

Polímero impresso molecularmente para extração e análise de galaxolide em águas

Leandro André Dias de Figueiredo

Dissertação para a obtenção do grau de

Doutor em Engenharia do Ambiente

pela

Universidade do Porto

Orientadores:

Professora Doutora Maria Arminda Costa Alves

Professora Doutora Lúcia Maria Silveira Santos

Doutor Guillaume Laurent Erny

Porto, 2017

Este trabalho foi financiado por:

- (i) POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.

- (ii) NORTE-01-0145-FEDER-000005 – LEPABE-2-ECO-INNOVATION, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

- (iii) Bolsa de doutoramento FCT - SFRH/BD/86941/2012.



Resumo

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver um polímero impresso molecularmente (MIP), seletivo ao galaxolide, com o objetivo de ser utilizado como sorbente de extração na análise deste composto em águas, por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FL). O galaxolide é um composto pertencente ao grupo dos *musks*, que são compostos orgânicos utilizados em produtos de higiene e cuidado pessoal (PCPs) devido aos seus aromas característicos e principalmente às suas capacidades fixativas de fragrâncias. O galaxolide é o *musk* policíclico mais comum tendo-se verificado nos últimos anos um aumento considerável da sua produção e utilização. Após a sua utilização, uma quantidade significativa deste composto é libertada nos efluentes domésticos atingindo posteriormente as estações de tratamento de águas residuais. Devido às suas propriedades físico-químicas, o galaxolide é considerado bioacumulativo e lipofílico verificando-se uma remoção incompleta durante o processo de tratamento das águas residuais. As sucessivas descargas destes efluentes constituem uma das principais fontes de contaminação do meio ambiente, comprovada pela deteção de galaxolide em águas, organismos aquáticos e conseqüentemente em humanos, em concentrações desde ng.L^{-1} até $\mu\text{g.L}^{-1}$. Recentemente, têm surgido estudos que apontam para uma potencial disrupção ao nível do sistema endócrino, em consequência da acumulação e persistência do galaxolide no ambiente.

As alternativas atuais existentes para a quantificação de galaxolide em águas a níveis vestigiais, implicam métodos analíticos caros como a cromatografia gasosa com espetrometria de massa (GC-MS) associados a processos de extração também dispendiosos e pouco seletivos. Desta forma a procura de novos sorbentes, como é o caso dos MIPs, torna-se importante de modo a que metodologias de análise mais acessíveis e expeditas possam ser desenvolvidas.

Inicialmente, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos de injeção direta em cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FL), conforme o solvente da solução de galaxolide, para a quantificação deste composto nas diferentes etapas de síntese e caracterização do MIP e do polímero não impresso molecularmente (NIP). Foram obtidos limites de deteção de 0,07 e 0,31 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o método desenvolvido para a análise de galaxolide

em acetonitrilo:água (85:15, v/v) e em água, respetivamente. A realização de ensaios de exatidão, revelou resultados satisfatórios para o método em acetonitrilo:água. A aplicação a amostras reais nos ensaios de exatidão para o método em água resultou em recuperações mais baixas (45,5-55,5%), para concentrações de analito mais próximas do limite de deteção. No entanto, para a gama de concentrações em estudo, os métodos desenvolvidos serviram o propósito de quantificação de galaxolide nas matrizes em análise, resultantes do processo de produção do MIP e do NIP.

A síntese do MIP foi realizada de acordo com a técnica de suspensão, utilizando o galaxolide como *template*, o ácido metacrílico como monómero funcional, o dimetacrilato de etilenoglicol como *cross-linker* e o acetonitrilo como solvente porogénico. Após a seleção destes reagentes para as respetivas funções procedeu-se a uma otimização das razões estequiométricas entre *template*, monómero e *cross-linker* através da avaliação da taxa de impressão para nove formulações de MIP. A partir deste estudo verificou-se não existirem diferenças significativas na impressão de galaxolide para as formulações testadas. Tendo em conta estes resultados, definiu-se uma formulação otimizada composta pela razão estequiométrica de 1:4:20 para *template*, monómero e *cross-linker*, respetivamente. De modo a otimizar o processo de extração do *template* foram estudados três parâmetros: técnica, solvente e número de ciclos de extração. Após avaliação das capacidades de eluição, foi possível destacar a combinação de n-hexano com a técnica de ultra-sons com uma capacidade de eluição de $316 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (massa de *template* por massa de polímero). A monitorização da concentração de galaxolide em cada ciclo de extração revelou ser necessário um mínimo de dez ciclos de extração para atingir níveis de galaxolide no extrato inferiores ao limite de deteção do respetivo método de injeção direta. A aplicação das condições ótimas de extração permitiu obter uma eficiência de extração máxima de 97%.

Os ensaios de caracterização do MIP e NIP otimizados, demonstraram não existirem diferenças entre as superfícies exibidas pelos dois polímeros, as quais se revelaram lisas e compactas. Estes materiais apresentaram áreas superficiais de $2,3 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ para o MIP e $2,1 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ para o NIP, valores inferiores aos reportados na literatura para estes polímeros. Por sua vez, a análise termogravimétrica revelou perfis semelhantes, com uma degradação completa de ambos os polímeros aos $400 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foram realizados ensaios de cinética e de equilíbrio para o estudo da adsorção do galaxolide no MIP e no NIP. O estudo cinético permitiu concluir que a adsorção no MIP em água e em acetonitrilo segue um modelo de pseudo-segunda ordem. No caso do NIP verificou-se um bom ajuste dos dados experimentais com ambos os modelos, nos dois solventes. Nos ensaios de equilíbrio, em acetonitrilo e em água, foram analisados três modelos isotérmicos para o ajuste dos dados experimentais. O modelo de Freundlich proporcionou o melhor ajuste para os resultados

com o MIP em acetonitrilo, com uma constante de adsorção de $0,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{-1/n}$. Por sua vez foi encontrada uma boa relação entre o modelo de Langmuir e a adsorção de galaxolide no MIP em água, tendo sido obtida uma capacidade máxima de adsorção de $5,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Para o NIP, obteve-se um ajuste adequado com o modelo de Langmuir, em ambos os solventes, com capacidades máximas de adsorção de $4,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para o caso da água e de $159 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para acetonitrilo. O desempenho do MIP e NIP foi avaliado na aplicação destes polímeros como sorbentes seletivos para a técnica de extração em fase sólida (SPE). Nas condições ótimas, os resultados revelaram recuperações de 54% de analito para a extração em fase sólida com polímero impresso molecularmente (MISPE) enquanto que a extração em fase sólida com polímero não impresso molecularmente (NISPE) apenas permitiu recuperações de 30%. Com base nestes resultados procedeu-se à validação do método MISPE-HPLC-FL, através de calibração externa. O método permitiu obter um limite de deteção de $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e recuperações entre 103,8 e 108,2% para amostras de água de afluente de ETAR contaminadas com galaxolide entre $0,4$ e $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Com este estudo foi possível obter resultados promissores que passam pela combinação de um sorbente mais específico (MIP) com um método de deteção pouco dispendioso e mais simples de operar, como é o caso do HPLC-FL, para a análise de galaxolide em águas.

Abstract

The aim of this work was to develop a molecularly imprinted polymer (MIP) that is selective to galaxolide. The final objective is to use the MIP as extraction sorbent in the analysis of galaxolide in water using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FL). Galaxolide is a compound belonging to the musks group. Those are organic compounds used in personal care products (PCPs) because of their characteristic scents and fragrance fixative properties. Galaxolide is the most common polycyclic musk, and its production and use have increased significantly in recent years.

Due to its physicochemical properties, galaxolide is bioaccumulative and lipophilic, with incomplete removal during the wastewater treatment process. Because a significant amount of this compound is released, after use, into the domestic effluents, they are important sources of contamination of the environment. Galaxolide in waters, aquatic organisms and consequently in humans, was monitored at concentrations ranging from ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$. Other studies demonstrated a significant disruption potential in the endocrine system, raising concerns about the consequence of the accumulation and persistence of galaxolide in the environment.

Quantification of galaxolide in waters at trace levels needs expensive analytical methods such as gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) associated with extraction processes. The search for highly selective sorbents for the extraction process is of high relevance as they significantly reduce the complexity of the separation allowing cheap alternative or even online measurement. Within the range of tools available to the analyst, MIP is particularly interesting because of their low cost and high selectivity. Thus this thesis details the design of a MIP as a sorbent for the selective extraction of galaxolide.

Direct injection methods were developed and validated using HPLC-FL for the quantification of this compound in the different stages of synthesis and characterization of MIP and the non-molecularly imprinted polymer (NIP). Detection limits of 0,07 and 0,31 $\mu\text{g.L}^{-1}$ were obtained for the method developed for the analysis of galaxolide in acetonitrile: water (85:15, v/v) and in water, respectively. Accuracy tests revealed satisfactory results for the acetonitrile:water method.

Application to real samples in the accuracy tests for the water method resulted in lower recoveries (45,5 to 55,5%) at analyte concentrations close to the detection limit. However, for the range of concentrations under study, the methods were satisfactory, allowing the quantification of galaxolide in the various matrices obtained during the production MIP and NIP.

The synthesis of MIP and NIP was performed according to the suspension technique, using galaxolide as a template, methacrylic acid as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as cross-linker and acetonitrile as the porogenic solvent. Various stoichiometric ratios between template, monomer and cross-linker were evaluated. No significant differences in the imprinting factor were observed between the formulations tested. Thus, the optimised formulation consisted in the following stoichiometric ratio of 1:4:20 for template, monomer and cross-linker, respectively. The extraction of the template from the polymer was optimised via three parameters: technique, solvent and number of extraction cycles. A combination of n-hexane and ultrasonic technique gave the best results with an elution capacity of 316 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (template mass per polymer mass). Monitoring the galaxolide concentration in each extraction cycle revealed a minimum of ten extraction cycles to reach galaxolide levels in the extract below the detection limit. The application of the optimum extraction conditions allowed a maximum extraction efficiency of 97%.

The optimized MIP and NIP characterization assays showed no differences between the surfaces exhibited by the two polymers, which were smooth and compact. These materials had surface areas of 2,3 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ for MIP and 2,1 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ for NIP. The thermogravimetric analysis revealed similar profiles, with a complete degradation of both polymers at 400 °C.

