
Temperatura da coluna	45 °C
Comprimento de onda do detector por Fluorescência (FLD)	$\lambda_{\text{excitação}} = 275 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 300 \text{ nm}$

Fonte: Arquivo pessoal.

5.2. Síntese do MIP otimizada

O planejamento de triagem estatística Box- Behnken foi feito com três níveis codificados em baixo (-1), central (0) e alto (+1) e três fatores a serem alterados: tempo de reação, tipo de solvente e agitação magnética, conforme mostra a Tabela 5.11. As combinações dos níveis e fatores totalizaram em 15 experimentos, ressaltando que foram realizados experimentos no ponto central em triplicata codificado como zero "0", conforme mostra a Tabela 5.12. Todos os experimentos da síntese do MIP foram realizados conforme descrito na seção 4.4 e na Tabela 5.12.

Tabela 5. 11: Níveis e fatores do planejamento Box-Behnken

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (horas)	3 horas	4 horas	5 horas
Solvente	Acetonitrila	Clorofórmio	Tolueno
Agitação (rpm)	300	400	500

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5. 12- Planejamento de triagem estatística Box-Behnken

Experimentos	Tempo (horas)	Solvente	Agitação (rpm)
1	0	-1	1
2	0	1	1
3	-1	0	1
4	0	-1	-1
5	-1	1	0
6	1	1	0
7	0	0	0
8	0	1	-1
9	0	0	0
10	1	0	1
11	-1	0	-1
12	1	0	-1
13	0	0	0
14	1	-1	0
15	-1	-1	0

Fonte: Arquivo pessoal.

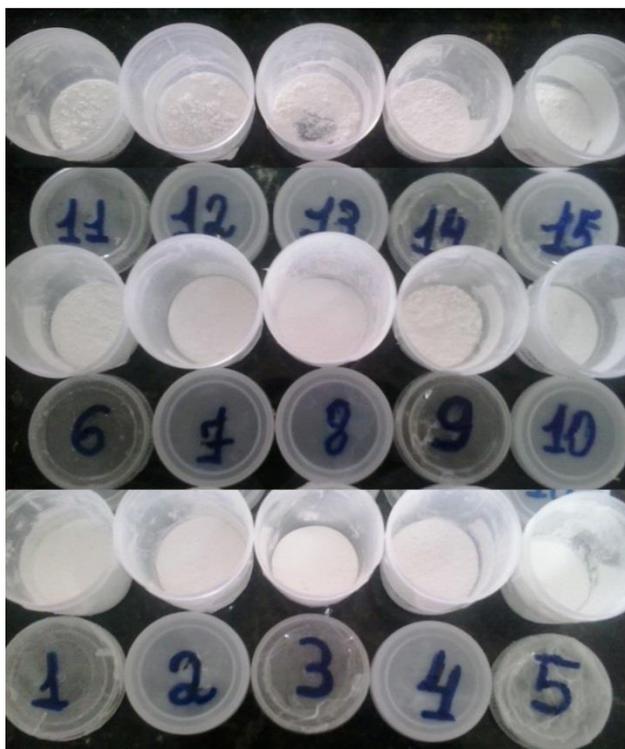
Os 15 MIPs foram obtidos pelo processo de polimerização em “bulk” em sistema homogêneo/fechado como foi descrito na seção 4.4. Conforme a Figura 5.17, os MIPs sintetizados apresentaram aspectos esbranquiçados, estrutura rígida e aparência amorfa. A Figura 5.18 mostra os 15 MIPs sintetizados, moídos e sem a molécula molde. Como pode-se observar, todos os materiais apresentaram-se um pó branco e fino.

Figura 5. 17- Fotografia do MIP formado após secagem e moagem



Fonte: Arquivo pessoal.

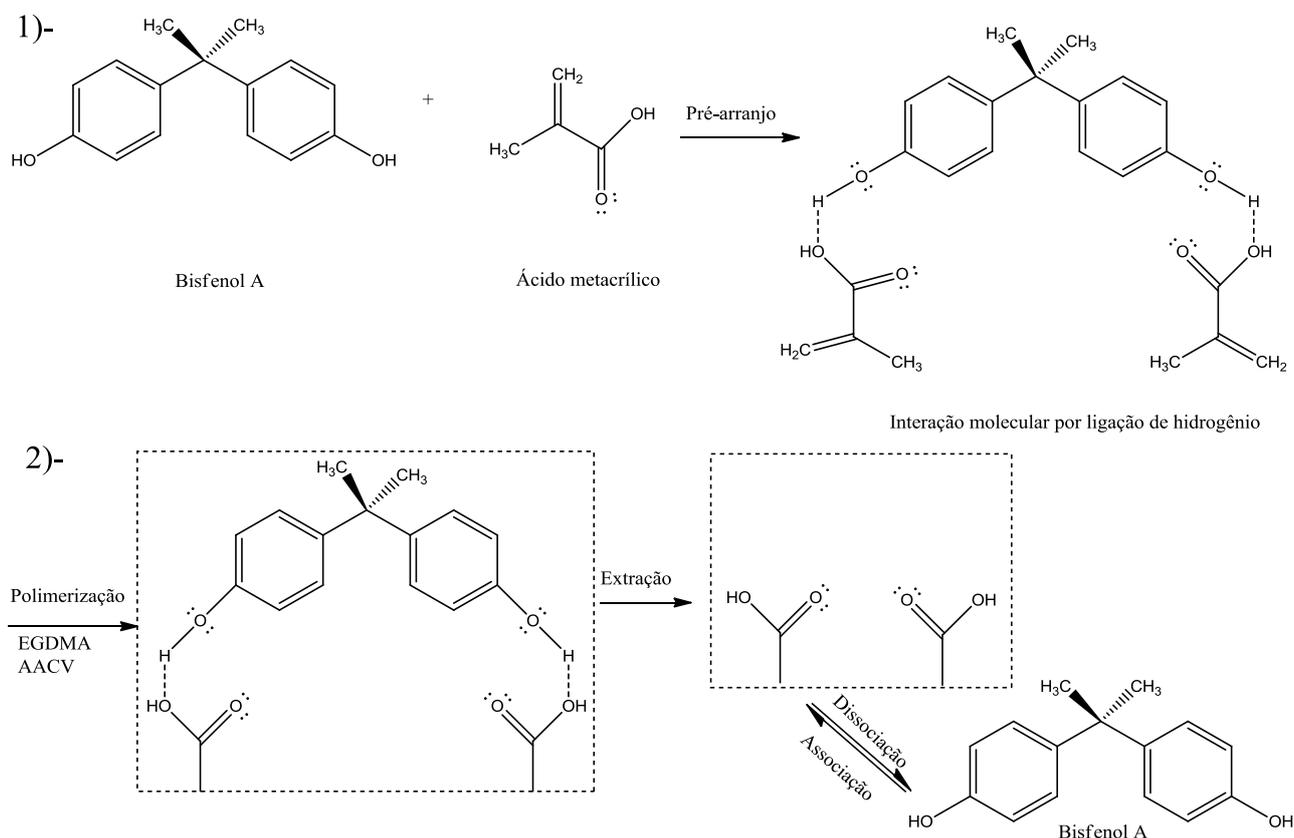
Figura 5. 18- Os 15 MIPs sintetizados, moídos e sem molécula molde



Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 5.19 mostra a ilustração esquemática do possível procedimento de impressão molecular do MIP, sendo resultado da interação molecular por ligação de hidrogênio entre o monômero funcional e a molécula-molde.

Figura 5. 19- Processo de síntese e impressão para os polímeros de impressão molecular (MIP)



Fonte: ChemDraw Ultra. Adaptado da SAAVEDRA, 2017.

Para avaliar e quantificar qual melhor condição de síntese proposta pelo planejamento de triagem estatística Box-Behnken, os 15 MIPs mostrados na Figura 5.18 foram empacotados em cartuchos para extração em fase sólida em triplicata ($n=3$), conforme procedimento mencionado na seção 4.7. Após todo o procedimento da extração em fase sólida, ou seja, acondicionamento do MIP no cartucho, percolação da amostra no cartucho, *clean-up* e eluição dos analitos pré-concentrados, estes foram injetados em triplicatas ($n=3$) no sistema CLAE-FLD para serem analisados.

A eficiência de extração dos 15 MIPs foram determinadas pela conversão das áreas dos picos cromatográficos obtidos pelo sistema CLAE-FLD em concentração através da equação da curva analítica ($y=30070,02096x + 148179,79713$). A partir dessas concentrações do BFA para água

ultrapura fortificado (n=3) foi obtida a média das concentrações de cada analito pré-concentrado detectados pelo FLD em triplicata (n=3). Os resultados obtidos da recuperação (%) e o coeficiente de variação (CV) para os MIPs estão expressos na Tabela 5.13.

Tabela 5. 13- Valores obtidos da recuperação média para os 15 experimentos

Experimentos	Tempo (horas)	Solvente	Agitação (rpm)	Eficiência de extração média (%)	%CV
1	4	Acetonitrila	500	60,20%	29,51%
2	4	Tolueno	500	88,10%	7,73%
3	3	Clorofórmio	500	98,69%	1,74%
4	4	Acetonitrila	300	80,37%	5,77%
5	3	Tolueno	400	90,42%	10,06%
6	5	Tolueno	400	80,30%	8,98%
7	4	Clorofórmio	4000	73,36%	5,11%
8	4	Toluenos	300	80,71%	2,89%
9	4	Clorofórmio	400	96,01%	5,08%
10	5	Clorofórmio	500	96,92%	8,23%
11	3	Clorofórmio	300	92,69%	6,72%
12	5	Clorofórmio	300	93,09%	6,64%
13	4	Clorofórmio	400	85,71%	5,54%
14	5	Acetonitrila	400	78,95%	15,95%
15	3	acetoneitrila	4000	86,74%	9,86%

Fonte: arquivo pessoal.

Como pode ser observado pela Tabela 5.13 os 15 MIPs apresentaram uma eficiência de extração média compreendida entre 60,20 – 98,69% com um coeficiente de variação (CV) inferior a 45%. Os valores de eficiência de extração média (%) dos MIPs obtidos estão dentro da faixa estimada na literatura de 60 - 100% (Pichon, 2007; Sun *et al.* 2014). Pelos resultados apresentados na Tabela 5.13 observa-se que o MIP que apresentou a melhor eficiência de extração para o BFA (98,69%), com um CV de 1,74%, foi o experimento 3 sintetizado com um tempo de reação de 3 horas, solvente clorofórmio e velocidade de agitação magnética de 500 rpm.

No entanto, para comprovar essa conclusão de que o experimento 3 foi o melhor dentre os 15 dados obtidos foi realizado um tratamento estatístico dos dados utilizando o *software Statistica 10*[®] para estimar os coeficientes da regressão polinomial de segunda ordem ou quadrática (Equação 3.11).

Dessa forma, o modelo matemático empírico pode ser calculado conforme a Equação 5.1:

$$B = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (\text{Eq.5.1})$$

$$\hat{y} = XB \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Onde:

B= é um vetor contendo os coeficientes ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{12}, \beta_{13}$ e β_{23});

X= é a matriz dos contrastes contendo as informações dos experimentos (Fig.5.20);

X^T = matriz X transposta (Fig.521);

y e \hat{y} = vetor contendo as respostas experimentais e previstas.

Figura 5. 20- Matriz X dos contrastes com 15 (experimentos) linhas e 10 (coeficientes $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{12}, \beta_{13}$ e β_{23}) colunas (15x10)

$$X = \begin{matrix} & \begin{matrix} 1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & -1 \end{matrix} \\ \begin{matrix} 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \\ 1 \end{matrix} & \begin{matrix} 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & -1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \end{matrix} \end{matrix}$$

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 21- Matriz X^T com 10 linhas e 15 colunas (10x15)

$$X^T = \begin{matrix} \begin{matrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 1 \\ 0 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{matrix} & \begin{matrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 1 & 0 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & -1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{matrix} \end{matrix}$$

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 22- resultado da multiplicação $(X^T X)^{-1}$ (10:10)

	0,3333	0	0	0	-0,167	-0,167	-0,167	0	0	0
	0	0,125	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0,125	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0,125	0	0	0	0	0	0
$(X^T X)^{-1} =$	-0,167	0	0	0	0,271	0,021	0,021	0	0	0
	-0,167	0	0	0	0,021	0,271	0,021	0	0	0
	-0,167	0	0	0	0,021	0,021	0,271	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0,250	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0,250	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,250

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 5.14 mostra os resultados da eficiência de extração média (%) experimentais e previstas de BFA obtidas pelo modelo de triagem estatística Box-Behnken para os 15 experimentos.

Tabela 5. 14- Respostas experimentais e previstas para os 15 experimentos obtidos no Box-Behnken

Experimentos	Tempo (horas)	Solvente	Agitação (rpm)	% Eficiência de extração média de BFA	
				Experimental	Prevista
1	0	-1	1	60,20%	65,93%
2	0	1	1	88,10%	88,03%
3	-1	0	1	98,69%	97,93%
4	0	-1	-1	80,37%	80,45%
5	-1	1	0	90,42%	91,26%
6	1	1	0	80,30%	85,28%
7	0	0	0	73,36%	85,03%
8	0	1	-1	80,71%	74,99%
9	0	0	0	96,01%	85,03%
10	1	0	1	96,92%	92,03%
11	-1	0	-1	92,69%	97,59%
12	1	0	-1	93,10%	93,85%
13	0	0	0	85,71%	85,03%
14	1	-1	0	78,95%	78,12%
15	-1	-1	0	86,74%	81,78%

Fonte: Arquivo pessoal.

Os experimentos 7, 9 e 13 mostrados na Tabela 5.14 são as réplicas no ponto central codificados em 0, enquanto que, os outros 12 experimentos restantes são os pontos médios das 12 arestas do cubo codificados entre -1 e +1. As respostas experimentais ficaram entre 60,20 – 98,69% de BFA extraído e pelo modelo matemático na faixa de 65,93 – 97,93% de BFA. Logo, o modelo gerado por meio da equação 5.2 e pela Tabela 5.14 está mostrado na Equação 5.3:

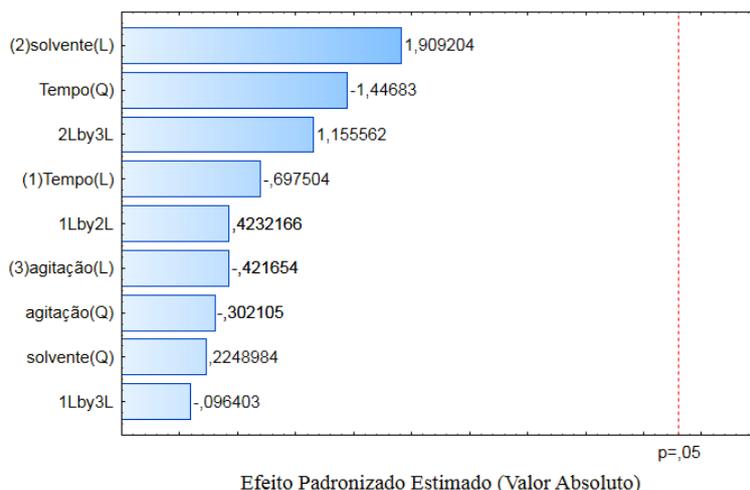
$$Y = 85,03 - 2,41X_1 + 4,16X_2 - 0,37X_3 + 8,54X_1^2 - 9,46X_2^2 + 1,78X_3^2 - 0,58X_1X_2 - 0,54X_1X_3 + 6,89X_2X_3 \quad (\text{Eq.5.3})$$

Em que:

Y é a eficiência de extração média (%) de BFA no adsorvente MIP, X₁ é o tempo de reação (horas), X₂ é o tipo de solvente e X₃ é a velocidade da agitação magnética (rpm).