Kinetic and equilibrium assays, performed to study the galaxolide adsorption on MIP and NIP, revealed that in water and acetonitrile the kinetic follows a pseudo-second order model. In the case of NIP, a good adjustment of the experimental data with two models was observed in both solvents. The Freundlich model provided the best fit for the results with the MIP in acetonitrile, with an adsorption constant of 0,70 $\mu\text{g.g}^{-1} (\mu\text{g.L}^{-1})^{-1/n}$. A good relationship was found between the Langmuir model and galaxolide adsorption in the MIP in water, with a maximum adsorption capacity of 5,3 mg.g^{-1} . For the NIP, a better fit was obtained with the Langmuir model, in both solvents, with maximum adsorption capacities of 4,8 mg.g^{-1} for water and 159 $\mu\text{g.g}^{-1}$ for acetonitrile. The performance of MIP and NIP was evaluated in the application of these polymers as selective sorbents for the solid phase extraction technique (SPE). At optimum conditions, the results revealed a recovery of 54% of analyte for solid phase extraction with the molecularly imprinted polymer (MISPE) while solid phase extraction with the non-molecularly imprinted polymer (NISPE) allowed only 30% of recovery. Based on these results, the MISPE HPLC-FL method was validated through external calibration. The method allowed a limit of detection of

0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and recoveries between 103,8 and 108,2% for samples of wastewater effluent contaminated with galaxolide between 0,4 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

With this study, it was possible to obtain promising results that go through the combination of a more specific sorbent (MIP) with an affordable and simpler detection method to operate, as is the case of HPLC-FL, for galaxolide analysis in waters.

Agradecimentos

Desejo expressar o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Prof^ª Doutora Arminda Alves um agradecimento muito especial pela amizade, os ensinamentos, a compreensão, o incentivo, a paciência, a disponibilidade, mas acima de tudo o ter acreditado sempre em mim o que permitiu que este trabalho se realizasse.

À Prof^ª Doutora Lúcia Santos agradeço também a amizade, a paciência, os ensinamentos e a confiança demonstrada.

Ao investigador Doutor Guillaume Erny agradeço toda a disponibilidade, o apoio, confiança e incentivo. Sem a sua preciosa ajuda não teria sido possível finalizar este trabalho.

Ao Sr. Serafim, Fátima Ferreira e Eng. José Moreira agradeço por toda a assistência prestada ao longo destes anos.

Gostaria também de expressar a minha gratidão à D. Maria de Fátima Faustino pela sua simpatia, disponibilidade e amizade.

Ao Centro de Materiais da Universidade do Porto, ao Laboratório de Catálise de Materiais do Departamento de Engenharia Química agradeço as análises efetuadas às amostras poliméricas, bem como toda a ajuda na interpretação de resultados. À Doutora Salomé Soares, aos Eng. Luís Carlos Matos e Samuel Queirós pela colaboração e apoio na realização dos ensaios de caracterização destes materiais.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, que trabalharam diretamente comigo nestes últimos anos e que me ajudaram a percorrer este longo e difícil caminho. Agradeço em especial à Vera Homem, José Avelino, Raquel Sousa, Marzieh Moeenfard, Daniela Capela, Sara Ramos, Nuno Ratola e Ana Isabel, pela amizade, por todos os conselhos e pelo apoio que me deram. Um especial agradecimento à Mónica Santos e à Diana Paiva pela amizade, pelas conversas partilhadas nos almoços e lanches, pelos conselhos e por terem estado sempre comigo.

Aos meus companheiros de futebol, pelos momentos de descontração e amizade vividos nos fins de tarde de sexta-feira. Um especial agradecimento aos meus grandes amigos João Boaventura

e Filipe Silva pela amizade, companheirismo, boa disposição e por todas as palavras de incentivo que sempre me dirigiram e que foram fundamentais para aqui chegar.

Agradeço aos meus pais, pelos princípios que sempre me inculcaram e pelo esforço realizado para me darem todas as condições para aqui chegar.

A ti Mónica, que estiveste sempre do meu lado, que acreditaste mesmo quando eu não acreditava, que me apoiaste de modo incondicional em todos os momentos de crise e de dúvida. A ti agradeço por aturares o meu humor e me responderes sempre com um sorriso e palavras de incentivo. Ao meu filho Lourenço, nascido antes de iniciar este processo de escrita, uma verdadeira dádiva que me fez perceber o significado de amor incondicional, por inconscientemente me dar uma enorme motivação para que pudesse terminar esta longa caminhada.

A todos os que não referi pessoalmente, mas que de algum modo me ajudaram na concretização deste trabalho, para eles uma palavra de carinho e agradecimento.

Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	v
Agradecimentos	ix
Índice	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xix
Abreviaturas e Símbolos.....	xxi
1. Introdução.....	3
1.1. Relevância e motivação	3
1.2. Objetivos da tese.....	5
1.3. Breve descrição de <i>musks</i>	5
1.4. Caracterização físico-química e persistência do galaxolide no ambiente	8
1.5. Métodos analíticos para quantificação de galaxolide em águas	11
1.6. Impressão Molecular – Introdução.....	18
1.7. Abordagens para a preparação de polímeros impressos molecularmente	21
1.7.1. Abordagem covalente.....	21
1.7.2. Abordagem não-covalente.....	22
1.7.3. Abordagem semi-covalente.....	24
1.7.4. Abordagem mediada por metais.....	25
1.8. Componentes e fatores que influenciam a síntese de MIPs.....	26
1.8.1. <i>Template</i>	26

1.8.2. Monómero funcional	27
1.8.3. <i>Cross-linker</i>	28
1.8.4. Solvente porogénico	30
1.8.5. Iniciador de polimerização	31
1.9. Métodos de preparação de MIPs	32
1.9.1. Polimerização em <i>bulk</i>	32
1.9.2. Polimerização em suspensão	33
1.9.3. Polimerização em emulsão	33
1.9.4. Polimerização por precipitação	34
1.9.5. Polimerização <i>multistep swelling</i>	34
1.9.6. Outras metodologias de polimerização	35
1.10. Caracterização de polímeros impressos molecularmente.....	39
1.10.1. Caracterização química.....	39
1.10.2. Caracterização morfológica	39
1.10.3. Avaliação das propriedades de reconhecimento molecular	40
1.11. Aplicações de MIPs para a análise de PCPs	45
1.12. MIPs para a remediação de águas	54
2. Materiais e Métodos	59
2.1. Reagentes e Consumíveis	59
2.2. Equipamento	60
2.3. Preparação dos Padrões	60
2.4. Análise de galaxolide por injeção direta em HPLC-FL.....	61
2.4.1. Parâmetros de validação.....	61
2.5. Síntese do MIP e do NIP	62
2.6. Extração do <i>template</i>	63
2.7. Caracterização do MIP e do NIP.....	64
2.7.1. Análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	64
2.7.2. Área superficial e porosidade	65
2.7.3. Análise termogravimétrica	65
2.8. Cinética de adsorção.....	65
2.9. Isotérmicas de adsorção	66
2.10. Procedimento para o MISPE/NISPE.....	66
2.11. Validação do método MISPE-HPLC-FL para análise de galaxolide em águas.....	67
2.12. Precauções para evitar contaminação cruzada	68

2.13. Tratamento dos resíduos gerados.....	68
3. Resultados e Discussão.....	71
3.1. Desenvolvimento, implementação e validação de um método de análise de galaxolide por HPLC-FL.....	71
3.1.1. Efeito de matriz e outras possíveis fontes de incertezas associadas ao método	72
3.1.2. Estudo da linearidade, limites de detecção e quantificação	75
3.1.3. Avaliação da Precisão	77
3.1.4. Avaliação da Exatidão.....	78
3.1.5. Avaliação da Incerteza Global	79
3.1.6. Conclusão.....	81
3.2. Síntese de um polímero impresso molecularmente seletivo ao galaxolide.....	83
3.2.1. Preparação de diferentes formulações de polímero.....	88
3.2.2. Estudos preliminares de extração do <i>template</i> por Soxhlet.....	90
3.2.3. Otimização do processo de extração do <i>template</i>	93
3.2.4. Conclusão.....	98
3.3. Caracterização morfológica do MIP e NIP.....	99
3.3.1. Microscopia eletrônica de varrimento	99
3.3.2. Estimativa da área superficial através da isotérmica B.E.T	100
3.3.3. Análise termogravimétrica.....	105
3.3.4. Conclusão.....	106
3.4. Adsorção do galaxolide ao MIP e NIP.....	109
3.4.1. Ensaios preliminares de adsorção	109
3.4.2. Estudo da cinética de adsorção	111
3.4.3. Estudo da isotérmica de adsorção.....	118
3.4.4. Conclusão.....	124
3.5. Novo método de análise de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL.....	127
3.5.1. Determinação do volume de breakthrough aplicado ao NISPE	128
3.5.2. Validação do método MISPE-HPLC-FL	131
3.5.3. Conclusão.....	137
4. Conclusões.....	141
5. Sugestões para trabalho Futuro	147
6. Referências Bibliográficas.....	151
7. Anexo I. Determinação da incerteza global.....	171

Índice de Figuras

Figura 1. Exemplos de estruturas químicas de <i>musks</i> sintéticos	7
Figura 2. Etapas fundamentais da impressão molecular: (a) formação de um complexo entre o <i>template</i> (amarelo) e monómeros funcionais (vermelho, verde e castanho); (b) polimerização do complexo na presença do <i>cross-linker</i> , (c) extração do <i>template</i> para a obtenção de cavidades específicas com capacidade para se ligar ao analito-alvo. Adaptado de (Ge e Turner, 2008).	19
Figura 3. Mecanismo geral da polimerização radicalar, adaptado de (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013).....	20
Figura 4. Abordagem covalente para a impressão molecular do ácido D-glicérico, desenvolvida por Wulff e Sarhan (1972).....	22
Figura 5. Abordagem não-covalente para a impressão molecular do cortisol. Adaptado de (Ramström <i>et al.</i> , 1996).	24
Figura 6. Estruturas dos monómeros mais comuns para a síntese de MIPs.	28
Figura 7. Estruturas dos <i>cross-linkers</i> mais comuns para a síntese de MIPs.....	29
Figura 8. Estruturas químicas dos iniciadores mais comuns para a síntese de MIPs.	31
Figura 9. Representação esquemática do processo de produção de MIP magnéticas pela técnica de impressão à superfície	36
Figura 10. Mecanismo geral da polimerização RAFT, adaptado de (Ye, 2016). Iniciador – I, Monómero – M, Radicais poliméricos – P _n e P _m , Radical – R.....	37
Figura 11. Representação geral das isotérmicas de adsorção para o MIP e respetivo NIP. Adaptado de (Spivak, 2005).	41
Figura 12. Aplicação do método de Scatchard para a adsorção de roxitronicina, adaptado de (Yu <i>et al.</i> , 2010).	43
Figura 13. Princípio da cromatografia frontal onde o <i>template</i> e um marcador de volume morto são introduzidos em contínuo em colunas preparadas com partículas de MIP. Adaptado de (García-Calzón e Díaz-García, 2007).	44
Figura 14. Representação esquemática do procedimento de MISPE. Adaptado de (Płotka-Wasyłka <i>et al.</i> , 2015).	48