Para o ajuste desse modelo de regressão proposto pelo Box-Behnken, foi necessário verificar os parâmetros significativos. Logo, de uma forma clara e sucinta, foi utilizado o diagrama de Pareto para expressar as variáveis que são estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95%, onde os retângulos que ultrapassaram à direita da linha pontilhada (p=0,05) foram considerados significativos e inclusos no modelo matemático, enquanto que, os retângulos que estão à esquerda da linha pontilhada não foram considerados significativos e excluído do modelo, conforme ilustra a Figura 5.23.

Figura 5. 23- Diagrama de Pareto em função dos valores de estatística do teste *t-Student* do modelo Box-Behnken considerando as interações

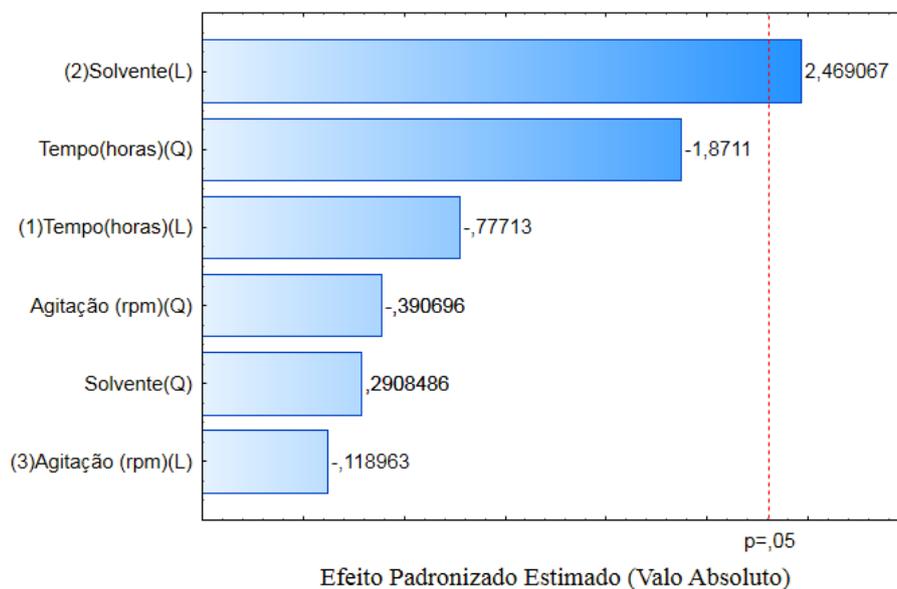


Fonte: Arquivo pessoal.

Pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 5.23, foi verificado que o tempo de reação em horas, tipo de solvente e agitação magnética não influenciaram no domínio experimental. Logo, todos esses termos lineares, quadráticos e interações apresentaram um efeito negativo sobre a resposta.

No entanto, quando se ajustou o diagrama de Pareto mostrado na Figura 5.24 excluindo as interações de segunda ordem, pode-se observar que somente o solvente apresentou um efeito significativo ($p=0,05$) sobre a resposta, enquanto que, os outros parâmetros analisados não apresentaram um efeito significativo sobre a resposta.

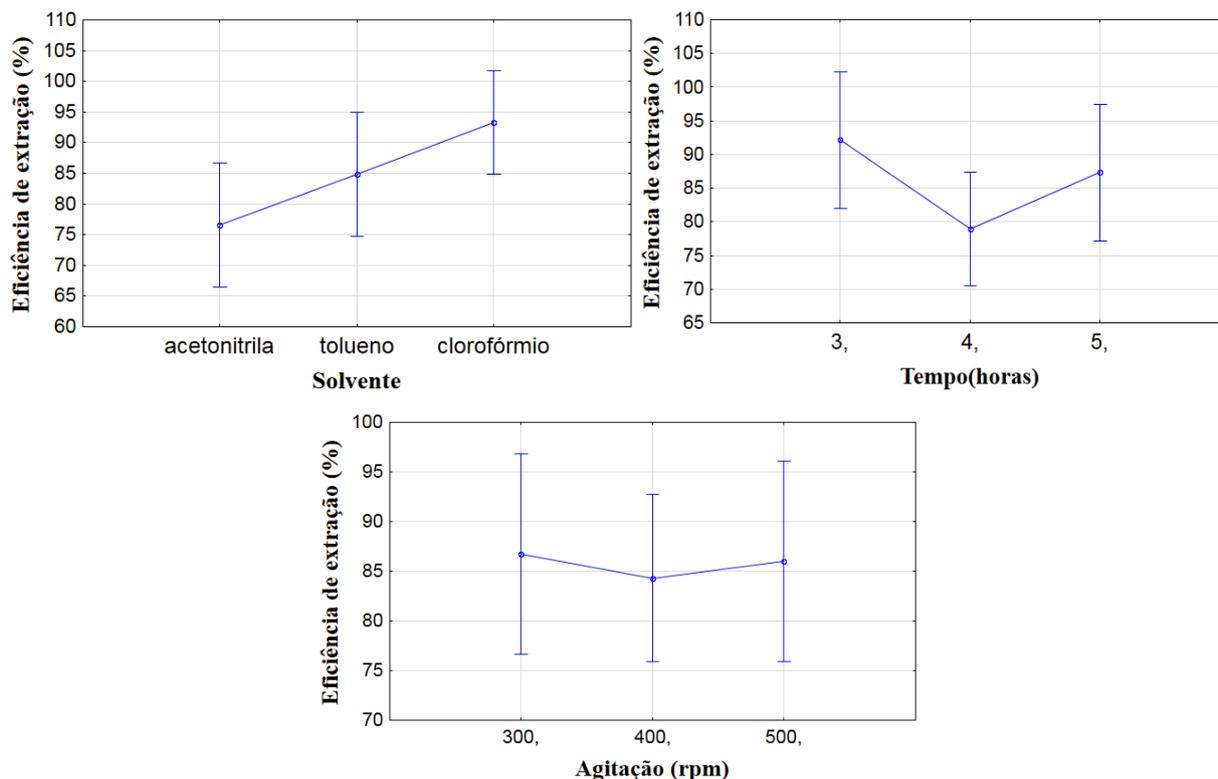
Figura 5. 24- Diagrama de Pareto em função dos valores de estatística do teste t-Student do modelo Box-Behnken excluindo as interações



Fonte: Arquivo pessoal.

O solvente exerce importante função na eficiência de recuperação do analito enquanto que os parâmetros de agitação (300 a 500 rpm) e tempo (3 a 5 horas) não apresentaram diferenças na resposta (com intervalo de confiança de 95%), como apresentado na Figura 5.25.

Figura 5. 25- Gráfico das médias marginais da recuperação média (%) em função dos fatores solvente, tempo (horas) e agitação magnética (rpm)



Fonte: Arquivo pessoal.

Assim sendo, o modelo empírico de regressão proposto para as variáveis em estudos ficou da seguinte forma:

$$Y = 85,03 - 2,41X_1 + 4,16X_2 - 0,37X_3 + 8,54X_1^2 - 9,46X_2^2 + 1,78X_3^2 \quad (\text{Eq.5.4})$$

Os resultados previstos da eficiência de extração (%) pelo modelo gerado no Box-Behnken ajustado foi bem próximo do obtido experimentalmente mostrado na Tabela 5.15, apresentando um coeficiente de correlação superior a 0,7, que é o mínimo previsto pela literatura (PEREIRA-FILHO, 2015).

Tabela 5. 15- Respostas experimentais e previstas pelo modelo Box-Behnken otimizado

Experimentos	% eficiência de extração média de BFA	
	Experimental	Prevista
1	60,20%	72,82%
2	88,10%	81,14%
3	98,69%	97,39%
4	80,37%	73,56%
5	90,42%	90,68%
6	80,30%	85,86%
7	73,36%	85,03%
8	80,71%	81,88%
9	96,01%	85,03%
10	96,92%	92,57%
11	92,69%	98,13%
12	93,10%	93,31%
13	85,71%	85,03%
14	78,95%	77,54%
15	86,74%	82,36%

Fonte: Arquivo pessoal.

Entretanto, para a validação desse modelo proposto na otimização das variáveis para o processo de síntese do MIP, foi utilizado a análise de variância (ANOVA). Conforme ilustra a Tabela 5.16.

Tabela 5. 16- ANOVA para ajuste do modelo proposto

Parâmetro	SQ	GL	Média Quadrática (MQ)	Teste F _{CAL}	F _{TAB} (95%)
Regressão	848,174	6	141,362	1,84	3,56
Resíduo	615,202	8	76,900		
Total	1463,376	14	104,526	-	-
Erro puro	257,212	2	128,606	2,16	19,33
Falta de ajuste	357,99	6	59,665		
Varição explicada (R ²)	0,5796	R	0,7613	-	-
Máxima variação explicada (R ² _{máx})	0,8242	R máximo	0,9079	-	-

Fonte: arquivo pessoal.

A partir dos dados obtidos pela Tabela 5.16, foi verificado que o valor de SQ_{res} (615,212) mostra a quantidade de informações que não está sendo informada pelo modelo proposto (coeficiente

de regressão), das quais às SQ_{ep} (2,572) e Sq_{faj} (357,212). O parâmetro SQ_{ep} está associado as réplicas no ponto central que tem como objetivo de fornecer o erro intrínseco dos experimentos realizados. E a SQ_{faj} está relacionada com a incapacidade do modelo em se ajustar aos pontos experimentais medidos.

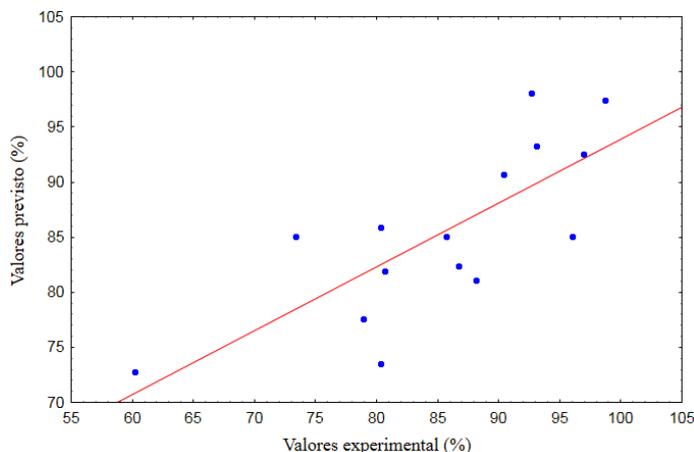
Para verificar a qualidade e confiabilidade do modelo proposto, foi efetuada a comparação das variâncias obtidas (MQ) por meio do teste F. Com base na razão de MQR e MQ_{res} , o modelo proposto se mostrou estatisticamente não significativo, ou seja, o F calculado foi maior que o F tabelado a um nível de confiança de 95% de probabilidade de erro para 6 e 8 graus de liberdade, logo essas duas variâncias (MQ e MQ_{res}) são estatisticamente iguais.

Para avaliar o ajuste do modelo, foi feita a comparação das variâncias MQ_{Faj} e MQ_{ep} através do teste F. O valor de F calculado apresentou-se inferior ao valor de F tabelado a um nível de confiança de 95% de probabilidade de erro para 6 e 2 graus de liberdade, ou seja, as duas variâncias não são estatisticamente iguais. Dessa forma, é possível afirmar que o modelo proposto não apresentou falta de ajuste.

E por fim, um outro parâmetro a ser avaliado é a quantidade de informação que a SQR consegue explicar em relação a SQT, sendo que esse resultado não foi tão satisfatório, com somente 57% da SQ de todo sistema ou das informações explicada pela regressão e quase 50% não foram modelados ou explicados pelo modelo proposto. A máxima porcentagem de informação que o modelo poderia explicar caso a SQ_{ep} fosse zero seria de aproximadamente 82% da SQ das informações.

Pela Figura 5.26 pode-se observar que houve uma conformidade razoável entre os valores experimentais e previstas pelo modelo proposto.

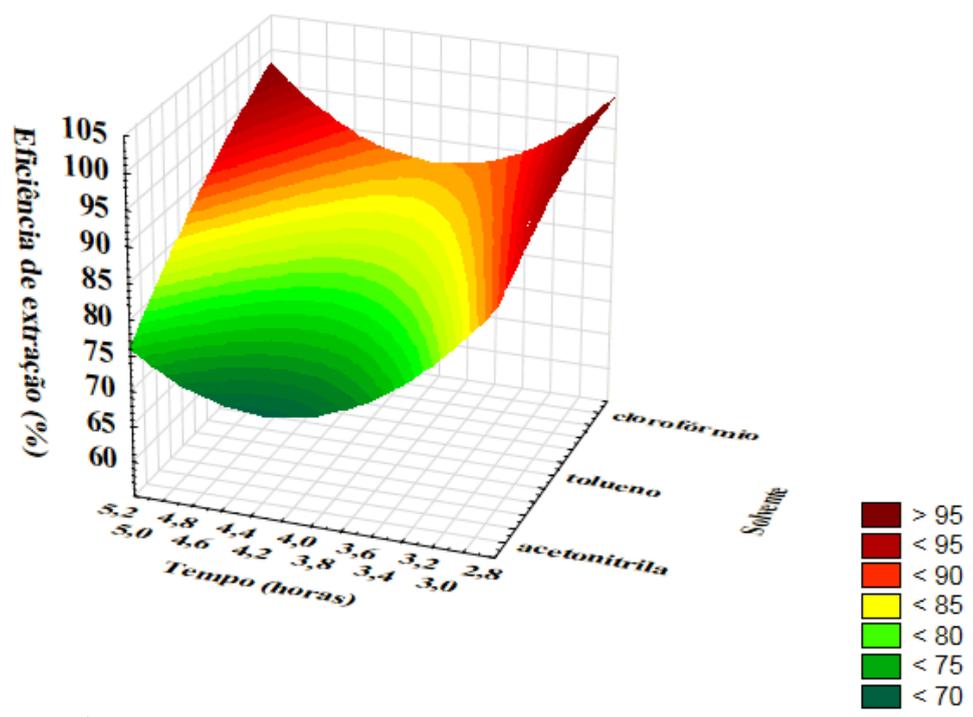
Figura 5. 26- Valores experimentais em função dos valores previstos pelo modelo proposto



Fonte: Arquivo pessoal.