Figura 15. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV para amostras de água real após a extração com C18 (A) e MIP (B), utilizados como sorbentes em procedimentos de SPE. Antes da extração as amostras foram fortificadas com metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), butilparabeno (BuP) e benzilparabeno (BzP). Adaptado de (Beltran <i>et al.</i> , 2010).	49
Figura 16. Representação esquemática do procedimento de MISPE. Adaptado de (Chen <i>et al.</i> , 2016).	51
Figura 17. Instalação laboratorial utilizada para a síntese do polímero impresso molecularmente com galaxolide.	63
Figura 18. Processo de extração do <i>template</i> por Soxhlet.	64
Figura 19. Instalação de MISPE utilizada para análise de galaxolide em águas.	67
Figura 20. Cromatograma obtido após a injeção de 100 µL de um padrão de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) a 120 µg.L ⁻¹ . A análise foi realizada por HPLC-FL, com uma mistura de acetonitrilo:água acidificada com ácido acético glacial, 100% (85:15 v/v) a um caudal de 1mL.min ⁻¹ . A deteção foi realizada a um comprimento de onda de excitação e de emissão de 280 e 310 nm, respetivamente.	72
Figura 21. Cromatogramas obtidos após a injeção de 100 µL de dois padrões de galaxolide 120 µg.L ⁻¹ preparados em acetonitrilo:água e na matriz reacional que resulta da reação de polimerização. A análise foi realizada em HPLC-FL, com uma mistura de acetonitrilo:água acidificada com ácido acético glacial, (85:15, v/v) a um caudal de 1mL.min ⁻¹ . A deteção foi realizada a um comprimento de onda de excitação e de emissão de 280 e 310 nm, respetivamente.	74
Figura 22. Retas de calibração para a injeção direta de padrões de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) e em água com os respetivos intervalos de confiança.	76
Figura 23. Contribuição das incertezas individuais no resultado da incerteza global para a quantificação de galaxolide em a) acetonitrilo:água (85:15, v/v) e b) água por injeção direta em HPLC-FL. U_1 - incerteza associada à preparação de padrões; U_2 - incerteza associada à reta de calibração; U_3 - incerteza associada à precisão; U_4 - incerteza associada à exatidão.	80
Figura 24. Incerteza global da metodologia analítica para a quantificação de galaxolide em a) acetonitrilo:água (85:15, v/v) e b) água por injeção direta em HPLC-FL.	81
Figura 25. Tipo de monómero utilizado nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs. AA, acrilamida; APTES, 3-aminopropiltriétoxissilano; MAA, ácido metacrílico; MMA, metacrilato de metilo; <i>o</i> -PD, <i>o</i> -fenilenodiamina; PTMS, feniltrimetoxissilano; 4-VP, 4-vinilpiridina.	84
Figura 26. Tipo de solvente porogénico utilizado nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs.	85
Figura 27. Tipo de <i>cross-linker</i> utilizado nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs. DVB, divinilbenzeno; EGDMA, dimetacrilato de etilenoglicol; TEOS, tetraetoxissilano; TPGDA, tripropileno glicol diacrilato; TRIM, trimetacrilato de trimetilopropano. N.A, sem aplicação de <i>cross-linker</i> .	86

Figura 28. Técnicas de polimerização aplicadas nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs.....	87
Figura 29. Métodos de extração do <i>template</i> em MIPs, adaptado de (Lorenzo <i>et al.</i> , 2011).....	91
Figura 30. Eficiência do processo de extração em Soxhlet com metanol/ácido acético (90:10, v/v) em seis formulações de MIPs.....	92
Figura 31. Concentração de <i>template</i> após sucessivas lavagens com recurso ao ultra-sons. Em ambos os gráficos, o zero representa o limite de deteção para o método de injeção direta em HPLC-FL, ou seja, 0,07 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97
Figura 32. Imagens de microscopia eletrónica de varrimento do MIP (A1 – 500x e A2 – 5000x) e do NIP (B1 – 500x e B2 – 5000x).....	100
Figura 33. Tipos de isotérmicas de equilíbrio de adsorção (Sing, 1985).....	101
Figura 34. Perfis de adsorção/dessorção de azoto a 77 K para a) MIP e b) NIP. Nos quais os marcadores preenchidos representam o processo de adsorção e os marcadores sem preenchimento representam o processo de dessorção.....	102
Figura 35. Representação gráfica da aplicação da equação de B.E.T para o MIP e NIP.....	104
Figura 36. Análise termogravimétrica do polímero impresso molecularmente (MIP) e do polímero de referência (NIP).....	106
Figura 37. Capacidade de adsorção do MIP para soluções de galaxolide preparadas em diferentes solventes ($t_{\text{contacto}} = 24 \text{ h}$, concentração de galaxolide = 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 500 rpm). As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.....	110
Figura 38. Curva cinética de adsorção do galaxolide no MIP e NIP para uma concentração inicial de galaxolide de 10 mg.L^{-1} em água, correspondendo a uma razão mássica galaxolide/polímero igual a 2,5 mg.g^{-1} . Massa de adsorvente = 20 mg, $65 < d_p < 150 \text{ } \mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.....	112
Figura 39. Curva cinética de adsorção do galaxolide ao MIP e NIP para uma concentração inicial de galaxolide de 10 mg.L^{-1} em acetonitrilo, correspondendo a uma razão mássica galaxolide/polímero igual a 2,5 mg.g^{-1} . Massa de adsorvente = 20 mg, $65 < d_p < 150 \text{ } \mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.....	112
Figura 40. Curva cinética de adsorção do galaxolide ao NIP para concentrações iniciais de galaxolide de 0,10; 1,00 e 1,75 mg.L^{-1} em água, correspondendo a razões mássicas galaxolide/polímero iguais a 0,03; 0,25 e 0,44 mg.g^{-1} , respetivamente. Massa de adsorvente = 20 mg, $65 < d_p < 150 \text{ } \mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.....	113
Figura 41. Isotérmicas de adsorção do galaxolide no MIP e NIP em a) água e b) acetonitrilo para concentrações de galaxolide entre 0,03 e 7 mg.L^{-1} em acetonitrilo, correspondendo a razões mássicas galaxolide/polímero entre 7,5 e os 1750 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Massa de adsorvente = 20 mg, $65 < d_p < 150 \text{ } \mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm, tempo de contacto = 120 min.....	121

Figura 42. Resultados do ensaio de breakthrough do NIP, após passagem de uma solução aquosa de galaxolide 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a um caudal de 0,2 mL.min^{-1}	128
Figura 43. Efeito da concentração de analito na etapa de <i>load</i> para a adsorção de 25 (C1) e 500 (C2) $\mu\text{g.L}^{-1}$ de galaxolide ao NISPE. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.	129
Figura 44. Estudo da influência da natureza do solvente na recuperação do galaxolide adsorvido no MISPE e NISPE. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.	131
Figura 45. Estudo da influência do volume de n-hexano na recuperação do galaxolide adsorvido no MISPE e NISPE. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.	131
Figura 46. Retas de calibração para a injeção de padrões de galaxolide em água pura extraídos por MISPE.	132
Figura 47. Cromatogramas obtidos após a injeção em HPLC-FL de uma amostra de água de afluyente (A) sem tratamento e (B) após tratamento com MISPE.	134
Figura 48. Contribuição das incertezas individuais no resultado da incerteza global para a quantificação de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL. U_1 - incerteza associada à preparação de padrões; U_2 - incerteza associada à reta de calibração; U_3 - incerteza associada à precisão; U_4 - incerteza associada à exatidão.	135
Figura 49. Incerteza global da metodologia analítica para a quantificação de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL.	136

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estrutura química e propriedades físico-químicas do galaxolide (Balk e Ford, 1999).....	8
Tabela 2. Métodos analíticos para a determinação de galaxolide em águas.	16
Tabela 3. Aplicação de polímeros impressos molecularmente para a análise de produtos de higiene pessoal.....	46
Tabela 4. Efeito de matriz baseado nas razões das áreas obtidas para o galaxolide nos diferentes tipos de matrizes e solventes, com o respetivo desvio padrão (DP).	74
Tabela 5. Parâmetros de linearidade associados à reta de calibração para a quantificação de galaxolide.	76
Tabela 6. Estudo da precisão do método analítico para análise de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v).	78
Tabela 7. Estudo da precisão do método analítico para análise de galaxolide em água.	78
Tabela 8. Estudo de exatidão do método analítico HPLC-FL.	79
Tabela 9. Razões estequiométricas de <i>template</i> :monómero (T:M) e monómero: <i>cross-linker</i> (M:CL) investigados para a otimização do polímero impresso molecularmente.....	89
Tabela 10. Condições e capacidade de eluição, com os respetivos valores de desvio-padrão (DP), das técnicas testadas para a extração de galaxolide do MIP.....	94
Tabela 11. Capacidade de eluição dos solventes testados no processo de extração por ultra-sons e respetivos valores de desvio-padrão (DP).	96
Tabela 12. Valores de área superficial ($S_{B.E.T}$), volume de poros (V_p) e diâmetro médio de poros (d_p) do MIP e NIP.	104
Tabela 13. Parâmetros cinéticos do modelo de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para a adsorção de galaxolide no MIP e no NIP. Ensaio realizado com 20 mg de polímero, $65 < d_p < 150 \mu m$, 5 mL de soluções de galaxolide de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 500 rpm.	116
Tabela 14. Parâmetros das isotérmicas Langmuir, Freundlich e Temkin ($65 < d_p < 150 \mu m$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm, tempo de contacto = 120 min).....	122
Tabela 15. Parâmetros de validação para a determinação de galaxolide por MISPE-HPLC-FL..	133

Tabela 16. Estudo de exatidão do método MISPE-HPLC-FL.....	134
Tabela 17. Comparação do método desenvolvido com os métodos reportados anteriormente baseados em extração em fase sólida para a determinação de galaxolide em amostras aquosas.	137

Abreviaturas e Símbolos

2,4-DNT	2,4-dinitrotolueno
4,4'-DCB	4,4'-diclorobenzofenona
2-HB	Ácido 2-hidroxibenzóico
4-HBA	Ácido 4-hidroxibenzóico
2-VP	2-vinilpiridina
4-VP	4-vinilpiridina
AA	Ácido acrílico
AC	Acrilamida
ACN	Acetonitrilo
AIBN	2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo
APTES	3-aminopropiltriétoxissilano
ATRP	Polimerização radicalar por transferência atômica (<i>atom transfer radical polymerization</i>)
BA	Ácido benzóico
β-CD	β-ciclodextrina
B.E.T	Brunauer-Emmet-Teller
BP	Benzofenona
BuP	Butilparabeno
BzP	Benzilparabeno
CBZ	Carbamazepina
CEC	Electrocromatografia capilar (<i>capillary electrochromatography</i>)
CL	<i>Cross-linker</i>
CLRP	Polimerização radicalar controlada (<i>controlled "living" radical polymerization</i>)
CPE	Eléctrodo de pasta de carbono (<i>carbon paste electrode</i>)
CV	Coeficiente de variação
CW/DVB	<i>Carbowax</i> /divinilbenzeno
D5	Decametilciclopentasiloxano
DCM	Diclorometano
DEP	Dietiltalato
DI	Imersão direta (<i>direct immersion</i>)

DI-SPME	Microextração em fase sólida com imersão direta (<i>direct immersion solid-phase microextraction</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (<i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DVB	Divinilbenzeno
ECHA	Agência Europeia de Químicos (<i>European Chemicals Agency</i>)
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
EM	Efeito de matriz
EP	Poluentes emergentes (<i>emerging pollutants</i>)
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
EtP	Etilparabeno
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i>)
GCE	Eléctrodo de carbono vítreo (<i>glassy carbon electrode</i>)
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (<i>gas chromatography with mass spectrometry</i>)
GMA	Glicidilmetacrilato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de díodos (<i>high performance liquid chromatography with diode array detector</i>)
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (<i>high performance liquid chromatography with fluorescence detector</i>)
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta (<i>high performance liquid chromatography with ultraviolet detector</i>)
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida com <i>headspace</i> (<i>headspace solid-phase microextraction</i>)
iBuP	Isobutilparabeno
IL-SDME	Microextração em gota única com líquido iónico (<i>ionic liquid-based single-drop microextraction</i>)
iPP	Isopropilparabeno
ISEC	Cromatografia inversa por exclusão de (<i>inverse size exclusion chromatography</i>)
K_{ow}	Coefficiente de partição octano/água
λ_{emissão}	Comprimento de onda de emissão
λ_{excitação}	Comprimento de onda de excitação
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrometria de massa (<i>liquid chromatography with mass spectrometry</i>)
LEPABE	Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia
LLE	Extração líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Límite de deteção (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de quantificação (<i>limit of quantification</i>)

LPME	Microextração em fase líquida (<i>liquid phase microextraction</i>)
LSRE-LCM	Laboratório de Separação e Engenharia da Reação-Laboratório de Catálise e Materiais
M	Monômero funcional
MA	<i>Musk ambrette</i>
MAA	Ácido metacrílico
MAE	Extração assistida por micro-ondas (<i>microwave assisted extraction</i>)
MIP	Polímero impresso molecularmente (<i>molecularly imprinted polymer</i>)
MIP-CPE	Elétrodo de pasta de carbono com polímero impresso molecularmente (<i>molecularly imprinted polymer with carbon paste electrode</i>)
MISPE	Extração em fase sólida com polímero impresso molecularmente (<i>molecularly imprinted solid-phase extraction</i>)
MISPE-HPLC-FL	Extração em fase sólida com polímero impresso molecularmente acoplado a um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (<i>molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with fluorescence detector</i>)
MISPE-HPLC-UV	Extração em fase sólida com polímero impresso molecularmente acoplado a um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta (<i>molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with ultraviolet detector</i>)
MISPME	Microextração em fase sólida com polímero impresso molecularmente (<i>molecularly imprinted solid-phase microextraction</i>)
MEPS	Microextração por sorbente empacotado (<i>microextraction by packed sorbente</i>)
MK	<i>Musk ketone</i>
MM	<i>Musk moskene</i>
MMA	Metil metacrilato
MT	<i>Musk tibetene</i>
MtP	Metilparabeno
MX	<i>Musk xylene</i>
NMP	Polimerização mediada por azoto (<i>nitroxide-mediated polymerization</i>)
NIP	Polímero não impresso molecularmente (<i>non-imprinted polymer</i>)
NISPE	Extração em fase sólida com o polímero não impresso molecularmente (<i>non-imprinted solid-phase extraction</i>)
OH-BP	Hidroxi-benzofenonas
<i>o</i>-PD	<i>o</i> -fenilenodiamina
PA	Poliacrilato
<i>p</i>-ATP	<i>p</i> -aminobenzenotiol
PCP	Produtos de cuidado e higiene pessoal (<i>personal care products</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno
<i>p</i>-HB	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico

<i>p</i>-HPA	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
<i>p</i>-HPPA	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilpropanóico
PHWE	Extração com água quente sob pressão (<i>pressurized hot water extraction</i>)
PLE	Extração com líquido pressurizado (<i>pressurized liquid extraction</i>)
PrP	Propilparabeno
PTMS	Feniltrimetoxisilano
PVA	Álcool polivinílico
Rec	Recuperação
RAFT	Polimerização de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (<i>reversible addition fragmentation chain transfer</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SA	Ácido salicílico
SBSE	Extração sorptiva em barra de agitação (<i>stir-bar sorptive extraction</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (<i>scanning electron microscopy</i>)
SFE	Extração com fluido supercrítico (<i>supercritic fluid extraction</i>)
SPE	Extração em fase sólida (<i>solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>solid-phase microextraction</i>)
T	<i>Template</i>
TCC	<i>Triclocarban</i>
TCS	<i>Triclosan</i>
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (<i>transmission electron microscopy</i>)
TEOS	Tetraetoxisilano
TGA	Análise termogravimétrica (<i>thermogravimetric analysis</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>thin-layer chromatography</i>)
TMOS	Tetrametoxisilano
TPGDA	Diacrilato de tripropilenoglicol
TRIM	Trimetacrilato de trimetilolpropano
UAE	Extração assistida por ultra-sons (<i>ultrasonic assisted extraction</i>)
USAEME	Microextração por emulsificação assistida por ultra-sons (<i>ultrasound-assisted emulsification-microextraction</i>)
UV	Ultravioleta

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Relevância e motivação

Os poluentes emergentes, do inglês *emerging pollutants* (EP) são descritos como todos os microorganismos ou químicos a ocorrer de forma natural ou sintética, que não são habitualmente monitorizados e que exibem potencial para entrar/permanecer no ambiente e causar efeitos adversos a nível ecológico ou na saúde dos seres humanos (Younos e Grady, 2014). Incluídos nesta categoria, os produtos de cuidado e higiene pessoal, do inglês *personal care products* (PCPs), englobam um conjunto de compostos utilizados como aditivos em diferentes produtos do dia a dia como cosméticos, produtos de limpeza, alimentos ou mesmo medicamentos.

Como parte integrante do nosso quotidiano, os PCPs são produzidos em grandes quantidades (milhares de toneladas por ano) e podem entrar no organismo através de ingestão direta, absorção pela pele ou mesmo inalação. Uma vez no organismo, estes compostos podem ser metabolizados e eventualmente bioacumular-se e/ou excretados pela urina ou simplesmente removidos por lavagem (Pedrouzo *et al.*, 2011). Alguns dos problemas que têm vindo a ser associados à absorção dérmica destes compostos estão relacionados com alterações mutagénicas, carcinogénicas e alterações a nível do sistema hormonal (Foran *et al.*, 2000; Golden *et al.*, 2005; Kunz e Fent, 2006; Wollenberger *et al.*, 2003). Por sua vez, a parte que é removida após lavagem ou excretada pelo organismo, é escoada até atingir as estações de tratamento de águas residuais (ETAR). Aqui, os PCPs são parcialmente eliminados das águas residuais, ficando retidos no tratamento de lamas ativadas, sendo que a restante parte poderá permanecer nos efluentes (Luo *et al.*, 2014). Estes, são por sua vez, descarregados nas águas superficiais, o que pode constituir uma forma de introdução dos PCPs no meio ambiente.

Inserido no grupo dos PCPs, o galaxolide é um *musk* policíclico utilizado como fragrância e principalmente como fixante em perfumes, cosméticos, champôs, detergentes, produtos de limpeza, entre outros. Entre as fragrâncias, o galaxolide e o tonalide são os mais utilizados, sendo que o galaxolide é o *musk* mais detetado em matrizes ambientais e biológicas. No decorrer dos anos, estudos realizados sobre o galaxolide vieram alertar para uma elevada persistência deste composto, bem como para as suas propriedades bioacumulativas (Gatermann *et al.*, 2002; Rimkus,

1999). Devido à sua ocorrência e bioacumulação, a persistência de galaxolide no meio ambiente poderá afetar a saúde humana, nomeadamente ao nível do sistema hormonal, atuando como um disruptor endócrino (Schreurs *et al.*, 2005).

Do ponto de vista de análise do galaxolide, alguns dos principais obstáculos para a monitorização deste composto no ambiente são a complexidade e tempo de execução associados às metodologias de extração que antecedem a análise. A maioria destas técnicas implicam a utilização de volumes consideráveis de amostra ou solvente, para que seja possível atingir limites de deteção satisfatórios, resultando contudo, no aumento da incerteza associada à análise (Wu *et al.*, 2010b). Por outro lado, as técnicas de extração mais recentes, apesar de oferecerem vantagens atrativas, como por exemplo o uso reduzido de solvente, são, contudo, pouco seletivas, o que pode resultar na co-eluição de compostos estruturalmente semelhantes ao analito ou interferentes. Outro aspeto a reter tem a ver com facto de os métodos existentes implicarem o recurso a equipamentos analíticos complexos como os de cromatografia líquida (LC) ou cromatografia gasosa (GC), o que aumenta consideravelmente o custo por análise. Com base nestes pressupostos, considerou-se que o desenvolvimento de uma nova metodologia analítica poderia representar um acrescento de valor para a investigação existente nesta área. Esta metodologia teve como foco a análise de galaxolide em águas pelo facto de se tratar do principal meio de entrada deste contaminante no ambiente. Para o desenvolvimento dessa metodologia decidiu-se considerar uma classe específica de materiais conhecida por polímeros impressos molecularmente (*molecularly imprinted polymers* – MIPs).