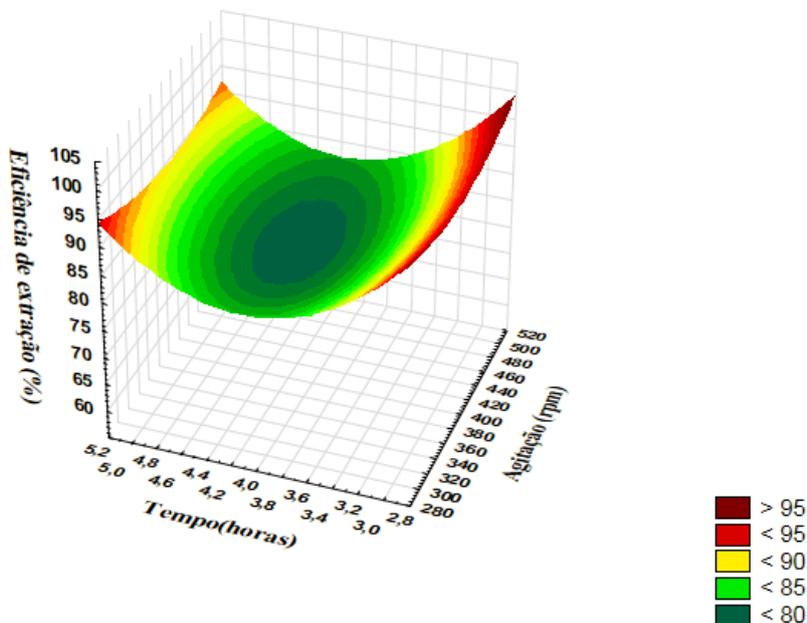
Nessa observação, confirma-se que o ajuste do modelo não foi bem apurado devido alguns resultados estarem dispersos e distantes da linha reta. Esse fato pode ser devido aos fatores tempo e agitação que não influenciaram durante o processo de síntese do MIP, conforme ilustra os gráficos de superfície resposta nas Figuras 5.27 a 5.29, construídos relacionando as médias de eficiência de extração (%) de cada experimento no eixo Z com os dois fatores no eixo X e Y codificados com -1, 0 e +1.

Figura 5. 27- Superfície de resposta relacionando solvente, tempo (horas) e eficiência de extração média (%) do BFA detectado por FLD



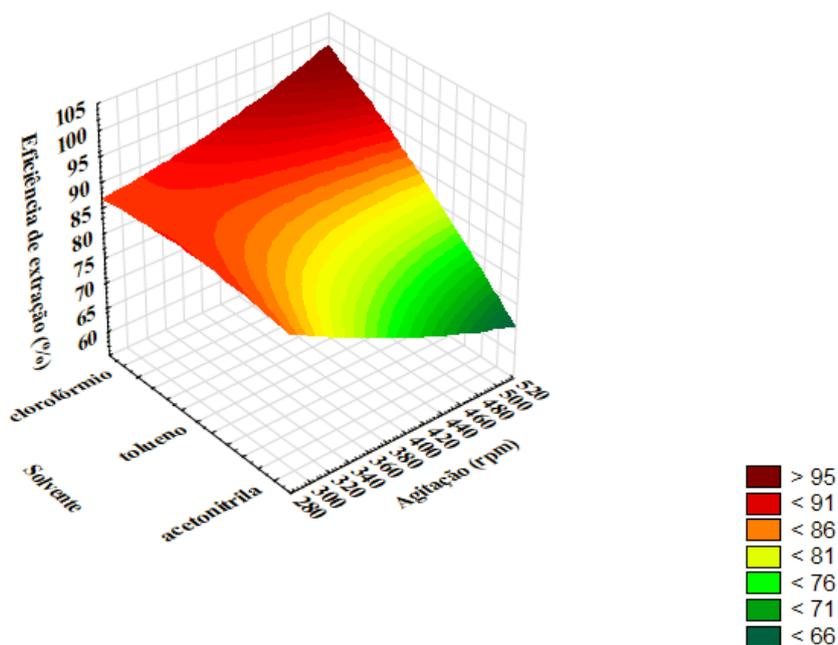
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 28- Superfície de resposta relacionando tempo (horas), agitação (rpm) e eficiência de extração média (%) do BFA detectado por FLD



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 29- Superfície de resposta relacionando solvente, agitação (rpm) e eficiência de extração média (%) do BFA detectado por FLD



Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos dados gerados pelos gráficos de superfície de resposta nas Figuras 5.27 a 5.29 podemos estabelecer quais dos fatores apresentaram condições ótimas para a síntese do MIP.

Na relação tempo (horas) com solvente, observa-se que o solvente mais adequado para a síntese do MIP foi o clorofórmio em um tempo de 3 horas, uma vez que, a interação entre o monômero funcional MAA e a molécula molde BFA se dá por meio de ligação de hidrogênio. Portanto, um solvente não polar e com baixa constante dielétrica, como é o caso do clorofórmio, é o mais adequado, devido este não interferir na interação do monômero com a molécula molde (FONSECA; BORGES; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2016).

Ao relacionar o tempo (horas) com agitação (rpm), observa-se que no tempo de 3 horas a agitação magnética não influenciou na síntese do MIP podendo ser utilizada 300, 400 ou 500 rpm.

Ao relacionar o solvente com a agitação (rpm), observa-se também que a agitação magnética não influencia na síntese do MIP em solvente clorofórmio, podendo ser utilizada 300, 400 ou 500 rpm.

Todos os experimentos apresentaram valores de eficiência de extração dentro da faixa aceitável por detecção FLD, no entanto, de acordo com os gráficos de superfície de resposta optou-se pelo experimento de número 3 que apresenta as seguintes condições: tempo de reação de 3 horas, solvente, clorofórmio e agitação magnética de 500 rpm. Essa condição apresentou um melhor desempenho quando comparado os 15 experimentos.

5.3. Remoção da molécula molde do MIP

Para a determinação da quantidade remanescente de molécula molde presente no MIP foram injetadas no sistema CLAE por detecção fluorescência em triplicata (n=3) três soluções denominadas de branco obtidas da extração em fase sólida (seção 4.7). As áreas dos picos cromatográficos obtidos foram convertidas em concentrações através da equação da curva analítica $y=30070,02096x + 148179,79713$. A partir dessas concentrações foi determinada a massa de BFA final no MIP. Os resultados dos dados obtidos estão expressos na Tabela 5.17.

Tabela 5. 17- Quantidade de BFA presente nos 15 MIPs em %(g BFA g MIP⁻¹)

Experimentos	Massa inicial (g BFA g MIP ⁻¹)	Massa final (g BFA g MIP ⁻¹)	% Resíduo de MM no MIP
1	0,04885	0,59*10 ⁻⁶	0,0012%
2	0,04859	4,15*10 ⁻⁶	0,0085%
3	0,07718	2,57*10 ⁻⁶	0,0033%
4	0,04878	0,33*10 ⁻⁶	0,00068%
5	0,07610	1,78*10 ⁻⁶	0,0023%
6	0,05044	0,64*10 ⁻⁶	0,0013%
7	0,08511	0,42*10 ⁻⁶	0,00050%
8	0,05591	1,18*10 ⁻⁶	0,0021%
9	0,08237	0,28*10 ⁻⁶	0,00034%
10	0,09349	0,81*10 ⁻⁶	0,0008%
11	0,08896	0,46*10 ⁻⁶	0,00052%
12	0,07890	1,20*10 ⁻⁶	0,0015%
13	0,08626	1,70*10 ⁻⁶	0,0020%
14	0,0504	0,96*10 ⁻⁶	0,0019%
15	0,06289	1,58*10 ⁻⁶	0,0025%

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com esses valores, pode-se observar que a quantidade remanescente de BFA presente no MIP foi inferior a 1%. Conclui-se que a técnica por extração Soxhlet se mostrou bastante eficiente para a remoção da MM do MIP.

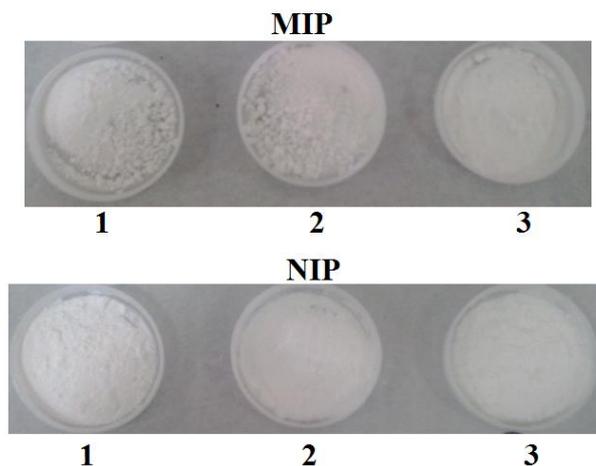
5.4. Síntese do MIP otimizado e NIP

Após todo o processo de tratamento estatístico no *software Statistica 10*® dos 15 MIPs sintetizados para avaliar quais destes apresentaram melhor condição de síntese, realizou-se a síntese do MIP de melhor condição e também do NIP um polímero não impresso em triplicata (n=3). A condição de síntese otimizada foi o experimento 3 (Seção 5.2; Tabela 5.13).

Todo o processo de síntese do MIP e NIP (ausente de molécula molde) otimizado foi realizado conforme o procedimento citado na seção 4.4 em triplicata (n=3), seguindo a condição: tempo de reação de 3 horas, solvente clorofórmio e velocidade de agitação magnética de 500 rpm.

Os polímeros sintetizados MIP e NIP apresentaram as mesmas características mencionadas na seção 5.2, ou seja, aspectos esbranquiçados, estrutura rígida e aparência amorfa. A Figura 5.30 mostra os polímeros MIP otimizado e NIP após remoção da molécula molde.

Figura 5. 30- MIP otimizado e NIP- Experimento 3 do planejamento Box-Behnken



Fonte: Arquivo pessoal.

Após sintetizado, purificado, seco e moído procedeu-se com a remoção da molécula molde dos 3 MIPs por meio da técnica de extração por Soxhlet conforme o procedimento abordado na seção 4.6.

A partir da massa dos produtos sintetizados de MIP e NIP pode-se prever que o rendimento da reação de polimerização tanto para o MIP quanto para o NIP foi de aproximadamente de 100%.

Para averiguação da remoção da molécula molde dos 3 MIPs foi realizado o empacotamento destes em cartuchos de extração para fase sólida seguindo o mesmo procedimento mencionado na seção 4.6.

Para a determinação da quantidade de resíduo de BFA presente no MIP otimizado em triplicata (n=3), uma alíquota de 10 μ L da solução extraída e filtrada foi injetada no sistema CLAE-FLD. As áreas dos picos cromatográficos obtidos foram convertidas em concentrações através da equação da curva analítica $y=30070,02096x + 148179,79713$. A partir dessas concentrações foi determinada a massa de BFA final no MIP, os detalhes desses cálculos para a determinação da quantidade resíduo de BFA presente no MIP está descrita na Quadro 5.1.

Quadro 5. 1- Cálculos da quantidade de resíduo de BFA presente no MIP após remoção da molécula molde

Área do pico cromatográfico (FLD)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)
- 659077	- 16,96
- 2911365	- 91,89
- 3142546	- 99,58
- Concentração média = $69,49 \mu\text{g L}^{-1}$	
- Desvio padrão = 45,62	
- %CV = 65,65%	
- Massa final de BFA presente no MIP:	
69,49 $\mu\text{g BFA}$ -----1000 mL	
X ----- 3 mL	
$X = 0,2085 \mu\text{g BFA}$ ----- 0,1500 g adsorvente MIP	
$X^? \text{-----} 1,0000 \text{ g MIP}$	
$X^? = 1,3898 \mu\text{g BFA (g MIP)}^{-1}$	
- Massa inicial de BFA presente no MIP:	
0,4566 g BFA----- 6,0806 g MIP sintetizado	
Y----- 1,0000 g MIP	
$Y = 0,07509 \text{ g BFA (g MIP)}^{-1}$	
- % BFA presente no MIP:	
0,07509 g BFA----- 100%	
$1,3898 \cdot 10^{-6} \text{ g BFA}$ ----- X	
$X = 0,0018 \text{ \% de BFA no MIP}$	

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com o valor encontrado em percentagem de resíduo de BFA presente no MIP, pode-se observar que a quantidade remanescente de BFA presente no MIP foi inferior a 1%. Conclui-se que a técnica por extração Soxhlet se mostrou bastante eficiente para a remoção da MM do MIP, mas devido à problemas de contaminação desconhecida essa remoção poderia ter sido total.

5.5. Eficiência de extração do MIP otimizado e NIP

A determinação da eficiência de extração dos 3 MIPs otimizados e NIP se procederam através do empacotamento destes adsorventes em cartuchos de EFS, conforme foi explicado na seção 4.7. Após os analitos pré-concentrados foram injetados no sistema CLAE-FLD em triplicata (n=3) para serem analisados.

A eficiência de extração dos MIPs e NIP foram determinadas pela conversão das áreas dos picos cromatográficos obtidos pelo sistema CLAE-FLD em concentração através da equação da curva analítica $y=30070,02096x + 148179,79713$. A partir, dessas concentrações do BFA para água ultrapura fortificada (n=3) foi feita a média das concentrações de cada analito pré-concentrado

detectados pelo FLD. Os resultados obtidos da eficiência de extração e o coeficiente de variação (CV) para o MIP e NIP está expresso na Tabela 5.18.

Tabela 5. 18- Valores obtidos da recuperação (%) e CV detectados por FLD

Experimentos	Área do pico	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Eficiência de extração (%)
MIP (1)	17559044	579,0107	77,20%
MIP (2)	19304367	637,0527	84,94%
MIP (3)	19892130	656,5992	87,54%
NIP (1)	17415452	574,2354	76,56%
NIP (2)	16410459	540,8137	72,11%
NIP (3)	18106031	597,2012	79,63%

Fonte: arquivo pessoal.

Os MIPs apresentaram uma eficiência de extração compreendida entre 77,20 – 87,54% com um coeficiente de variação (CV) inferior a 10%. Enquanto que, o NIP uma eficiência de extração entre 72,11 – 79,63% com um coeficiente de variação (CV) inferior a 10%. Esses valores de eficiência de extração tanto do MIP quanto do NIP estão dentro da faixa estimada na literatura de 60 a 100% (PICHON, 2007; SUN *et al.*, 2014). No entanto, o MIP apresentou ter a mesma seletividade que o NIP, para comprovar essa semelhança foi realizado alguns testes estatísticos tais como, Teste F para comparação das variâncias, teste t de *Student* para comparação das médias do MIP e NIP, respectivamente. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.19.

Tabela 5. 19- Resultados obtidos do teste F, t de *Student* entre o MIP e NIP

MIP/NIP	Teste F	Teste t <i>Student</i>
Calculado	2,02	2,30
Tabelado ($\alpha= 0,05\%$)	19,00	2,78

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo como os resultados obtidos na Tabela 5.19 pelo teste F e teste t de *Student* entre o MIP e NIP otimizados pode-se verificar que estes não apresentaram diferença significativa nas variâncias e nem nas médias, isto é, apresentaram precisões e médias iguais a um nível de confiança de 95% de probabilidade de erro.

No entanto, pelos testes estatísticos realizados pode-se observar que os valores da eficiência de extração tanto do MIP quanto do NIP foram bem próximos. Conforme pode ser explicado por

Pichon (2007) vários são os fatores que podem afetar a seletividade do MIP, tais como o solvente e o monômero funcional.

De acordo com Pichon (2007), para obter uma seletividade ótima do MIP, o procedimento de extração aplicado para uma amostra deve permitir que o analito alvo interaja especificamente com os resíduos de monômeros remanescentes nas cavidades. Estas interações não devem ser afetadas pelos compostos que constituem a amostra (íons, proteínas, etc.). Além disso, no processo de extração durante a percolação da amostra não aquosa, o analito alvo pode interagir por meio das interações específicas nas cavidades, principalmente interações hidrofílicas tais como ligações de hidrogênio e/ou interações eletrostáticas. Contudo, na etapa de lavagem é geralmente conseguido pelo mesmo solvente da síntese do MIP ou com a adição de uma pequena proporção de um modificador polar de modo a limitar as interações dos analitos alvo por interações não específicas com a superfície externa do MIP. Esses solventes tem a capacidade de recriarem as interações específicas que ocorreram durante a polimerização. E para avaliar a seletividade das interações não específicas utiliza-se um procedimento de extração em paralelo ao MIP, o NIP ausente de molécula molde. Essas interações não específicas também podem contribuir para o processo de retenção mesmo quando o analito é percolado no solvente porogênico, levando o MIP e NIP apresentaram seletividade próximas. No estudo de Pichon (2007), foi realizada uma comparação da análise cromatográfica em fase capilar gasosa de uma amostra de combustível diesel de tributil fosfato (TBP) com a análise da mesma amostra limpa num MIP desenvolvido para a extração seletiva de TBP obtendo-se uma eficiência de extração próxima de 101% para o TBP no MIP e 51,3% no NIP. A Tabela 5.20 ilustra algumas eficiências de extração (%) de analitos alvos obtidos pela técnica de extração em fase sólida com impressão molecular (MISPE) por diversos autores na literatura.

Tabela 5. 20- Eficiência de Extração (%) de alguns analitos alvos obtidos pela técnica MISPE

Analitos alvos	Eficiência de extração (%)		
	MIP	NIP	Referência
Cloridrato de amilorida (fármaco)	89,6	83,3	Peçanha <i>et al.</i> , 2013
BFA (água de torneira e rio)	~100%	<5%	Sun <i>et al.</i> , 2014.
Pesticidas Organofosforados (frutas)	91,5 a 101,0%	62,5-70%	Liang <i>et al.</i> , 2015.

Fonte: Arquivo pessoal.

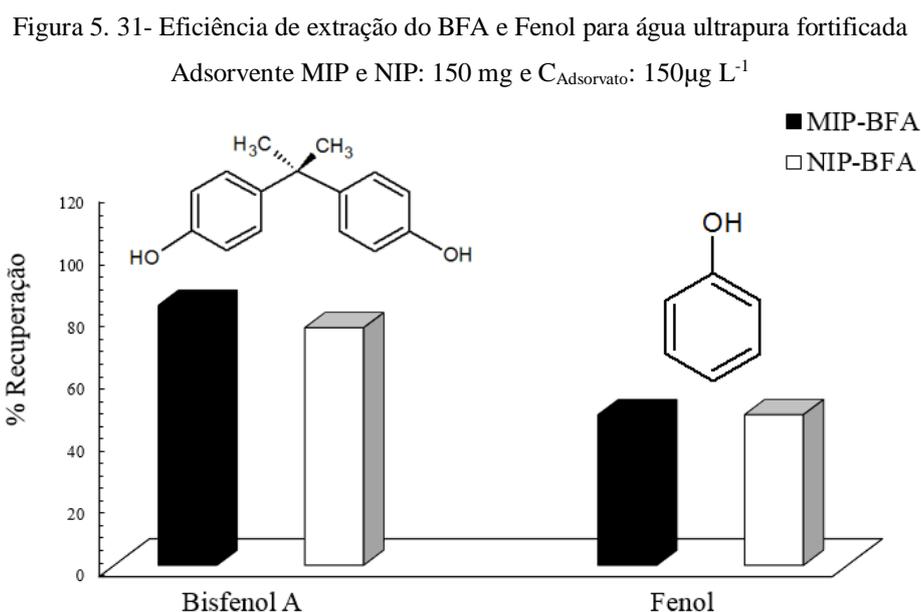
A partir desses dados na Tabela 5.20 obtidos por diversos autores na literatura, pode-se confirmar o que foi relatado anteriormente em relação ao uso do mesmo solvente da síntese na técnica

MISPE para se obter um método mais seletivo e com uma boa eficiência de extração para um determinado analito alvo pré-concentrado.

5.6. Teste da seletividade do MIP e NIP

A eficiência de extração do MIP e NIP foi comparada com o fenol que é um composto com estrutura espacial molecular similar ao BFA. Os resultados da eficiência de extração do BFA e Fenol sobre o estudo da seletividade do MIP e NIP estão ilustrados na Figura 5.31.

Pelos resultados obtidos, apesar do BFA e fenol apresentarem estruturas químicas semelhantes foi observado que o MIP apresentou uma eficiência de extração para BFA em água ultrapura fortificada maior do que para o fenol em água ultrapura fortificada, conforme mostrado na Figura 5.31. Logo, o fenol se mostrou ser seletivo para o NIP e MIP devido não apresentar sítios específico para o fenol.



Fonte: Arquivo pessoal.

O efeito da impressão molecular ou seletividade do MIP-BFA e NIP-BFA foi avaliada comparando-se o comportamento de ligação da molécula fenol com o BFA. A Tabela 5.21, mostra os valores obtidos para o coeficiente de distribuição (k_d), da seletividade (k), seletividade relativa (k') e capacidade de absorção (q).

Tabela 5. 21- Parâmetros relacionados ao efeito da impressão (q, k_d , k e k')

Compostos	Concentração inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)		q ($\mu\text{g g}^{-1}$)		k_d (L g^{-1})		K	k'
	BFA	Fenol	BFA	Fenol	BFA	Fenol	BFA/Fenol	BFA/Fenol
MIP-BFA	750	750	2,52	7,76	0,0041	0,021	0,19	0,63
NIP-BFA	750	750	3,58	7,76	0,0063	0,021	0,30	

Fonte: Arquivo pessoal.

Pelos resultados obtidos na Tabela 5.21, a capacidade de adsorção do MIP foi inferior à do NIP para o BFA, isso pode ser devido não ter formado sítios específicos no MIP durante a síntese.

O coeficiente de distribuição (k_d) indica a migração e afinidade do analito selecionado pelo adsorvente (MIP e NIP) testados. Como pode ser observado, os valores de k_d para o MIP com impressão molecular apresentou valor bem próximo do NIP, sendo a indicação de que o MIP não apresentou sítios de ligação específica para adsorção do BFA, somente seletivo para adsorção de quaisquer substâncias, como o composto fenol testado.

Pela comparação do coeficiente de seletividade (k) obtidos para os materiais poliméricos, confirma que o MIP não tem a capacidade de reconhecer os sítios específicos da substância em estudo em relação ao interferente testado, resultando em um valor de $k < 1$. E por fim, pelo coeficiente de seletividade relativa (k') usado para avaliar a eficácia da impressão química do polímero, apresentou um efeito de impressão negativo ($k' < 1$), isto é, o MIP não apresentou sítios específicos, somente, seletivo como o NIP.

Como exemplo, um estudo realizado por Ren *et al.* (2014), avaliaram quais dos contaminantes 3,3',5,5'-tetrabromobisfenol A (TBBFA), fenol e vermelho fenol (PSP) apresentava maior eficiência de remoção e seletividade para o MIP-BFA. Pelos resultados obtidos por Ren e colaboradores (2014) verificaram que o MIP-BFA apresenta uma forte seletividade para o BFA em água e os fenóis similares tiveram influência para a ligação de BFA na ordem de TBBFA > fenol > PSP.

A partir dos dados obtidos por Ren e colaboradores (2014), verificaram que o MIP-BFA para BFA apresentou uma eficiência de remoção de aproximadamente 88%, que foi maior do que para os compostos fenólicos TBBFA, fenol e PSP, respectivamente, com estruturas similares do BFA. Os autores observaram também que o MIP-BFA era específico para a molécula de BFA, mas não-específico para os outros compostos fenólicos testados, o NIP-BFA se mostrou não-específico para quaisquer substâncias. No entanto, houve um caso especial em que a taxa de remoção dos compostos fenólicos TBBFA, fenol e PSP no NIP-BFA foi maior que no MIP-BFA, isso pode ser devido a

ligação principal ocorrida nos sítios específicos existentes no MIP-BFA, enquanto que a adsorção não-específica dominou o processo de ligação no NIP-BFA.

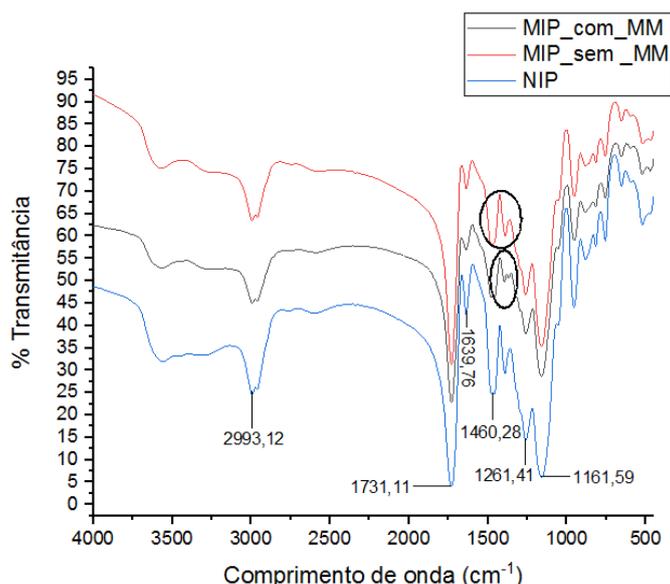
Os autores concluíram que a capacidade de ligação do MIP-BFA foi influenciada tanto pela estrutura espacial molecular quanto pela presença dos grupos hidroxilas nos compostos fenólicos, mas também pode ser influenciada pelo peso molecular de cada fenol.

5.7. Técnicas de caracterização

5.7.1. Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

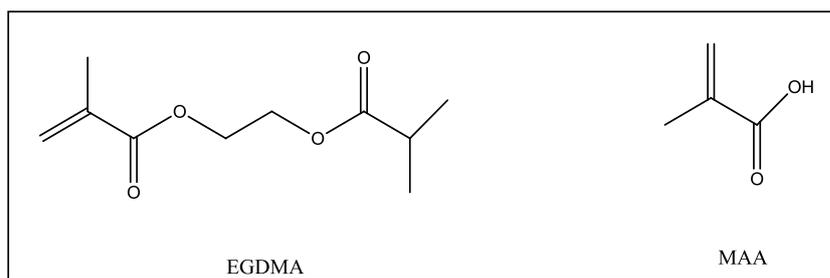
Realizou-se a análise por FTIR com pastilha de KBr dos polímeros sintetizados. Com base nos resultados apresentados na Figura 5.32, pode-se observar que no espectro FTIR obtido não é caracterizada diferença significativa entre o MIP após remoção da molécula-molde e o NIP, indicando assim que as composições químicas dos polímeros não são diferentes. Esse fato já era esperado, pois ambos os materiais foram sintetizados sob as mesmas condições, uma única diferença é a não adição da molécula molde ao polímero não impresso (NIP), mas de acordo com Peçanha *et al.* (2013), uma vez extraída a molécula molde do MIP, eles devem apresentar a mesma composição química, característicos dos monômeros MAA e EGDMA cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 5.33.

Figura 5. 32- Sobreposição do MIP antes após remoção da molécula-molde (MM) com o NIP



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 33- Estruturas químicas do EGDMA e MAA



Fonte: ChemDraw Ultra.

Na região de 1760 a 1710 cm^{-1} corresponde ao estiramento de C=O, de 1150 cm^{-1} corresponde a deformação axial C-O, de 2993,13 estiramento de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ provenientes do MAA e EGDMA. Na região de 3700-3500 cm^{-1} uma banda intensa resultante do estiramento -OH (livre) e um outra na região de 3000 cm^{-1} proveniente do -OH associado no ácido.

Pode-se observar também a ausência de bandas na região de 1600 cm^{-1} proveniente do estiramento de grupos vinila dos monômeros que desaparecerem dos polímeros durante a quebra de ligações C=C no processo de polimerização, dando origem à ligação simples.

Na Tabela 5.22 está ilustrada as principais bandas de absorção no infravermelho presentes tanto no MIP quanto no NIP.

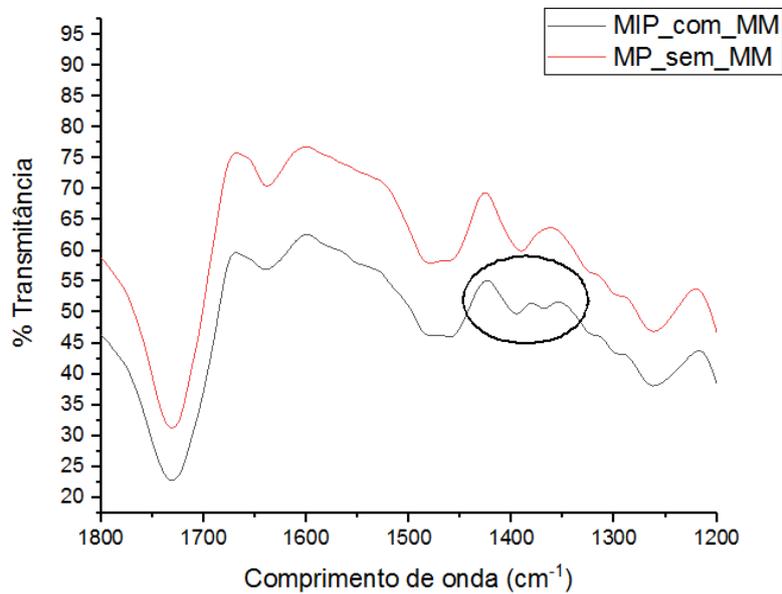
Tabela 5. 22- Atribuições das principais de bandas de absorção no espectro FTIR para o MIP e NIP

Número de onda observado (cm^{-1}): MIP e NIP	Atribuição
1639,76	Deformação angular proveniente da ligação C-OH
1460,28	Deformação axial de $-\text{CH}_3$
1760-1710	Estiramento C=O
3500-3000	Banda associada de -OH resultante do ácido carboxílico no MAA
3700-3500	Banda intensa resultante do estiramento -OH (livre)
2993,12	Estiramento de C-H assimétrico e simétrico ($-\text{CH}_2$)

Fonte: Arquivo pessoal.

Pode ser observado no espectro da Figura 5.34 relacionando o MIP antes e após a remoção da molécula molde que esta foi removida, comparando o espectro em preto em destaque que apresenta as bandas de absorção na região de 1500 a 1450 cm^{-1} característica de bandas C=C do anel aromáticos presente no BFA (Anexo A) com o espectro em vermelho também destacado que não apresenta essas bandas de absorção.