Os MIPs são materiais poliméricos sintéticos com cavidades específicas complementares em forma, tamanho e grupos funcionais relativamente à molécula de *template*. Os MIPs destacam-se pela facilidade de preparação e baixo custo. Estes polímeros podem ser utilizados como sorbentes seletivos, por exemplo, usados na técnica de extração em fase sólida (SPE), permitindo um tratamento da amostra antes da quantificação. Nos últimos anos tem sido estudada a aplicação dos MIPs para o tratamento de águas baseado nas capacidades de reconhecimento e separação de poluentes em matrizes aquosas. De acordo com o conhecimento do autor, não foram encontrados estudos relativos ao desenvolvimento de um MIP específico para a análise de galaxolide. Como tal, a principal motivação para a realização deste trabalho foi a de desenvolver um MIP seletivo ao *musk* galaxolide com o objetivo de ser utilizado como sorbente seletivo para a análise e ou remoção deste contaminante em águas reais.

1.2. Objetivos da tese

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um novo polímero molecularmente impresso para a extração seletiva de um *musk* policíclico (galaxolide) de matrizes aquosas, de forma a obter um método analítico capaz de competir com os atuais longos e dispendiosos métodos para análise deste composto.

Assim os objetivos específicos deste projeto foram:

- (i) A preparação e caracterização do MIP – o maior desafio foi a escolha dos componentes básicos mais adequados, do processo de polimerização, a otimização da formulação e do processo de extração do *template*.
- (ii) Desenvolvimento e validação de um método para a análise de galaxolide em amostras aquosas – após o desenvolvimento do MIP, este polímero foi estudado como sorbente para a extração de galaxolide em amostras aquosas, as quais podem colocar diferentes problemas, requerendo em alguns dos casos a aplicação de uma calibração externa – *matrix-matched calibration*.

1.3. Breve descrição de *musks*

Os PCPs incluem diferentes grupos de compostos, entre eles, filtros ultravioleta (filtros-UV), antimicrobianos, conservantes, siloxanos e os *musks*, sendo estes últimos explorados em maior pormenor ao longo deste tópico.

Os filtros-UV são frequentemente encontrados em protetores solares e outros produtos destinados à proteção contra a radiação ultravioleta – loções corporais, *sprays* para cabelo e champôs. São conhecidos pela sua natureza lipofílica, com valores de logaritmo de coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) entre 4 e 8 e também por exibirem uma estabilidade relativa face à degradação biótica (Díaz-Cruz e Barceló, 2009). Os compostos mais representativos desta classe são as benzofenonas (BPs), hidroxibenzofenonas (OH-BPs), o ácido *p*-aminobenzóico e os seus derivados, salicilatos, metoxicinamatos e benzimidazóis (Jiménez-Díaz *et al.*, 2014). No que diz respeito à toxicidade destes compostos, tem sido demonstrada uma atividade estrogénica bastante similar aos bem conhecidos compostos estrogénicos, como por exemplo o estradiol (Rodil *et al.*, 2008).

Os antimicrobianos são substâncias utilizadas para o combate às infeções, através da eliminação ou prevenção do crescimento de micróbios. Devido às suas propriedades, os

antimicrobianos são frequentes em sabonetes e cosméticos. Nesta classe destacam-se o *triclosan* (TCS) e o *triclocarban* (TCC). Atualmente, existe a suspeita que estes compostos possam ser tóxicos para as algas, podendo também contribuir para um aumento da resistência antimicrobiana (Chalew e Halden, 2009; Singer *et al.*, 2002).

Os conservantes representam uma classe de compostos adicionados aos produtos de consumo, como alimentos, bebidas, fármacos, com o objetivo de prevenir a sua decomposição por agentes microbianos ou alterações químicas. Os compostos mais usuais são os parabenos, caracterizados por pH neutro, ausência de odor, sem descoloração ou endurecimento. Até há bem pouco tempo não existiam indicações sobre a toxicidade destes compostos, contudo o uso de parabenos tem sido evitado devido à crescente evidência de atividade endócrina (Regueiro *et al.*, 2009).

Recentemente, os siloxanos foram introduzidos no grupo dos PCPs. Tratam-se de silicões orgânicos poliméricos com uma estrutura formada por unidades alternadas de silício e oxigênio com ramificações orgânicas ligadas aos átomos de silício. O mais comum nesta classe é o decametilciclopentasiloxano (D5), sendo aplicado em cremes corporais, condicionadores de cabelo e cosméticos. A sua aplicação tem, contudo, diminuído devido aos recentes estudos que sugerem que os siloxanos cíclicos possuem um efeito tóxico e também devido à deteção de quantidades consideráveis destes compostos no ambiente aquático (Horii e Kannan, 2008; Sparham *et al.*, 2008).

Os *musks* são uma classe de compostos orgânicos presentes nos produtos de cuidado e higiene pessoal como perfumes, cremes hidratantes, sabões e também produtos de limpeza, como detergentes. São vistos como fixadores de fragrâncias, permitindo manter os odores característicos deste tipo de produtos. Os *musks* podem ser de origem natural ou sintética, podendo ser classificados de acordo com a sua estrutura química.

Até ao final do séc. XIX, os *musks* naturais eram utilizados extensivamente na área da perfumaria. Estes *musks* eram de origem animal e eram obtidos principalmente a partir da glândula exócrina do cervo-almiscarado (*Moschus moschiferus*). A procura excessiva destes compostos por parte da indústria levou quase à extinção das espécies que lhe davam origem. As questões éticas, aliadas aos elevados custos associados e à incerteza de garantia no fornecimento levou à procura de uma alternativa, surgindo assim os *musks* sintéticos (Lu *et al.*, 2011; Sommer, 2004).

De acordo com a sua estrutura química, os *musks* sintéticos podem ser divididos em quatro classes: nitro *musks*, *musks* policíclicos, *musks* macrocíclicos e *musks* alicíclicos (Posada-Ureta *et al.*, 2012). A título de exemplo na Figura 1 são apresentadas estruturas referentes a cada uma das classes de *musks* sintéticos.

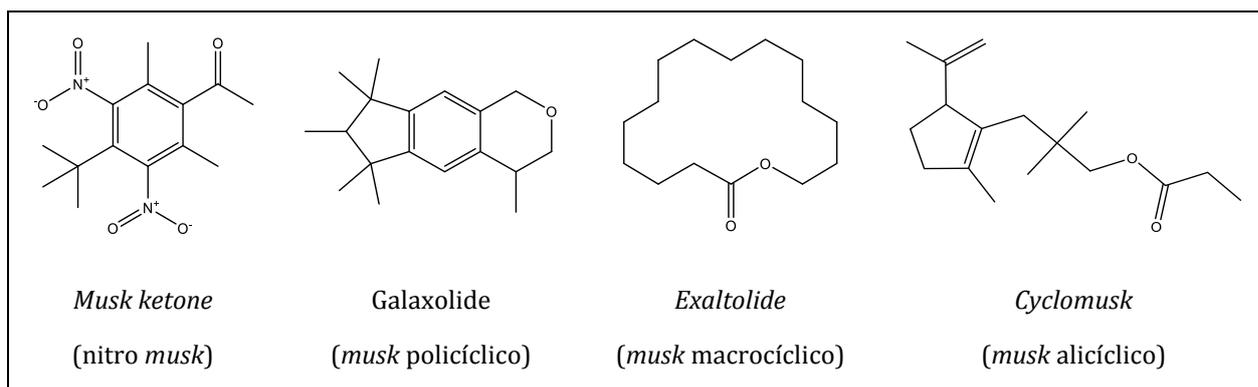


Figura 1. Exemplos de estruturas químicas de musks sintéticos

No ano de 1888 surgiram os nitro musks, quando Albert Baur sintetizou pela primeira vez o *musk moskene* (Pickthall, 1960). Dentro do grupo dos nitro musks estão incluídos o *musk tibetene*, *musk xylene*, *musk ambrette* e *musk ketone*. Esta classe de musks liderou o mercado de fixadores sintéticos durante vários anos, verificando-se uma diminuição significativa da sua utilização na década de 90 após a descoberta de propriedades bioacumulativas do *musk ketone* e *musk xylene* (Gatermann *et al.*, 2002) e de reações fotoalérgicas causadas pelo *musk ambrette* (Wojnarowska e Calnan, 1986). Nos dias que correm estes compostos requerem toda a atenção devido ao elevado risco que representam para o ambiente e saúde humana, potenciado pelas suas propriedades bioacumulativas e efeitos tóxicos.

Na década de 50, foi introduzido no mercado outro grupo, os musks policíclicos, com custos de produção inferiores e maior resistência à luz e a soluções alcalinas (Roosens *et al.*, 2007). Os principais musks pertencentes a este grupo são: galaxolide, tonalide, celestolide, traseolide, cashmeran e phantolide. As atenções ficaram viradas para este grupo, quando foi detetada a sua presença em águas superficiais (Dsikowitzky *et al.*, 2002), peixes (Gatermann *et al.*, 1999) e tecidos humanos (Kannan *et al.*, 2005). Atualmente o galaxolide e o tonalide representam os compostos mais utilizados no mercado. Pelo facto de se tratarem de compostos com ampla aplicação e pela facilidade com que atingem o ambiente e nele persistem, o galaxolide e o tonalide tem merecido especial atenção por parte da comunidade científica (Bester, 2009).

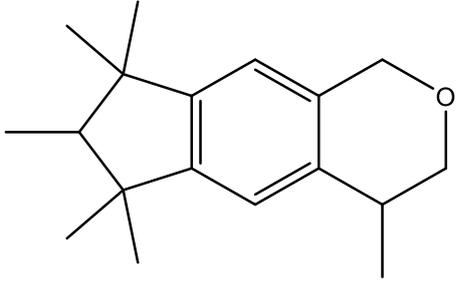
Relativamente aos musks macrocíclicos, o seu aparecimento no mercado deu-se na década de 90, constituindo uma alternativa aos nitro musks e aos musks policíclicos. De destacar as excelentes propriedades fixativas exibidas por esta classe de musks. Os musks macrocíclicos mais relevantes são: *ambrettolide*, *civetone*, *ethylene brassylate*, *exaltolide* e *musk muscone* (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002).

Por fim, os *musks* alicíclicos, surgiram em 1975, com a descoberta do *cyclomusk*, no entanto o primeiro composto introduzido no mercado foi o helvetolide, em 1990. Mais recentemente surgiu o romandolide, no entanto existe pouca informação acerca desta classe de *musks* (Eh, 2004).

1.4. Caracterização físico-química e persistência do galaxolide no ambiente

O galaxolide, como referido anteriormente, é o *musk* mais utilizado na indústria dos PCPs, com um elevado volume de produção e consumo. De acordo com as propriedades apresentadas na Tabela 1, o galaxolide é um composto semi-volátil que se destaca pelo carácter lipofílico comprovado pelo elevado coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}). Trata-se de um líquido viscoso, com baixa solubilidade em água.