Figura 5. 34- Espectro ampliado da região de absorção no infravermelho na faixa de 1800 a 1200 cm^{-1} para o MIP antes e após a remoção da molécula-molde (MM)



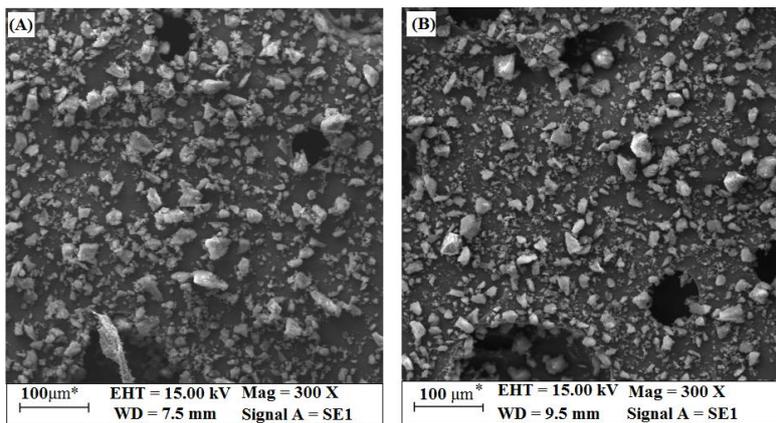
Fonte: Arquivo pessoal.

5.7.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas para o MIP antes e após a remoção da MM e para o NIP são ilustradas nas Figuras 5.35 a 5.37, respectivamente, se mostraram semelhantes. Pelas micrografias pode-se observar que a polimerização realizada no estudo levou a produção de partículas heterogêneas, irregulares e aglomeradas que de acordo com Alves (2015) é uma característica da polimerização em “bulk” ou em solução.

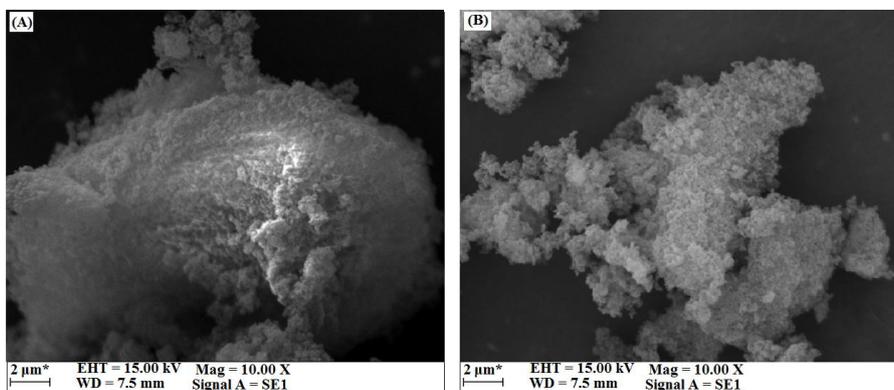
Uma observação notada, foi em relação a porosidade dos polímeros resultante dos espaços vazios irregulares localizados entre os aglomerados das microesferas (diâmetro > 50 nm).

Figura 5. 35- Micrografias do (A) MIP-BFA antes da remoção da molécula-molde; (B) NIP (Aumento de 300x)



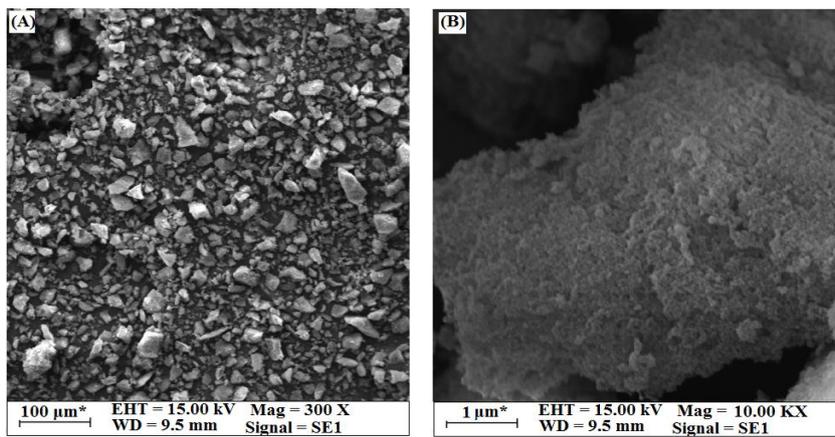
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 36- Micrografias do (A) MIP-BFA antes da remoção da molécula-molde; (B) NIP (Aumento de 10.000x)



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 37- Micrografia do MIP após remoção da molécula-molde (A): Aumento 300x; (B) Aumento 10.000x

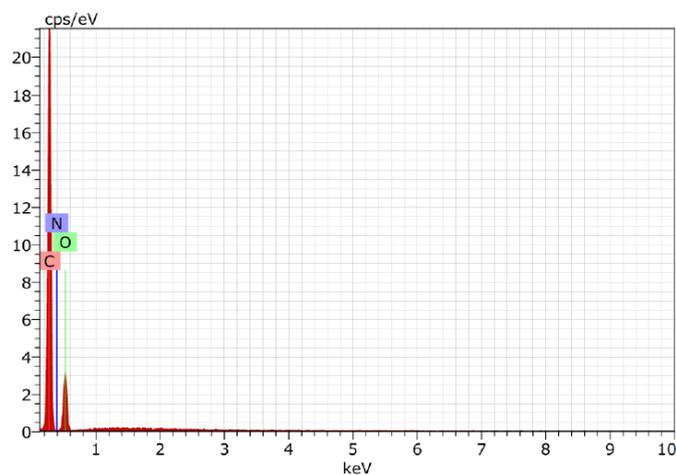


Fonte: Arquivo pessoal.

As Figuras 5.38 e 5.39 ilustram os espectros da composição química do MIP e NIP obtidos pela Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) acoplado ao MEV. Pode-se notar pelas figuras que

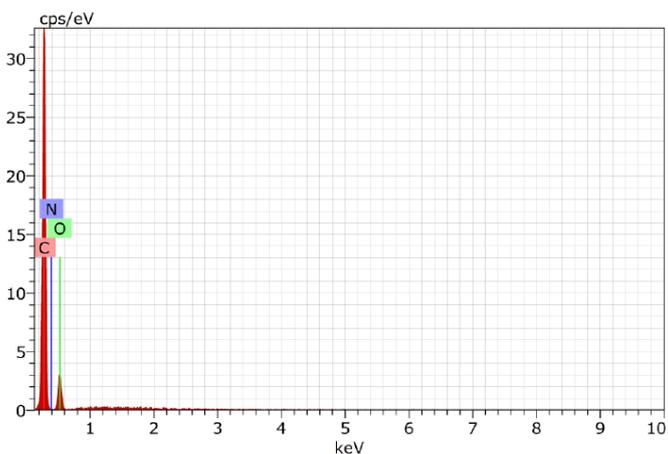
tanto o MIP como o NIP apresentam em sua estrutura química os mesmos elementos químicos C, N e O. Na Tabela 5.23 pode-se observar a quantidade de cada um desses elementos presentes nos polímeros sintetizados.

Figura 5. 38- Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) do MIP antes/após remoção da MM



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5. 39- Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) do NIP



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5. 23- Análise elemental dos elementos químicos presentes no MIP e NIP obtidos pelo EDS

Elementos químicos	MIP antes/ após remoção da MM (%)	NIP (%)
Carbono	74,18 / 73,05	79,02
Oxigênio	22,82 / 23,44	17,73
Nitrogênio	3,00 / 3,51	3,25

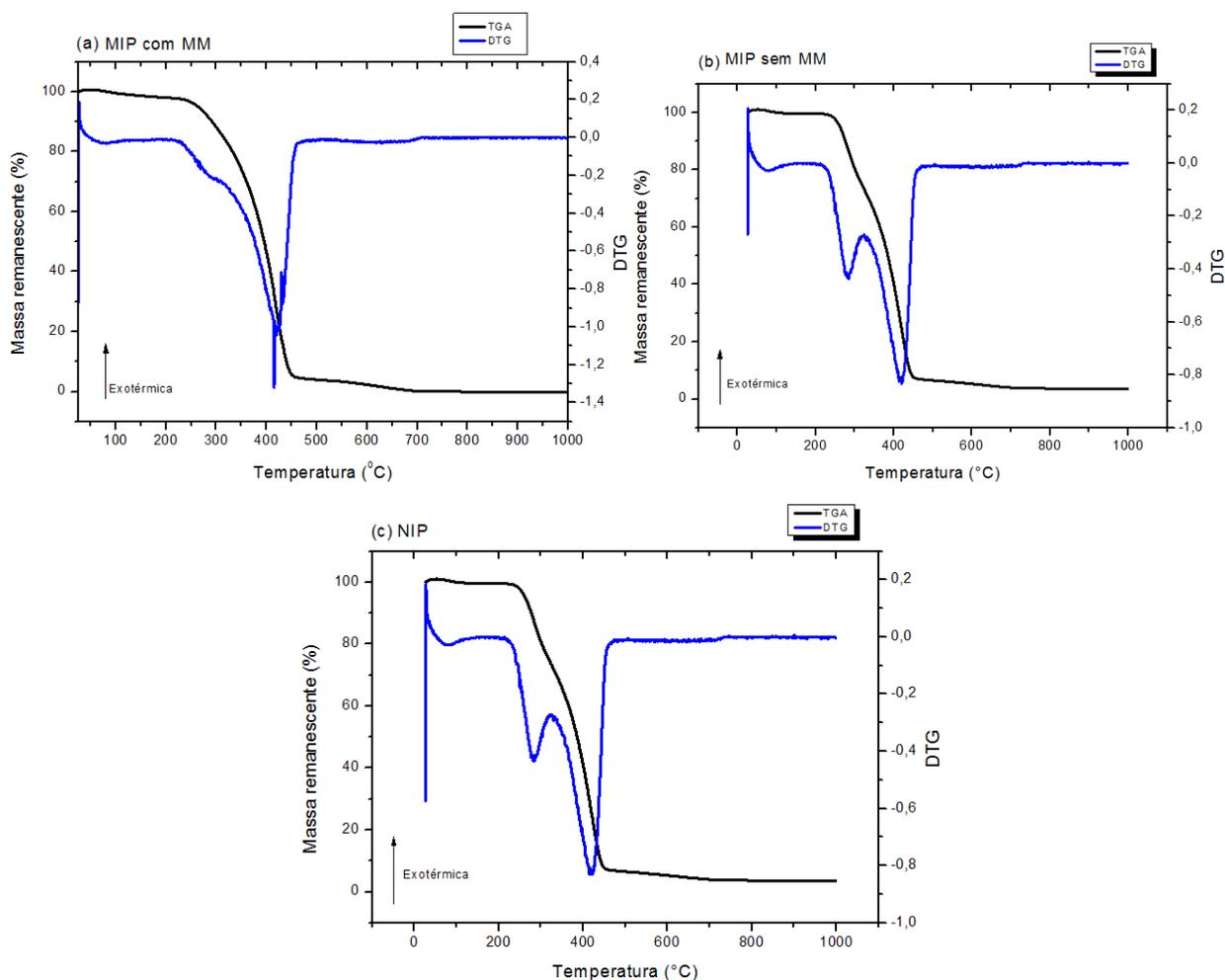
Fonte: Arquivo pessoal.

5.7.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria mede a variação de massa de uma amostra em função da temperatura e a sua curva resultante possibilita conhecer informações quanto à estabilidade térmica da amostra inicial e a composição química de algum produto intermediário formado. A DTG corresponde a primeira derivada da curva termogravimétrica (TGA), fornecendo a taxa de perda ou ganho de massa da amostra em função da temperatura.

A Figura 5.40 apresenta as análises de TGA/DTG dos materiais poliméricos antes/após a remoção da molécula molde do MIP e do NIP.

Figura 5. 40- Análise TGA/DTG dos polímeros impressos. (a) MIP antes da remoção da molécula molde (MM); (b) MIP após remoção da molécula molde (MM); (c) NIP



Fonte: Arquivo pessoal.

Pela Figura 5.40 se observa que as curvas TGA/DTG do MIP antes remoção da molécula molde começa a degradar a uma temperatura ligeiramente maior que a do MIP após remoção da

molécula molde e do NIP, conforme ilustra a Figura 5.40 (a), (b) e (c). Isto sugere que a molécula molde estabiliza os agentes de degradação (radical livre), começando a degradação do MIP a uma temperatura de aproximadamente 222°C, conforme mostra a Tabela 5.24 do MIP antes remoção da molécula molde.

Tabela 5. 24- Perda de massa (%) do MIP com molécula molde em função da temperatura

Faixa de degradação (°C)	Temperatura do pico (°C)	Perda de massa (%)	Atributo
60-222	70	2	Solvente
222-332	284	24	MIP
332-470	421	70	MIP e BFA
470-725	-	4	Compostos estáveis
-	-	0	Resíduos não degradado

Fonte: Arquivo pessoal.

Enquanto que no gráfico da curva de TGA/DTG na Figura 5.40 (b) e (c) o MIP após remoção da molécula molde e NIP começaram a degradar à uma temperatura de aproximadamente 200 °C. Na faixa de degradação de 200-323°C e 323-480°C pode ser observado uma perda de massa da cadeia polimérica do MIP e NIP, conforme mostra a Tabela 5.25.

Tabela 5. 25- Perda de massa (%) do MIP sem molécula molde e NIP em função da temperatura

Faixa de degradação (°C)	Temperatura do pico (°C)	Perda de massa (%)	Atributo
60-200	77	1	Solvente
200-323	283	27	MIP
323-480	417	65	MIP
480-725	-	4	Compostos estáveis
-	-	3	Resíduos não degradado

Fonte: Arquivo pessoal.

Ainda em relação a Figura 5.40 se observa que o MIP antes da remoção da molécula molde (a) apresenta um perfil de degradação diferente da curva do MIP após remoção da molécula molde (b). Isto sugere que a rede polimérica desses dois seja diferente. No entanto, a curva de TGA/DTG para o MIP após remoção da molécula-molde (b) e NIP (c) não apresentam diferença significativa.

Sendo que na maioria dos artigos de pesquisa o TG é utilizado para fins de comparação da estabilidade térmica entre partículas MIP e NIP. No estudo realizado por Abouzarzadeh *et al.* (2012), foi sintetizado e avaliado as propriedades térmicas de nanoesferas de polímero de impressão molecular para a detecção de ácido nalidíxico por meio da técnica de DSC, utilizando-se uma razão

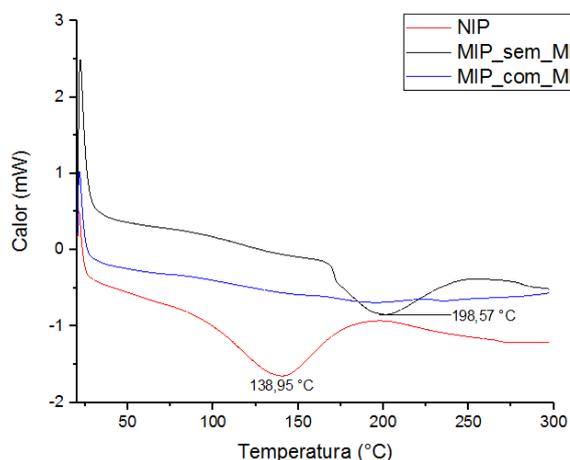
de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ com uma programação de aquecimento de $20\text{-}470^{\circ}\text{C}$. Pelos resultados obtidos, Abouzarzadeh e colaboradores verificaram que o NIP (1), MIP (1) não lixiviados (com molécula-molde) e lixiviados (sem molécula-molde) para detecção do fármaco ácido nalidíxico foram termicamente estáveis até a temperatura de 270°C , a partir desta temperatura se iniciou o processo de degradação de todo o complexo. O NIP (1) e o MIP (1) lixiviado apresentaram faixa de degradação similar. Foi observado também uma transição endotérmica à 225°C no MIP (1) não lixiviado isso foi devido ao fármaco ácido nalidíxico (temperatura de fusão = 225°C) ter fundido durante o carregamento neste polímero. A partir disso, concluíram que o MIP (1) lixiviado após remoção da molécula-molde apresentou-se a mesma composição química do NIP (1).

5.7.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Um material analisado por DSC é aquecido e resfriado em vários ciclos consecutivos de modo a medir a variação de calor do referido material em função da temperatura obtendo uma curva resultante da temperatura de fusão, de cristalização ou de transição vítrea (CANAVEROLO, 2003). A partir dessa curva de DSC podemos obter informações importantes sobre as características dos polímeros em estudo.

A Figura 5.41 apresenta a curva resultante da análise por DSC dos materiais poliméricos MIP e NIP. Pela curva DSC pode-se observar que houve somente perda de solvente, devido à realização de somente uma varredura. Desse modo, não foi possível obter informações sobre a temperatura de fusão, de cristalização ou de transição vítrea dos polímeros em estudo.

Figura 5. 41- Análise de DSC dos polímeros impresso e não impresso. (a) MIP antes da remoção da molécula molde (MM); (b) MIP após remoção da molécula-molde (MM); (c) NIP



Fonte: Arquivo pessoal.

No entanto, alguns estudos citados na literatura mostram que a técnica por DSC para MIP e NIP são semelhantes, mas em outros estudos dizem o contrário, que a técnica por DSC para MIP e NIP apresentam diferença, permitindo que esta seja aplicada como prova para verificação de impressão molecular.

5.7.5. Análise de tamanho de partículas

No presente trabalho a difração por laser foi utilizada para medir a distribuição de tamanho de partícula nos materiais poliméricos MIP e NIP. Essa técnica fornece informações sobre os dados de distribuição de tamanho e volume da partícula.

A Tabela 5.26 mostra as diferentes distribuições de tamanhos das partículas de MIP e NIP obtidas pelo sistema de difração por laser.

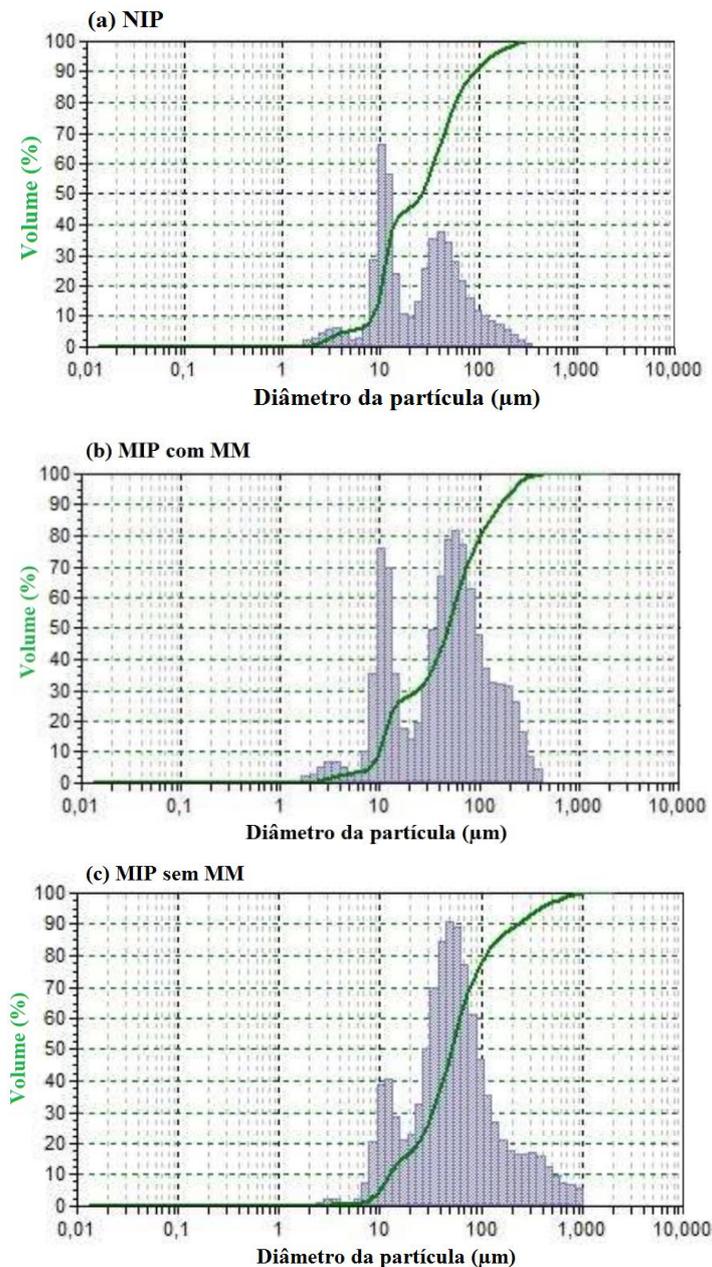
Tabela 5. 26- Distribuição das partículas de MIP e NIP

Diâmetro médio (μm)	Polímero
501	MIP: sem MM
200	MIP: com MM
175	NIP

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 5.42 estão ilustrados os gráficos resultante da análise por DLS para a determinação do tamanho e distribuição das partículas nos polímeros impresso e não impresso MIP e NIP. Pode-se observar pelos gráficos que o NIP apresentou tamanho de partículas numa faixa de 1,5 a 350 μm , o MIP antes da remoção da molécula molde tamanho de partículas entre 1,5 a 400 μm e o MIP após remoção da molécula molde entre 3 a 1000 μm .

Figura 5. 42- Gráfico de distribuição de tamanho de poros para caracterização de tamanho do NIP (a); MIP com MM (b); MIP sem MM (c)



Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com esses valores os polímeros MIP e NIP obtidos pelo sistema de DLS podemos classificá-los conforme a distribuição de diâmetro dos poros em microporos (600 a 2000 nm) (BARBOSA; SOUSA, 2009).

Para validar se esses resultados obtidos pelo sistema DLS estão dentro do esperado foi realizado a microscopia eletrônica por varredura (MEV) para visualização das imagens dos polímeros

MIP e NIP, conforme foi mostrado na seção 5.7.2. E pelos resultados pode-se confirmar que o sistema DLS está dentro da faixa estimada para a distribuição do tamanho de partículas dos polímeros em estudo.

Em um estudo realizado por Lenain *et al.* (2012), foi avaliado a distribuição e o tamanho de partículas de MIP com metergolina um alcaloide de Ergot como molécula-molde para aplicação como adsorvente em EFS. Para medir a distribuição e o tamanho das partículas foi utilizado um sistema de difração a laser (DLS).

Os resultados obtidos por Lenain e colaboradores (2012), mostraram que 80% das partículas impressas de MIP estavam situadas na faixa de 12-58 μm com um diâmetro médio de aproximadamente 30 μm , enquanto que, 80% das partículas de NIP apresentaram diâmetro médio de 45 μm uma faixa de 21-45 μm .

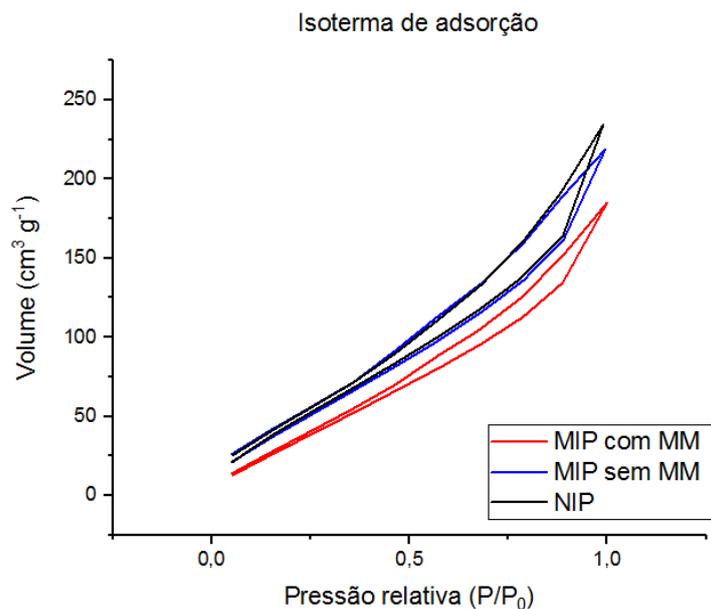
Para validar esses resultados obtidos pelo sistema de difração por laser (DLS), Lenain e colaboradores (2012) utilizaram a técnica de microscopia eletrônica por varredura (MEV) para a visualização dos polímeros. E pelas imagens obtidas pelo MEV observaram que as partículas de MIP e NIP apresentaram tamanhos esféricos e uniformes. Logo, pelas medições do diâmetro das partículas nas imagens do MEV confirmaram que os resultados obtidos pelo DLS estavam dentro da faixa esperada.

5.7.6. Área superficial e porosidade

A área específica superficial, volume dos poros e a distribuição de tamanho foram calculados usando o modelo padrão *Brunauer-Emmett-Teller* (B.E.T) e a teoria de *Barrett-Joyner-Halenda* (BJH), respectivamente.

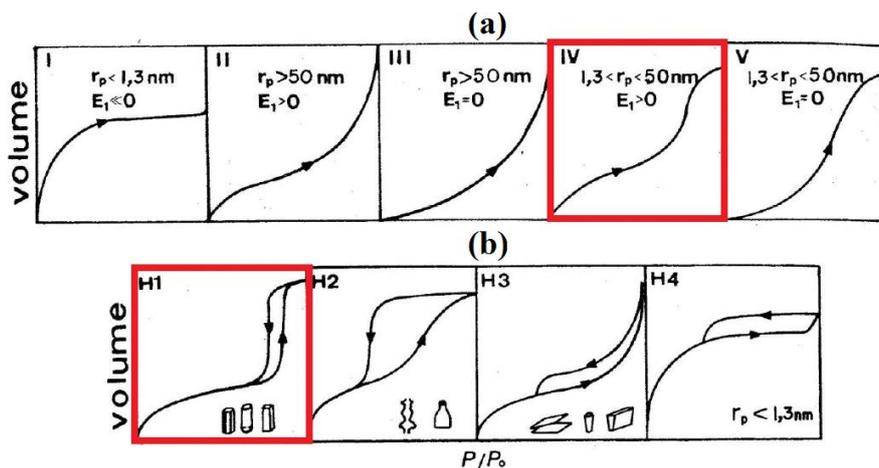
Ambos materiais sintetizados MIP e NIP apresentaram isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio do tipo IV e histerese H1, a qual está associado com a condensação do vapor (gás) que ocorre a uma pressão (P) inferior a pressão de saturação (P_0) devido ao raio de curvatura (r) do capilar, conforme mostra a Figura 5.43 das curvas da isoterma de adsorção do MIP antes e após a remoção da molécula-molde do e NIP sobrepostas.

Figura 5. 43- Curva da isoterma de adsorção/dessorção do MIP e NIP sobrepostos



A Figura 5.44 ilustra a classificação dos tipos de isothermas de adsorção/dessorção em sólidos contendo poros de raio (r) e energia de adsorção E_1 e os tipos de histereses de adsorção/dessorção.

Figura 5. 44- (a) Classificação das isothermas de adsorção/dessorção em sólidos contendo poros de raio (r) e energia de adsorção (E_1) no intervalo indicado. (b) Tipos de histerese de adsorção/dessorção em sólidos com poros de morfologia distintas



A área superficial específica obtida pelo método B.E.T (método por regressão linear) para o MIP antes e após a remoção da MM foi $173,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e $201,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ com um volume de poros total de $0,04 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ e $0,05 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Enquanto que, para o NIP foi a área superficial específica foi de $235,3$

$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ com um volume de poros total de $0,06 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Também, foi encontrado a distribuição de tamanho dos poros em relação ao diâmetro do MIP-BFA antes e após a remoção da MM de 9,24 nm e 9,93 nm. E para o NIP o valor encontrado foi de 12 nm.

Esses valores estão dentro do previsto pela literatura com uma área específica compreendida entre 100 a $400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. E pelos resultados obtidos pode-se concluir que o MIP e NIP apresentam áreas superficiais bem significativas, porém, no entanto o NIP apresentou uma área superficial específica superior ao MIP, isso quer dizer que os fatores (tempo de reação, solvente e agitação magnética) variado no processo de síntese não se mostrou sucinto para obtenção dos sítios específicos no MIP. E em relação a distribuição de diâmetro dos poros, os valores obtidos para o MIP e NIP também estão dentro do previsto pela literatura com valores compreendidos entre 2 a 50 nm para mesoporosos (SOUSA; BARBOSA, 2009).

Em um estudo realizado por Abouzarzadeh *et al.* (2012), foi determinado a porosidade das microesferas dos MIPs para ácido nalidíxico por meio da análise de adsorção/dessorção de nitrogênio pelo método BET.

Pelos resultados, Abouzarzadeh e colaboradores concluíram que quando o tamanho das partículas diminui, ocorre um aumento da área superficial específica, que neste estudo foi o MIP (3), logo este apresenta cavidades específica acessíveis para o ácido nalidíxico.

Em um outro estudo realizado por Saavedra (2017), foi sintetizado 12 materiais poliméricos (MIP e NIP) pelo método em “bulk” utilizando quinolina como molécula-molde, ácido metacrílico (MAA) como monômero funcional, etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) como agente de ligação cruzada, 2-2'-azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador radicalar, e tolueno ou clorofórmio como solventes porogênicos. Também, foram sintetizados polímeros magnéticos adicionando nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Para determinar a porosidade e área superficial específica dos materiais poliméricos sintetizados foi realizado a análise por adsorção/dessorção com N_2 pelo método BET.

Os resultados obtidos por Saavedra (2017) mostram que o MMIP-4.2 apresentou uma maior área superficial específica de $263,65 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, seguido do MIP-5.2 com $205,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e do MMIP-6.2 com $190,41 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Os MMIP-4.2 e MMIP-6.2 foram sintetizados na presença de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que permitiu um maior desenvolvimento da área superficial em relação aos outros materiais poliméricos sintetizados, ressaltando que os solventes tolueno e clorofórmio também influenciou na área superficial dos polímeros sintetizados. Isto é, quanto os polímeros foram sintetizados usando

clorofórmio como solvente estes apresentaram uma maior área superficial para os NIPs, enquanto que, o solvente tolueno apresentou-se uma maior área superficial para os MIPs.

Uma outra observação feita por Saavedra (2017) foi que o MIP-1.2 apresentou-se menor área superficial ($41,75 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) comparado com os outros polímeros sintetizados, isso pode ser devido aos parâmetros de síntese (temperatura, solventes, reagentes) não terem sido convenientes para gerar as interações correspondentes, afetando o desenvolvimento superficial do material.

E por fim, Saavedra (2017) considerou-se que todos os polímeros sintetizados eram adsorventes mesoporosos com diâmetro médio na faixa de 2 a 50 nm.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, foi proposto a síntese e estudo de um polímero de impressão molecular para extração em fase sólida de BFA em águas. Os resultados obtidos, mostraram que tanto o MIP quanto o NIP apresentaram ser seletivo para a remoção de BFA.