Tabela 1. Estrutura química e propriedades físico-químicas do galaxolide (Balk e Ford, 1999).

	Propriedade	Resultado
	Estado físico	Líquido viscoso
	Massa molar	258,4 g.mol ⁻¹
	Ponto de fusão	-10 to 0 °C
	Ponto de ebulição	325 °C
	Densidade relativa	1,044 g.cm ⁻³ a 25 °C
	Pressão de vapor	0,0727 Pa
	Solubilidade em água	1,75 mg.L ⁻¹ a 25 °C
	Log K_{ow}	5,9

Como composto integrante de muitos dos produtos usados no nosso quotidiano, o galaxolide é continuamente libertado através dos efluentes domésticos, atingindo posteriormente as estações de tratamento de águas residuais (ETAR) (García-Jares *et al.*, 2002). As estações de tratamento convencionais envolvem quatro etapas de tratamento: preliminar, primário, secundário e terciário. No tratamento preliminar, ocorre a gradagem do afluente para separação de sólidos de maiores dimensões. Em seguida, dá-se a sedimentação dos sólidos suspensos num decantador, correspondendo ao tratamento primário. No tratamento secundário, são utilizados processos biológicos para remover a matéria orgânica biodegradável, por norma através do tratamento por lamas ativadas. Em muitas ETARs, esta representa a última etapa de tratamento antes da libertação do efluente no ambiente. Contudo, existem alguns casos em que se aplica um processo

adicional de tratamento, tratamento terciário. O objetivo desta etapa é remover resíduos de sólidos suspensos, contaminantes específicos e substâncias tóxicas. Alguns dos processos aplicados no tratamento terciário são baseados na osmose reversa, cloração, ozonização, degradação com radiação ultravioleta e adsorção em carvão ativado (Luo *et al.*, 2014; Tchobanoglous *et al.*, 2003). Apesar dos processos mencionados e tal como acontece para outro tipo de micropoluentes, as atuais ETARs não têm a capacidade de remover na totalidade o galaxolide proveniente das águas residuais. No caso particular deste composto, a remoção dá-se maioritariamente pela transferência de massa da fase líquida para a fase sólida, através da adsorção nas lamas (Simonich, 2005). No estudo conduzido por Kwon e Rodriguez (2014), foram monitorizadas as concentrações de 4 compostos, entre eles o galaxolide, em 3 ETARs dos Estados Unidos, durante um ano. No caso do galaxolide foram registadas concentrações entre 0,2 e 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o afluente. Após tratamento secundário com lamas ativadas, o efluente apresentou concentrações de galaxolide que variaram entre 0,1 e 1,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores concluíram assim que o galaxolide foi parcialmente removido nas 3 estações de tratamento analisadas, com taxas de remoção entre 50 e 76%. Nas análises realizadas a lamas foi possível verificar que as concentrações de galaxolide podem variar entre 1,4 e $7,0 \times 10^5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (peso seco) (Fookan, 2004; Homem *et al.*, 2015; Vallecillos *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2005).

De um modo geral pode-se considerar que as estações de tratamento de águas contribuem decisivamente para a contaminação de galaxolide no meio ambiente. A persistência nos efluentes que são descarregados diretamente nos meios aquáticos constitui um dos principais veículos para a introdução de galaxolide, o qual tem vindo a ser detetado em águas superficiais com concentrações que variam entre 9×10^{-5} e 14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (García-Jares *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010; Peck e Hornbuckle, 2004; Rimkus, 2004), águas subterrâneas com concentrações entre 2×10^{-3} e 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cabeza *et al.*, 2012; Teijon *et al.*, 2010) e também em águas de consumo, nas quais tem apresentado concentrações no intervalo 0,0022-0,09 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Benotti *et al.*, 2009; Vallecillos *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Wombacher e Hornbuckle, 2009). Uma vez no ecossistema aquático, o galaxolide pode entrar na cadeia alimentar facto confirmado pelos investigadores que reportaram a deteção de galaxolide em organismos marinhos (Fromme *et al.*, 2001; Kannan *et al.*, 2005). No estudo realizado por Nakata *et al.* (2012) foram analisados mexilhões marinhos (*Perna viridis* e *Mytilus edulis*) recolhidos em águas costeiras da Ásia e dos Estados Unidos, entre 2003 e 2007, tendo sido reportados níveis de galaxolide numa gama entre 0,1 e 3,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em base lipídica. Foi também concluído que os níveis mais elevados de galaxolide detetados nos mexilhões marinhos foram obtidos em locais próximos de estações de tratamento de água residual.

A adsorção de galaxolide em lamas ativadas e a posterior utilização das mesmas como fertilizante em terrenos agrícolas pode causar a contaminação de solos e colheitas, tendo também

como consequência a introdução deste contaminante na cadeia alimentar. Yang e Metcalfe (2006) analisaram a dessorção de galaxolide retido em lamas ativadas destinadas à aplicação em campos de cultivo. Inicialmente as lamas apresentavam uma concentração de galaxolide igual a $469,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (massa seca). No dia seguinte à aplicação, foi detetada uma concentração de $2,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (massa seca) nas amostras de solo, o que permitiu confirmar a migração deste composto para o solo. Passados 6 meses da aplicação, o galaxolide foi ainda detetado no solo, confirmando a persistência deste composto. Num estudo realizado por Macherius *et al.* (2012), foi investigada a absorção de galaxolide por plantações de cenouras, cevada e fescua após cultivo em solos previamente contaminados. Assim, foram detetados níveis de galaxolide entre 0,22 e $4,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ (massa seca) nas cenouras, $0,81 \mu\text{g.g}^{-1}$ (massa seca) na cevada e $1,77 \mu\text{g.g}^{-1}$ (massa seca) na fescua. Estes resultados colocam em evidência a possibilidade de introdução do galaxolide na cadeia alimentar, a qual resulta da utilização de biosólidos como agentes fertilizantes e corretivos agrícolas.

Devido à natureza semi-volátil, aliada à utilização significativa em produtos de consumo, o galaxolide foi também detetado em amostras de ar e pó (Fromme *et al.*, 2004; Peck e Hornbuckle, 2006). Perante a exposição humana ao galaxolide, é possível encontrar na literatura a avaliação dos níveis deste composto em amostras humanas (Hutter *et al.*, 2009; Reiner *et al.*, 2007; Schiavone *et al.*, 2010). Kang *et al.* (2010) avaliaram a exposição fetal e maternal com a determinação dos níveis de galaxolide em amostras de sangue do cordão umbilical, soro e leite materno, para uma população da Coreia do Sul. Os autores descrevem ter encontrado concentrações de galaxolide entre 0,5 e $2,1 \mu\text{g.g}^{-1}$, sendo que os níveis mais baixos foram registados para o leite materno. Num estudo que envolveu análises ao sangue de jovens estudantes numa Universidade de Viena, Hutter *et al.* (2009), detetaram uma concentração máxima de galaxolide superior a $4 \mu\text{g.L}^{-1}$, o que confirmou um elevado nível de exposição a este composto.

A deteção de galaxolide em seres humanos apontou desde logo para a necessidade de estudos de avaliação de risco associados à exposição deste *musk*. Tal como referido anteriormente, os seres humanos podem ser expostos ao galaxolide, por exemplo, através da absorção dérmica, ingestão de alimentos contaminados ou mesmo por inalação (Müller *et al.*, 1996). Na literatura é possível encontrar alguns estudos sobre a avaliação de risco referente à exposição humana ao galaxolide. No estudo realizado por Zhang *et al.* (2011), é avaliada a magnitude da exposição de crianças a *musks* através da ingestão de leite materno. De acordo com este estudo foi possível verificar que crianças entre os 3 e os 6 meses de idade estavam sujeitas a uma ingestão diária de $0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (peso corporal) de galaxolide. Esta exposição era, contudo, inferior ao valor tolerável de ingestão diária, que se situava nos $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (peso corporal) (Slanina, 2004). Assim foi

possível concluir que a exposição destas crianças a este contaminante via leite materno era considerada baixa. Por sua vez, Trabalón *et al.* (2015) analisou a exposição da população da Catalunha (Espanha) a *musks* através do consumo de peixe. Neste estudo o galaxolide representou o *musk* mais detetado em 10 espécies marinhas, o que conduziu a um valor de exposição diária de 0,019 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (peso corporal). Considerando os valores máximos de segurança de 1500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (peso corporal) (ECHA, 2008) os autores concluíram que o risco associado à exposição por ingestão de peixe era bastante reduzido.

Embora a relevância dos estudos mencionados anteriormente considera-se que a principal via de exposição ao galaxolide ocorre por absorção dérmica após aplicação direta de produtos de higiene e cuidado pessoal. Em estudos envolvendo um conjunto de produtos de uso diário foram reportados valores de exposição ao galaxolide entre 17 e 23700 $\mu\text{g.dia}^{-1}$ (Lu *et al.*, 2011; Roosens *et al.*, 2007). De acordo com Ford *et al.* (1999) cerca de 1% da quantidade aplicada para estes produtos é absorvida pelo organismo, o que poderá representar uma absorção diária de galaxolide entre 0,17 e 237 μg para os estudos apresentados anteriormente.

Tal como acontece com os *musks* sintéticos, o galaxolide é considerado disruptor endócrino, isto é, capaz de interagir com o sistema hormonal. A investigação revelou que este composto demonstra potencial para se ligar aos recetores de estrogénio nas células, podendo exibir comportamento estrogénico ou anti estrogénico conforme o tipo de célula e o tipo de recetor (Schreurs *et al.*, 2002). Apesar disso, o relatório elaborado pela Agência Química Europeia (ECHA) reporta a existência de um baixo risco para a saúde humana em resultado dos níveis de exposição diários. No entanto, a persistência deste contaminante no meio ambiente bem como a sua capacidade de bioacumulação poderão vir a representar um sério risco para a saúde humana.

1.5. Métodos analíticos para quantificação de galaxolide em águas

De acordo com o objetivo principal deste trabalho, realizou-se um levantamento bibliográfico focado nos métodos analíticos existentes para a extração e quantificação de galaxolide em matrizes aquosas. Dados os baixos níveis em que este composto é detetado são necessárias técnicas de extração para uma purificação das amostras e pré-concentração do analito. As técnicas mais comuns para a extração de galaxolide em águas são a extração líquido-líquido (LLE), microextração em fase sólida (SPME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e extração em fase sólida (SPE). No que diz respeito ao método de deteção e quantificação, a

cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) é sem dúvida a mais usada. Na Tabela 2 são apresentados os principais métodos descritos na literatura para a análise de galaxolide em águas. De referir que os métodos apresentados foram desenvolvidos para análise de uma ou mais classes de PCPs e que os parâmetros apresentados se referem exclusivamente ao galaxolide.

A preparação das amostras de água é caracterizada pela extração e subsequente etapa de *clean-up*, dependendo do tipo de matriz. De acordo com a Tabela 2, uma das técnicas de extração mais usuais é a extração clássica líquido-líquido, que consiste na separação de componentes através de duas fases líquidas imiscíveis. Por exemplo, Lee *et al.* (2010) aplicaram 100 mL de diclorometano, seguido de n-hexano para a extração de *musks* em águas de rio, com análise por GC-MS. Com esta técnica, os autores conseguiram obter recuperações médias de 87% para o caso particular do galaxolide. Num outro estudo, Gómez *et al.* (2009) realizaram uma extração em duas etapas utilizando 100 e 50 mL de n-hexano para a extração de PCPs em águas provenientes de estações de tratamento e águas de rio, também analisadas por GC-MS. Em comparação com o estudo anterior, foi utilizado um volume superior de solvente de extração, para níveis de galaxolide numa ordem de grandeza inferior, tendo sido obtida uma percentagem de recuperação média de 117%. Apesar destes resultados importa ressaltar que a técnica de LLE apresenta algumas desvantagens tais como elevado consumo de solvente e dificuldade de automação.

Outra das técnicas clássicas utilizadas para a extração de galaxolide em águas é a extração em fase sólida (SPE). Neste tipo de extração, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, após passagem por uma fase sólida (adsorvente), constituída por partículas porosas de pequenas dimensões. Trata-se de uma técnica mais rápida, eficiente, caracterizada por uma elevada reprodutibilidade nos resultados e por utilizar menor quantidade de solventes relativamente à técnica de LLE.

Na aplicação da técnica de SPE para a extração de *musks* em amostras de água, Lv *et al.* (2009) testaram dois tipos de sorbentes comerciais, ENVI-18 e LC-18 (sorbentes de fase reversa). Apesar de se tratarem de dois sorbentes de fase reversa, os autores encontraram diferenças significativas na performance de cada um. Assim, para os compostos em análise, foram obtidas recuperações mais elevadas com o sorbente ENVI-18, o que foi atribuído a um teor mais elevado em carbono, que resultou numa maior capacidade de sorção. No caso do galaxolide, para uma fortificação de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, o sorbente ENVI-18 permitiu uma recuperação de 90,4%, ao que passo que o outro sorbente apenas permitiu uma recuperação de 42,4%. As condições ótimas para a extração foram obtidas para um pH de 7 e uma eluição com n-hexano, seguido de uma mistura de n-hexano com diclorometano (1:1, v/v).

Numa outra vertente, Vallecillos *et al.* (2014), propuseram a aplicação da técnica de SPE em modo *online*, para a determinação de *musks* em águas residuais. Neste estudo os autores fizeram

também a comparação de dois sorbentes, C18 e Oasis HLB, o qual é constituído por um copolímero de divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona. Como solvente de eluição foi utilizado o acetato de etilo. Na comparação dos dois sorbentes foram obtidas recuperações médias de 80% com a Oasis HLB, enquanto que o sorbente C18 conduziu a recuperações médias de 50% para os compostos em análise. No caso particular do galaxolide esta diferença é ainda mais significativa, com recuperações próximas de 100% para Oasis HLB e 25% para o C18. Com um balanço adequado de propriedades hidrofílicas-lipofílicas o sorbente Oasis-HLB, demonstrou ser mais eficiente para a extração de galaxolide.

Alguns autores descrevem também a aplicação da técnica de microextração em fase sólida (SPME) para a monitorização de amostras de água. Esta técnica permite uma preparação rápida e eficiente de amostras aquosas com fibras revestidas com um material adsorvente, que são introduzidas no *headspace* ou diretamente na fase aquosa para pré-concentração do analito, sendo posteriormente dessorvido no injetor do equipamento de cromatografia gasosa. Winkler *et al.* (2000), testaram quatro tipos de fibras - polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), poliacrilato, carboxen e polidimetilsiloxano (PDMS) - para a extração de *musks* em águas de rio numa gama de trabalho entre 25 e 260 ng.L⁻¹. Segundo estes, as fibras compostas por PDMS-DVB conduziram a recuperações relativas mais elevadas do que as restantes fibras em estudo. Contudo, após a aplicação a amostras reais, a extração com SPME apenas permitiu recuperações entre 45 e 50% para o galaxolide. Segundo os dados apresentados, estes valores poderiam ser superiores caso os autores optassem por tempos de extração superiores. Num outro exemplo, Wang e Ding (2009) descrevem a combinação de micro-ondas com a técnica de SPME para a extração de *musks* em águas de estações de tratamento. A *performance* da extração do micro-ondas é alvo de comparação com a técnica convencional de aquecimento em banho de óleo. Os autores utilizaram uma fibra de PDMS-DVB, concluindo que a irradiação de micro-ondas durante a aplicação do SPME permitia uma extração cerca de duas vezes superior à obtida com um banho de óleo. Da aplicação desta metodologia resultou uma recuperação de galaxolide na ordem de 89% para as águas provenientes de estações de tratamento. Relativamente aos níveis de galaxolide foram obtidas concentrações entre 1,2 e 37,3 ng.L⁻¹ na análise preliminar de águas residuais. Não sendo possível realizar uma comparação com o estudo anterior dada a diferença relativamente aos níveis analisados, fica a opção pelas fibras de PDMS-DVB como material mais adequado para extração de amostras aquosas com SPME.

Baseado no mesmo princípio que o SPME é também descrita a aplicação da técnica de extração sorptiva em barra de agitação (SBSE) na extração de galaxolide em matrizes aquosas. Esta técnica tem como vantagem uma maior capacidade e eficiência de extração como resultado da utilização de uma quantidade superior de adsorvente que é aplicado a uma barra de agitação que vai

contactar com a respetiva amostra. No seu estudo, Ramírez *et al.* (2011) descrevem a aplicação de uma barra de agitação revestida com PDMS para a extração de *musks*. Após 4 h de processo de extração, os compostos foram dessorvidos termicamente para o equipamento analítico (GC-MS) para posterior análise. A aplicação desta técnica para a extração de águas de rio e de estação de tratamento permitiu comprovar a eficiência desta metodologia com recuperações num intervalo entre 92,1 e 93,3% para o galaxolide.

Uma das tendências na química analítica é o uso da miniaturização para redução do volume de solventes orgânicos e assim poder reduzir o impacto ambiental. Exemplos típicos dessa miniaturização são as técnicas de DLLME, microextração em gota única com líquido iónico (IL-SDME) e microextração por emulsificação assistida por ultra-sons (USAEME), as quais têm também sido aplicadas na extração de galaxolide de águas.

Na DLLME, destaca-se uma superfície de contacto considerável entre o solvente de extração e a fase aquosa, o que permite aumentar a eficiência de extração e assim diminuir quer o volume de solvente, quer o tempo de extração. Contudo, esta técnica tem como desvantagem a utilização de um solvente de dispersão que usualmente diminui o coeficiente de partição dos analitos para o solvente de extração. Panagiotou *et al.* (2009) utilizaram a técnica de DLLME para a extração de PCPs em diferentes tipos de água: rio, mar e lago. Relativamente à análise de galaxolide os autores registaram recuperações entre 84,1 e 92,9% para os tipos de águas analisados.

A técnica de IL-SDME destaca-se pela simplicidade de operação, rapidez, precisão e com reduzido impacto ambiental (Vidal *et al.*, 2010). Vallecillos *et al.* (2012) realizaram uma comparação dos parâmetros de validação após IL-SDME e com diferentes técnicas de microextração, como microextração por sorbente empacotado (MEPS), SPME ou DLLME, para a extração de *musks* em águas provenientes de estações de tratamento, utilizando como método cromatográfico o GC-MS. Com respeito ao galaxolide, não é dado qualquer tipo de informação relativamente às recuperações do método, contudo foi possível verificar que os limites de deteção obtidos com a técnica IL-SDME se encontravam próximos dos obtidos para as técnicas de DLLME e MEPS. Apesar disso, a metodologia apresentada revelou limites mais elevados do que os registados para a técnica de SPME.

Relativamente à técnica USAEME é possível destacar como principal característica a velocidade associada ao processo de transferência de massa pelo uso do ultra-sons. Na aplicação desta técnica para a extração de vários tipos de poluentes emergentes em diferentes tipos de águas (torneira, garrafa, piscina, mar), Regueiro *et al.* (2008) obtiveram recuperações de galaxolide entre 86 e 113%, com clorofórmio, em apenas 10 min de extração.

Como demonstrado na Tabela 2, o método cromatográfico mais comum para a detecção e quantificação de galaxolide em águas é o GC-MS, o que se justifica pelas propriedades do composto, entre elas a sua semi-volatilidade (Bester, 2009). Nos estudos analisados foi também possível encontrar uma referência à análise de galaxolide por cromatografia líquida. Esse exemplo foi encontrado no estudo realizado por Sun *et al.* (2014) onde é descrita a utilização do LC-MS/MS para a análise de *musks*, em águas de efluente de ETAR, após extração por SPE.

Analisando os limites de detecção (LODs) atingidos pela combinação da detecção por GC-MS com as técnicas de extração apresentadas anteriormente pôde ser observado que LODs mais baixos foram obtidos após extração por SPME (0,05 ng.L⁻¹), seguido das técnicas SPE e SBSE com 0,25 e 0,3 ng.L⁻¹, respetivamente. Por sua vez, o LOD mais elevado foi registado após extração por SDME, com um valor de 24 ng.L⁻¹.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos diversos métodos analíticos para a extração e determinação de *musks* em matrizes aquosas. No caso particular do galaxolide, a combinação de técnicas clássicas de extração ou mesmo de técnicas de microextração com equipamentos analíticos mais poderosos como é o caso do GC-MS e do LC-MS, têm permitido aos investigadores atingirem limites de detecção cada vez mais baixos de forma a assegurar a análise deste contaminante. No entanto, apesar destes métodos analíticos permitirem obter valores interessantes de recuperação juntamente com baixos limites de detecção, deve ser enfatizado que todas as técnicas consideradas apresentam como principal desvantagem a ausência de seletividade, o que mesmo após um cuidado processo de otimização, poderá implicar a co-eluição de componentes presentes na matriz com o(s) analito(s) alvo(s). Para além disso, nos casos estudados, estas técnicas necessitam de ser acopladas a equipamentos analíticos dispendiosos, os quais requerem técnicos especializados para que possam ser operados. Mais recentemente os investigadores têm virado a atenção para os polímeros impressos molecularmente (MIPs), constituídos por cavidades específicas capazes de se ligarem à molécula alvo, na presença de compostos similares ou mesmo de interferentes. Em contraste com os métodos já existentes, os MIPs possuem vantagens como facilidade e baixo custo de preparação. Para além disso, são caracterizados por uma elevada estabilidade, resistência a condições extremas de pressão e temperatura, mas são sobretudo atrativos pela possibilidade de aplicação a uma grande variedade de moléculas alvo (Vasapollo *et al.*, 2011). Nos próximos subcapítulos será apresentada uma visão global sobre os MIPs, com ênfase nos aspetos fundamentais para a preparação e caracterização destes materiais. Em seguida serão analisadas e discutidas as suas principais aplicações para o caso particular dos PCPs. Finalmente será apresentada uma breve discussão sobre as perspetivas e desafios na aplicação destes polímeros para a remediação de águas.