A validação analítica do método cromatográfico a partir das figuras demérito se mostrou adequado para a determinação de BFA usando detector por fluorescência. O método apresentou boa seletividade para o BFA ($T_R = 5,60$ min), boa linearidade ($R^2=0,99982$), garantiu uma boa repetibilidade dos ensaios a um nível de confiança de 5% de probabilidade de erro (CV entre 2,52-3,01% para $n=10$), uma boa exatidão (CV inferior a 1%); LD e LQ exibiu valores de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente; e por fim, o método se mostrou robusto frente à pequenas variações de 5% em alguns parâmetro cromatográficos (composição da FM, vazão da FM, temperatura da coluna e injeção da amostra na CLAE) estudados com CV entre 0,80-5,01%.

Em relação a otimização do processo de síntese do MIP, o modelo Box-Behnken, permitiu estudar 3 fatores (tempo de reação, tipo de solvente e agitação magnética) codificados em 3 níveis ao mesmo tempo, gerando 15 experimentos aleatórios, fornecendo gráficos de superfícies de resposta e de contorno para a determinação das condições ótimas de síntese do MIP, que foi: tempo de reação de 3 horas, solvente clorofórmio e agitação magnética de 500 rpm.

A síntese do MIP e NIP otimizada foi realizada conforme planejada e esperada, pois o produto obtido apresentou-se características típicas de síntese via polimerização em *bulk*. Além disso, os resultados obtidos por meio das técnicas de FTIR com pastilha de KBr, MEV, TGA/DTG e DSC, Analisador de área superficial e porosidade foram bem coerentes para os polímeros MIP e NIP.

Por meio da técnica FTIR com pastilha de KBr foi possível identificar as principais bandas de absorção no infravermelho características dos grupos químicos presentes no MIP antes e após remoção da molécula molde e NIP. Por meio da técnica MEV foi possível observar a semelhança entre o MIP após remoção da molécula molde e NIP, a formação de partículas heterogêneas e irregulares destes que é uma característica da polimerização em *bulk*, além disso também se observou a formação de poros resultante dos espaços vazios irregulares localizados entre os aglomerados das partículas. Por meio da técnica de área superficial e porosidade, mediu-se a área específica superficial e a distribuição de tamanho dos poros do MIP antes e após remoção da molécula molde e NIP que se mostraram ser bem significativa, mas estão dentro do previsto pela literatura. Pela técnica por TGA/DTG e DSC os polímeros MIP após remoção da molécula molde e NIP foram praticamente

idênticos. E por fim, pela técnica da análise do tamanho dos polímeros por DLS, o MIP e NIP também se mostraram diferença significativa.

No estudo da eficiência de extração aplicando a técnica de extração em fase sólida utilizando-se o MIP e NIP como adsorvente, o MIP apresentou-se uma eficiência de extração entre 77 a 87% de BFA para água ultrapura fortificada. Enquanto que, o NIP conforme previsto na literatura apresentou-se uma eficiência de extração inferior ao do MIP entre 72 a 76% de BFA para água ultrapura fortificada. Logo, o MIP como previsto apresentou-se ser seletivo e específico do que o NIP, esse fato pode ser explicado pela presença de sítios seletivos complementar a molécula molde para retenção de um analito alvo.

Também foi verificada a seletividade do MIP e NIP para isto utilizou-se o composto fenol que apresenta estrutura semelhante ao BFA. Pelos resultados obtidos verificou-se que o fenol apresentou ser seletivo para o MIP e NIP com uma eficiência de extração de 48,20 e 48,25%.

De um modo geral, o polímero de impressão molecular pode ser considerado como uma alternativa de adsorvente para a extração de contaminantes emergentes encontrados no ambiente em concentração traços como o BFA, uma vez que o mesmo apresentou uma boa eficiência de extração, sem a necessidade de passar por uma etapa prévia de tratamento de amostra, o que levaria a um processo de baixo custo, menor tempo de análise, menor gasto de solvente orgânico e dentre outros.

Como perspectiva:

- Testar novos métodos de processo síntese do MIP, variando tipos ou quantidade de monômeros funcionais, agente de ligação cruzada, molécula-molde para avaliar qual destes apresenta uma melhor reprodutibilidade de preparo;

- Aplicar o MIP como fase estacionária em colunas cromatográficas e comparar com o MIP utilizado como adsorvente em cartucho para extração em fase sólida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUZARZADEH, A. *et al.* *Synthesis and evaluation of uniformly sized nalidixic acid-imprinted nanospheres based on precipitation polymerization method for analytical and biomedical applications.* **Journal of Molecular Recognition**, vol.25, p.404-413, 2012.
- AKCELRUD, L. *Estrutura e Propriedades.* In: Fundamentos da Ciência dos Polímeros. Barueri, SP: Editora MANOLE, ed.1, cap.1, p.1-46, 2007.
- ALVES, L. T. O. *Síntese e Caracterização de MIP a partir da Fenilalanina visando sua aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida (Dissertação).* Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 105p, 2015.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* *Validação de métodos analíticos: uma breve revisão.* **Caderno de Pesquisa**, Vol. 12, n.º. 1/2, p. 116-131, 2001.
- ANDERSSON, L. I. *Molecular imprinting: developments and applications in the Analytical Chemistry field.* **Journal of Chromatography B**, vol. 745, p. 3-13, 2000.
- ANSARI, S.; KARIMI M. *Novel developments and trends of Analytical methods for drug Analysis in biological and environmental samples by molecularly imprinted polymers.* **Trends in Analytical Chemistry**, vol.89, p.146-162, 2017.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: **Resolução RDC n.º17/2008, Resolução RE n.º 105/1999 e Resolução RDC n.º 41/2011.**
- ANVISA EURACHEM. *Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation.* **Agência de Vigilância Sanitária**, Vol.1, ed.1, 77p., 2004.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. *Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura.* **Engenharia Sanitária**, Rio de Janeiro, v. 18, n.3, p. 187-204, 2013.
- ARISTIAWAN, Y. *et al.* *Analytical method development for Bisphenol A in Tuna by using High Performance Liquid Chromatography-UV.* **Procedia Chemistry**, Vol.16, p.202-208, 2015.
- ARSHADY, R.; MOSBACH, M. *Synthesis of substrate selective polymers by host-guest polymerization.* **Macromolecular Chemistry and Physics**, vol.182, n.º.2, p. 687-692, 1981.
- AUGUSTO, F. *et al.* *new sorbents for extraction and microextraction techniques.* **Journal of Chromatography A**, vol.1217, p. 2533-25432, 2010.
- BALLESTEROS GÓMEZ, A.; RUBIO, S.; PÉREZ BENDITO, D. *Analytical methods for the determination of bisphenol A in food.* **Journal of Chromatography A**, 1216, p.449-469, 2009.
- BARROS, L. A.; MARTINS, I.; RATH, S. *A selective molecularly imprinted polymer-solid phase extraction for the Determination of fenitrothion in tomatoes.* **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 397, p. 1355-1361, 2010.
- BARROS NETO, B. *et al.* *25 anos de Quimiometria no Brasil.* **Química Nova**, vol.29, N.º6, p.1401-1406, 2006.
- BAYRAMOGLU, G. *et al.* *Removal of Bisphenol A from aqueous medium using molecularly surface imprinted microbeads.* **Chemosphere**, 150, p. 275-284, 2016.
- BEDWELL, T. S; WHITCOMBE, M. J. *Analytical applications of MIPs in diagnostic assays: future perspectives.* **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 408, p. 1735-1751, 2016.
- BELTRAN, A.; BORRULL, F.; CORMACK, P. A. G.; MARCÉ R. M. *Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions.* **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 29, p. 1363-1375, 2010.
- BERALDO, D. A. S. *Dissertação: Desenvolvimento de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP.* Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. *Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências*. Química Nova, [s.l.], v. 30, n. 3, p.651-666, jun. 2007.
- BITAR, M.; CAYOT P.; BOU MAROUN, E. *Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction of fungicides from wines samples*. **Analytical Methods**, vol. 6, p. 6467-6472, 2014.
- BORGES, K. B.; PEREIRA, A. C.; MANO, V. *Introdução ao preparo de amostras*. In: *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 1, p. 2-8, 2015.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). *Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários* – Brasília, DF, 72p., 2011.
- BRITO, N. M. *et al.* *Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação*. **Pesticidas: R. Ecotoxicológico e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.
- BRITO, N. M. *et al.* *Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão*. **Pesticidas: R. Ecotoxicológico e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.
- CALAFAT, A.M. *Urinary Concentrations of Triclosan in the U.S. Population: 2003-2004*. **Environmental Health Perspectives**, vol.116, n.º3, p.303-307, 2008.
- CALDAS, S. S. *et al.* *Principais Técnicas de Preparo de Amostra para a Determinação de Resíduos Agrotóxicos em Água por Cromatografia líquida com detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas*. **Química Nova**, Vol. 34, n° 9, p. 1604-1617, 2011.
- CANEVAROLO, S. V. Jr. *Técnicas de caracterização de polímeros*- Artliber Editora Ltda-São Paulo, 2003.
- CHEN, L. *et al.* *Molecular imprinting: Perspectives and Applications*. **Chemistry Society Review**, Vol. 45, p.2137-2211, 2016.
- CHEN, Y. *et al.* *Review: Sample preparation*. **Journal of Chromatography A**, China, Vol. 1184, p. 191-219, 2008.
- COLLINS, C. H. *Princípios básicos de cromatografia*. In: *Fundamentos de Cromatografia*. 6.ed. Campinas, SP: Editora UNICAMP, cap.1, p.17-30, 2006.
- COLLINS, C. H. *et al.* *Cromatografia líquida de Alta eficiência*. In: *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 6.ed., cap.9, p.273-398, 2006.
- COLLINS, C. H.; SILVA, G. A. *Aplicação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes*. **Química Nova**, vol.34, N°4, p.665-676, 2011.
- COMARCK, P. A. G.; ELORZA, A. Z. *Molecularly Imprinted Polymers: synthesis and characterization*. **Journal of Chromatography B**, 804, p. 173-182, 2004.
- CORRALES, J. *et al.* *Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its occurrence and Bioaccumulation*. **Dose-Response: An International Journal**, EUA, Vol. 13, N°3, p. 1-29, 2015.
- DÁAS, A.; HAMD AOUI, O. *Extraction of bisphenol A from aqueous solutions by emulsion liquid membrane*. **Journal of Membrane Science**, n°348, p. 360-368, 2010.
- DABROWSKI, A. *Adsorption from theory to practice*. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol.98, p. 135-224. out. 2001.
- DEKANT, W. & VOLKEL W. *Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environment exposures*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Vol. 228, p.114-134, 2008.
- DIAS, C. L. P. *et al.* *Utilização de reagentes auxiliares na filtragem*. Rem: Revista Escola de Minas, vol. 57, n°4, p.221-234, dez. 2004.
- DICKEY, F. H. *The preparation of specific adsorbents*. **Proceedings of the National Academy of Science.**, vol.35, n° 5, p.227-229, 1949.

EFSA - European Food Safety Authority. *Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A*, Itália, 2010.

ESTEBAN, A. M. *Recent Molecularly Imprinted polymer- based sample preparation techniques in Environmental Analysis*. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, Vol. 9, p.8-14, 2016.

ESTEBAN, A. M. *Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation*. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 45, p. 169-181, 2013.

EURACHEM GUIDE. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**, 2 ed., 70p. Europa, 2014.

FACHIN, P. *Contaminantes Emergentes na água: “A cada ano temos mais de mil novas substâncias sendo introduzidas no nosso dia a dia”*. Entrevista com Wilson Jardim. Instituto Humanitas Unisinos, São Leopoldo, RS, 2014.

FEITEIRA, D. M.; DUARTE, J. R. C.; LEAL, M. A. R. *Bisfenol A*, 2015. Disponível em: <<http://bisfenola.wixsite.com/bisfenol-a>>. Acesso em: 04 de agosto de 2017.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. *Impressão Molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para liberação controlada de fármacos*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (RBCF)**, Vol. 44, n° 3, jul. /Set, 2008.

FIGUEIREDO, L.; ERNY, G. L.; SANTOS, L.; ALVES, A. *Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review*. **Talanta**, vol. 146, p.754–765, 2016.

FERREIRA, S. L. C. *et al. Box-Behnken Design: Na alternative for the optimization of analytical methods*. **Analytica Chimica Acta**, vol.597, p.179-186, 2007.

FERREIRA, S. L. C. *et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems*. **Analytica Chimica Acta**, vol.1158, p.2-14, 2007.

FONSECA, M. C.; NASCIMENTO, C. S.; BORGES, K. B. *Theoretical investigation on functional monomer and solvent selection for molecular imprinting of tramadol*. *Chemical Physics Letters*, vol. 645, p.174-179, fev. 2016.

FROMME, H. *et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment*. *Water Research*, v. 36, n. 6, p.1429-1438, 2002.

GARCÍA PRIETO, A. *et al. Determination of Urinary Bisphenol A by Coacervative Microextraction and Liquid Chromatography–Fluorescence Detection*. **Analytica Chimica Acta**, vol. 630, n°1, p.19-27, dez.2008.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. *Interferentes endócrinos no ambiente*. *Química Nova*, vol. 30, n° 3, p.695-706, jun. 2007.

GOYAL, R. K.; JAYAKUMAR, N. S.; HASHIM, M. A. *A comparative study of experimental optimization and response surface optimization of Cr removal by emulsion ionic liquid membrane*, vol.195, p.383-390, 2010.

GRITTI, F.; GUIOCHON, G. *New thermodynamically consistent competitive adsorption isotherm in RPLC*. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 264, n°. 1, p.43-59, ago. 2003.

GUELF, L. R.; SCHEER, A. P. *Estudo de adsorção para purificação e separação de misturas na indústria petrolífera*. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 44p.,2007.

GUIA PARA QUALIDADE EM QUÍMICA ANALÍTICA: UMA ASSISTÊNCIA A ACREDITAÇÃO = *Guide to Quality in Analytical: na Aid to Accreditation*. **ANVISA**: São Paulo, Vol. 1, 80p., 2004.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. *Introdução às Separações Cromatográficas*. In: *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman, ed. 6, 2009. p. 776-801.

- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. *Cromatografia Líquida*. In: Princípios de Análise Instrumental. Porto Alegre: Bookman, ed. 6, 2009. p. 830-869.
- HUANG, Y. Q. *et al.* *Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts*. **Environment International**, Hong Kong, Vol. 42, p. 91-99, May. 2012.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008, fevereiro de 2010.
- IPCS - International Programme on Chemical Safety, *Global assessment of the state-of-the science of endocrine disruptors*, **WHO – World Health Organization**, 2017.
- JARDIM, I. C. S. F. *Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas*. **Scientia Chromatographica**, vol.2, N°1, p.13-25, 2010.
- JARDIM, I. C. S. F. *Princípio da extração em fase sólida*. In: *Introdução ao preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 8, p. 62-79, 2015.
- JARDIM, W. *Água de 20 capitais tem 'contaminantes emergentes'*. **Jornal da Unicamp**, n°576, 2013.
- KHORRAMI, A. R.; MEHRSERESHT, S. *Synthesis and evaluation of a selective molecularly imprinted polymer for the contraceptive drug levonorgestrel*. **Journal of Chromatography B**, Vol.867, p. 264-269, 2008.
- LANÇAS, F. M. *Avanços recentes e tendências futuras das técnicas de separação: uma visão pessoal*. **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v.0, n.0, 2008.
- LENAIN, P. *et al.* *Development of Suspension Polymerized Molecularly Imprinted Beads with Metergoline as Template and Application in a Solid-Phase Extraction Procedure toward Ergot Alkaloids*. **Analytical Chemistry**, vol.84, p.10411-10418,2012
- LIANG, L. *et al.* *Occurrence of Bisphenol A in surface and drinking waters and its physicochemical removal technologies*. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, China, vol. 9, n°1, p.16-38, 2015.
- LIN, Z. *et al.* *Preparation of magnetic multi-functional molecularly imprinted polymer beads for determining environmental estrogens in water samples*. **Journal of Hazardous Materials**, vol.252-253, p. 57-63, 2013.
- LOFFREDO, E. *et al.* *Potential of various herbaceous species to remove the endocrine disruptor*. **Chemosphere**, vol.80, p.1274-1280, 2010.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. *Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. **Talanta**, vol. 100, p.38-44, 2012.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. *Introdução a Polímeros*. 2.ed. revista ampliada-São Paulo: Edgard Blucher, 208p., 2004.
- MIDDELEER, G.; DUBRUEL, P.; SAEGER, S. *Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current state-of-the-art*. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 76, p.71-85, fev. 2016.
- MIDORO HORIUTI, T.; GOLDBLUM, R. M. *The effects of early low dose exposures to the Environmental Estrogen Bisphenol A on the Development of Childhood Asthma*. *Archives of Asthma, Allergy and Immunology*, vol. 1, p.15-27, Jul. 2017.
- NETO, A. J. S.; LOPES, B. R.; CASS, Q. B. *Preparo de amostras empregando meios de acesso restrito (RAM)*. In: *Introdução ao preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 11, p. 97-105, 2015.
- NOVAIS, A. S. *et al.* *Novo sorvente de hidrofobicidade reduzida para extração em fase sólida: preparação e caracterização*. **Química Nova**, v.38, N°2, p.274-279, 2015.

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. In: *Introdução ao preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC, cap.4, p.19-27, 2015.

PÁDUA, V. L. *et al.* Água: Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. Rio de Janeiro: Abes, 394 p., 2009.

PAULING, L. J. A Theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, vol.62, n°.10, p.2643-2657, 1940.

PEÇANHA, B. R. B. *et al.* Polímeros de impressão molecular obtidos através de polimerização por precipitação e sua aplicação na técnica de extração em fase sólida. **Polímeros**, p.1-5, 2013.

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

PETROVIC, M. *et al.* Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol.378, p.549-562, 2004.

PETRI, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK, B. H. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, Vol. 72, p.3-27, 2015.

PICHON, V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, vol.1152, p. 41-53, 2007.

PIETRO, A. G. *et al.* Determination of Urinary Bisphenol A by Coacervative Microextraction and Liquid Chromatography–Fluorescence Detection. **Analytica Chimica Acta**, Vol. 630, p.19-27, 2008.

POLYCARBONATE/BPA GLOBAL GROUP. About Bisphenol-A >> Information Sheets. Disponível em: <<http://www.bisphenol-a.org/about/bpa-info/bpa-synthesis.html>>. Acesso em: 23/08/2016.

QUINÁGLIA, G. A. *et al.* Investigação da atividade estrogênica em águas subterrâneas do Estado de São Paulo. **Águas Subterrâneas**, vol. 31, n°. 1, p.79-87, 10 jan. 2017.

RAIMUNDO, C. C. M. Tese (doutorado): Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica-Universidade Estadual de Campinas, SP, 2011.

RAJASÄRKKÄ, J. *et al.* Monitoring bisphenol A and estrogenic chemicals in thermal paper with yeast-based bioreporter assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, vol.406, p.5695–5702, mai.2014.

RATH, S. *et al.* Considerações e implicações práticas do guia de validação e controle de qualidade analítica de fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. **Química Nova**, vol._, n°_, p. 1-12, 200_.

REN, Y. M. *et al.* The selective binding character of a molecular imprinted particle for Bisphenol A from water. **Water Research**, vol. 50, p.90-100, mar. 2014.

REN, Y. *et al.* Synthesis and properties of bisphenol A molecular imprinted particle for selective recognition of BPA from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 367, n°. 1, p.355-361, out. 2012.

RIBANI, M. *et al.* Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, vol. 27, n°5, p. 771-780, 2004.

RICHARDSON, S. D.; TEMES, T. A. *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues*. **Analytical chemistry**, vol. 86, p.2813-2848, 2014.

RIZZATO, J. A.; RATH, S. *et al.* Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, vol.31, n°5, p. 1190-1198, 2008.

ROCHA, B. A.; JÚNIOR, F. B. *CONTAMINANTES EMERGENTES (1º Capítulo): Bisfenol A e análogos*. São Paulo, vol. 2, nº. 1, 2014.

ROCHA, A. C. L. S.; ALMEIDA, C. J. C. L. *Bisfenol A: Toxicologia*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, 2011. Disponível em: < http://toxicologia.wix.com/bisfenol_a#! >. Acesso em: 25/08/2016.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. *Monitoring of estrogens, pesticides and BPA in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography mass spectrometry*. **Journal of Chromatography A**, vol.1045, p.85–92, 2004.

SABESP - *Água no Planeta*. Disponível em: < www.sabesp.com.br >. Acessado dia 09/11/2015.

SANAGI, M. M. *et al. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in the fruit samples*. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol.32, p. 155-161, 2013.

SANSON, S. L. *et al. Equipamento de baixo custo para extração em fase sólida em amostras aquosas de grande volume utilizando pressão positiva de N₂*. **Química Nova**, Brasil, vol.37, nº1, p.150-152, 2014.

SANTANA, S. J. *Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal*. Brasília, 2013. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, 2013. Disponível em: <[Http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13822/1/2013_JoyceSilvaSantana.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13822/1/2013_JoyceSilvaSantana.pdf)> acessado dia 12/12/2015.

SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. *Análise da textura de materiais cerâmicos a partir das isotermas de adsorção de gases*. **Cerâmica**, vol.39, nº259, p. 11-16, 1993.

SAAVEDRA, L. N. M. *Sínteses de polímeros molecularmente impressos para adsorção seletiva de quinolina em matriz orgânica*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Mg, 124p., 2017.

SANTOS, M. G.; FIGUEIREDO, E. C. *Preparo de amostras empregando polímeros de impressão molecular*. In: *Introdução ao preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 10, p. 88-96, 2015.

SANTOS, M. G. *et al. Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicação e tendência*. *Scientia Chromatographica*, vol. 4, nº 3 p. 161-195, 2012.

SCHONS, E. *Fenômenos interfaciais: Adsorção, isotermas e filmes monomoleculares (Aula 05)*. Universidade federal do Goiás, Campus Catalão, 39 slides.

SILVA, J. C. C.; TEODORO, J. A. P.; AFONSO, R. J. C.; AQUINO, S. F.; AUGUSTI, R. *Photodegradation of bisphenol A in aqueous medium: Monitoring and identification of by-products by liquid chromatography coupled to high-Resolution mass spectrometry*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Vol.28, p.987-994, 2014.

SILVA, R. F. *et al. Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto*. *Revista Virtual Química*, vol.8, nº3, p.702-715, 2016. Disponível em: <<http://rvq.sbjq.org.br>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

SILVEIRA, E. *Contaminação Emergente: Presença de cafeína em água tratada é indício da presença de outras substâncias nocivas*. 2015. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2015/04/10/contaminacao-emergente/>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

SODRÉ, F. F. *et al. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais*. **Química Nova**, vol.33, nº1, p.216-219, 2010.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. F.; JARDIM, W. F. *Caderno Temático volume 6: Origem e Destino de Interferentes Endócrinos em Águas Naturais*. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

SOUSA, M. D.; BARBOSA, C. M. *Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: Síntese e caracterização*. **Química Nova**, vol.32, nº6, p.1609-1619, 2009.

SUN, F. *et al.* *Recent advances and progress in the detection of bisphenol A*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, nº. 25, p.6913-6927, 2016.

SUN, X. *et al.* *Highly selective dummy molecularly imprinted polymer as a slid-phase extraction sorbent for five bisphenol A in tap and river water*. **Journal of Chromatography A**, vol.1343, p. 33-41, 2014.

SYU, M. J. *et al.* *Ionic effect on the binding of bilirubin to the imprinted poly (methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethylacrylate)*. **Journal of Chromatography A**, vol.1122, p.54-62, mai. 2006.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. *Polímeros Biométricos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicação de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em Técnicas de Extração e Separação*. **Química Nova**, vol. 28, nº 6, p. 1076-1086, 2005.

TERNES, T. A. *Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples*. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 20, nº.8, p.419-434, ago. 2001.

THOMMES, M. *et al.* *Phys sorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC technical report)*. **Pure Application Chemical**, vol.87, nº.9-10, p.1051-1069, 2015.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Corpo Humano: Fundamentos da anatomia e fisiologia*. In: __. *Organização do corpo humano*. 10. ed. Teckbooks: Artmed, cap.1, p.1-23, 2015.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. *Corpo Humano: Fundamentos da anatomia e fisiologia*. In: __. *Sistema endócrino*. 10. ed. Teckbooks: Artmed, cap.2, p.323-352, 2015.

TOXIPEDIA: *Bisfenol A, 2014*. Disponível em: <<http://toxipedia.org/display/toxipedia/Bisphenol-A>>. Acesso em: 28/08/2016.

TURIEL, E.; MARTÍN ESTEBAN, A. *Molecularly imprinted Polymers for sample preparation: A review*. **Analytica Chimica Acta**, vol.668, p.87-99, 2010.

VANDENBERG, L. N. *et al.* *Estudos de biomonitoração do sistema urinário, circulatório e tecidos indicam grande exposição ao Bisfenol A*. **Ciência & Saúde Coletiva**, Brasil, 2012.

XU, S. *et al.* *Impedance study of adsorption phenomena on three-dimensional nano-nickel electrode deposited on silicon microchannel plate*. *Electrochimica Acta*, vol. 132, p.165-171, jun. 2014.

WHITCOMBE, M. J.; RODRIGUEZ, M. E.; VILLAR, P.; VULFSON, E. N. *A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting – synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol*. **Journal of American Chemical Society**, vol.117, nº. 27, p. 7105-7111, 1995.

YAMAMOTO, T., YASUHARA, A., SHIRAIISHI, H., NAKASUGI, O. *Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates*. **Chemosphere**, vol.42, p.415–418, 2001.

YANG, M. *et al.* *Study on the Molecularly Imprinted Polymers with methyl-testosterone as the template*. **Talanta**, vol.18, nº 3, p. 156-161, 2010.

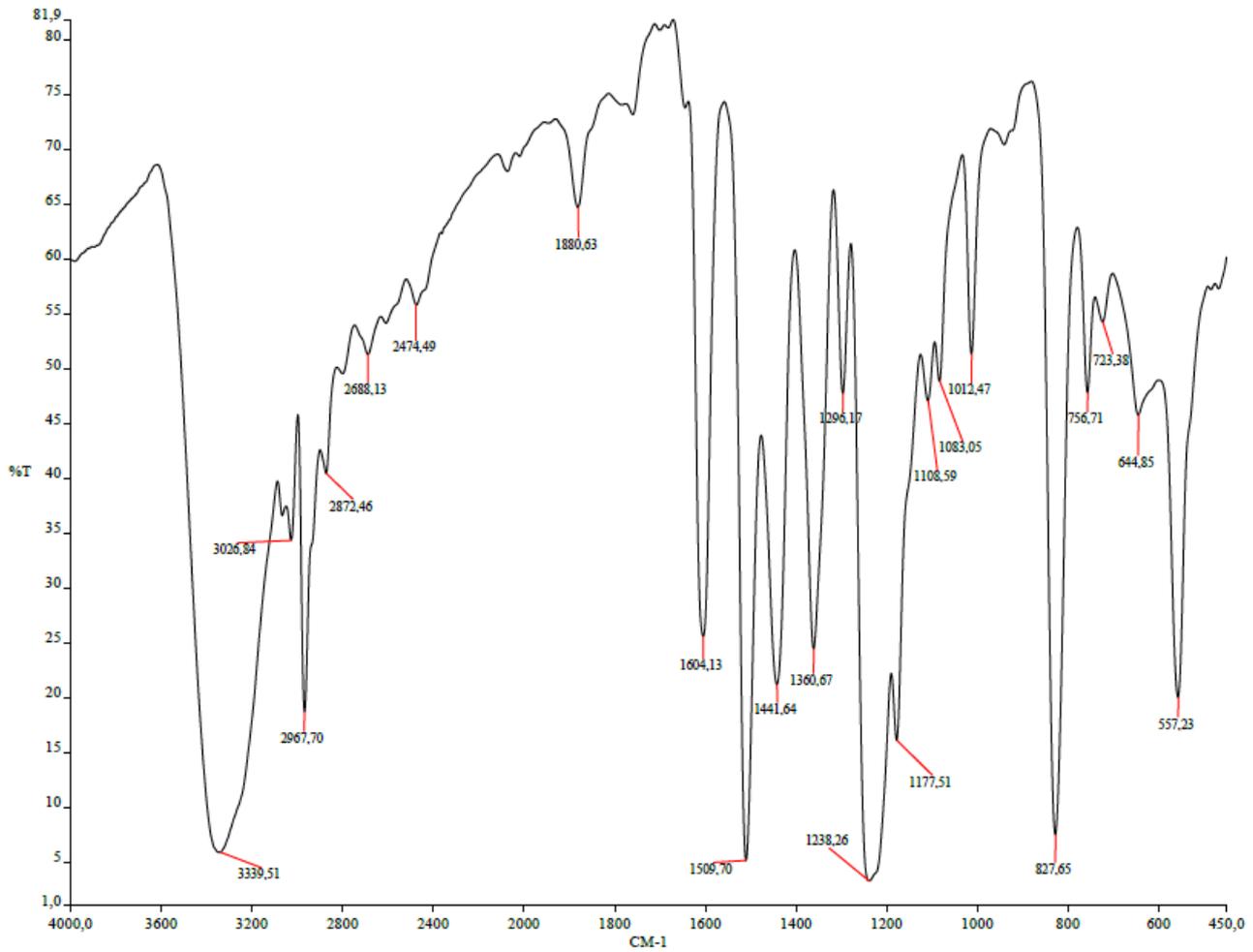
YOON, Y. *et al.* *HPLC-Fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17β-estradiol, and 17α-ethynyl estradiol on powdered activated carbon*. **Water Research**, vol. 37, p. 3530-3537, 2003.

YOSHIKAWA, M.; THARPA, K.; DIMA, S. O. *Molecularly Imprinted Membranes: Past, Present, and Future*. **Chemical Review**, vol.116, p.11500-11528, 2016.

ZHANG, Y.L. *et al.* *Sorption of carbamazepine from water by magnetic molecularly imprinted polymers based on chitosan- Fe₃O₄*. **Carbohydrate Polymers**, vol. 97, p. 809-816, 2013.

ANEXO A

Espectro FTIR com pastilha de KBr do BFA:



Fonte: Arquivo pessoal.