Tabela 2. Métodos analíticos para a determinação de galaxolide em águas.

Matriz	Técnica de Extração	Técnica analítica	Parâmetros analíticos	Ref.
Águas de Estação de Tratamento	LLE; Solvente de extração – n-pentano e diclorometano	GC-MS	LOD – 0,5 ng.L ⁻¹	(Ricking <i>et al.</i> , 2003)
Águas de Rio e de Estação de Tratamento	LLE; Solvente de extração – n-pentano e diclorometano	GC-MS	-	(Dsikowitzky <i>et al.</i> , 2004)
Águas de Rio e de Estação de Tratamento	LLE; Solvente de extração - Tolueno	GC-MS	Rec – 75% LOQ – 3 ng.L ⁻¹	(Bester, 2005)
Água de Rio	LLE; Solvente de extração – Tolueno	GC-MS	Rec – 75% LOQ – 3 ng.L ⁻¹	(Bester <i>et al.</i> , 2008)
Águas de Estação de Tratamento	LLE; Solvente de extração – n-hexano	GC-MS	Rec – 117% LOD – 17 ng.L ⁻¹	(Gómez <i>et al.</i> , 2009)
Água de Rio	LLE; Solvente de extração – Diclorometano e n-hexano	GC-MS	Rec – 87% LOD – 5 ng.L ⁻¹ LOQ – 10 ng.L ⁻¹	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
Água de Rio	SPE (C18); Eluente - Metanol	GC-MS	Rec – 82% LOD < 1 ng.L ⁻¹	(Standley <i>et al.</i> , 2000)
Água de Lago	SPE (XAD-2); Eluente - Metanol	GC -MS	-	(Peck e Hornbuckle, 2004)
Águas de Estação de Tratamento	SPE (Nexus); Eluente – Acetato de Etilo e n-hexano	GC-MS	-	(Osemwengie e Gerstenberger, 2004)
Águas de Estação de Tratamento	SPE (Discos C18); Eluente – n-hexano e n-hexano:diclorometano	GC-MS	Rec – 77,8% LOQ – 4 ng.L ⁻¹	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
Águas de Consumo, Subterrânea, Rio e de Estação de Tratamento	SPE (Envi-18); Eluente – n-hexano e diclorometano	GC-MS	Rec – 92,0 a 95,1% LOD – 1,5 ng.L ⁻¹ LOQ – 5 ng.L ⁻¹	(Lv <i>et al.</i> , 2009)
Água de Consumo	SPE (Oasis-HLB); Eluente – Acetona e n-hexano	GC-MS	Rec > 90% LOD – 0,25 ng.L ⁻¹	(Wombacher e Hornbuckle, 2009)

Tabela 2. Métodos analíticos para a determinação de galaxolide em águas (continuação).

Matriz	Técnica de Extração	Técnica analítica	Parâmetros analíticos	Ref.
Água de Rio	SPE (Strata - X); Eluente - Acetato de etilo	GCxGC/TOF-MS	Rec - 88% LOD - 6 ng.L ⁻¹ LOQ - 9 ng.L ⁻¹	(Matamoros <i>et al.</i> , 2010)
Águas de Estação de Tratamento	SPE (C18); Eluente - Diclorometano	LC-MS/MS	Rec - 91% LOQ - 0,25 µg.L ⁻¹	(Sun <i>et al.</i> , 2014)
Águas de Estação de Tratamento	On-line SPE (Oasis-HLB); Eluente - Acetato de etilo	GC-MS	Rec > 90% LOD - 1,5 a 2 ng.L ⁻¹	(Vallecillos <i>et al.</i> , 2014)
Águas de Estação de Tratamento	HS - SDME	GC - IT - MS/MS	LOD - 0,024 µg.L ⁻¹ LOQ - 0,07 µg.L ⁻¹	(Vallecillos <i>et al.</i> , 2012)
Águas de Estação de Tratamento	SBSE (PDMS)	GC-MS	Rec - 92,1 a 93,3% LOD - 0,3 ng.L ⁻¹ LOQ - 1 ng.L ⁻¹	(Ramírez <i>et al.</i> , 2011)
Água de Rio	SPME (PDMS)	GC-MS	LOD < 5 ng.L ⁻¹ LOQ - 10 ng.L ⁻¹	(Heberer <i>et al.</i> , 1999)
Água de Rio	SPME (PDMS-DVB)	GC-MS	Rec - 45 a 50% LOD - 22 ng.L ⁻¹	(Winkler <i>et al.</i> , 2000)
Águas de Estação de Tratamento	SPME (PDMS)	GC-MS	Rec - 85 a 106% LOD - 0,1 ng.L ⁻¹	(Artola-Garicano <i>et al.</i> , 2003)
Águas de Estação de Tratamento	MA-HS-SPME (PDMS-DVB)	GC-MS	Rec - 89% LOD - 0,05 ng.L ⁻¹ LOQ - 0,2 ng.L ⁻¹	(Wang e Ding, 2009)
Águas de Rio, Mar e Lago	DLLME; Solvente de dispersão - Metanol Solvente de extração - Tetracloroeto de carbono	GC-MS	Rec - 84,1 a 92,9% LOD - 53 ng.L ⁻¹	(Panagiotou <i>et al.</i> , 2009)
Águas de Consumo, Piscina, Mar e de Estação de Tratamento	USAEME; Eluente - clorofórmio	GC-MS	Rec - 86 a 113% LOD - 7 ng.L ⁻¹ LOQ - 23 ng.L ⁻¹	(Regueiro <i>et al.</i> , 2008)

Notas: LOD - limite de deteção; LOQ - limite de quantificação; Rec - % de recuperação.

1.6. Impressão Molecular – Introdução

O conceito de impressão molecular foi originalmente proposto pelo químico soviético M. V. Polyakov, em 1931, que reportou o efeito de diferentes solventes no processo de adsorção numa estrutura de sílica porosa (Polyakov, 1931). Após a formação do gel de sílica, os aditivos foram removidos da matriz através de longos processos de lavagem. O estudo das propriedades adsorptivas da sílica revelaram uma afinidade significativa para com os aditivos utilizados no processo de síntese. Mais tarde, em 1949, Franck Dickey descreve um método para a preparação de adsorventes com uma apreciável afinidade para determinadas substâncias (Dickey, 1949). Segundo Dickey, o adsorvente era formado na presença de um composto particular que permitia a formação de espaços capazes de reter as moléculas desse mesmo composto. Esta retenção baseava-se em interações intermoleculares como forças de van der Waals, ligações de hidrogénio e forças iónicas.

É geralmente referido que a nova era da impressão molecular surge nos anos setenta com os estudos de Wulff e Sarhan (Wulff e Sarhan, 1972) e mais tarde de Arshady e Mosbach, no início dos anos oitenta (Arshady e Mosbach, 1981). Estas contribuições levaram a um aumento do interesse pela área da impressão molecular, resultando numa abundância da literatura sobre esta temática.

O processo de impressão molecular (Figura 2) inicia-se com a adição de uma molécula de *template* (T) a um monómero funcional (M) na presença de um solvente, designado por solvente porogénico. As condições e as razões estequiométricas são otimizadas para que a interação entre *template* e monómero possa ser maximizada. A formação do complexo *template*-monómero (pré-polímero) pode ser obtida de acordo com diferentes abordagens, que serão objeto de discussão na secção 1.7.

Em seguida um agente formador de ligações cruzadas, designado por *cross-linker* (CL), juntamente com um iniciador orgânico, são adicionados à mistura anterior para produzir uma estrutura polimérica que irá conter o complexo *template*-monómero na sua matriz.

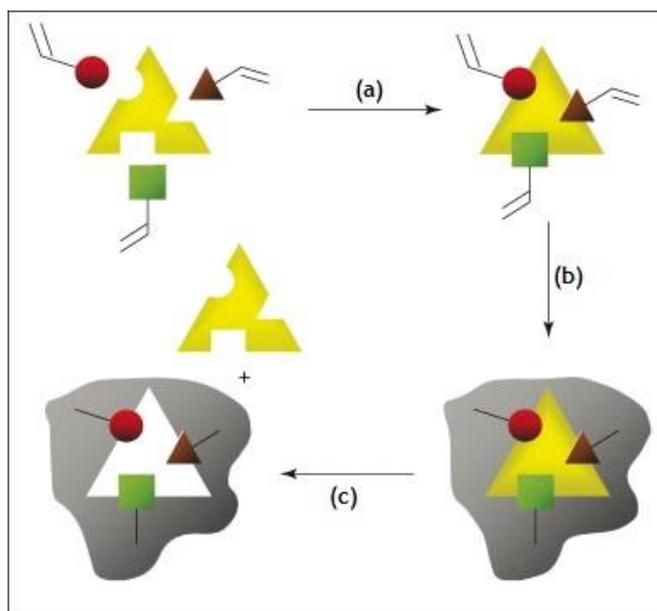


Figura 2. Etapas fundamentais da impressão molecular: **(a)** formação de um complexo entre o *template* (amarelo) e monómeros funcionais (vermelho, verde e castanho); **(b)** polimerização do complexo na presença do *cross-linker*, **(c)** extração do *template* para a obtenção de cavidades específicas com capacidade para se ligar ao analito-alvo. Adaptado de (Ge e Turner, 2008).

O mecanismo mais comum na síntese destes polímeros é a polimerização radicalar, que envolve três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. Na primeira etapa (Figura 3a), o iniciador é decomposto através de energia térmica ou fotoquímica em radicais livres, ou seja, moléculas que contêm átomos com elétrons desemparelhados. Estes radicais livres são posteriormente adicionados a unidades de monómero, iniciando a etapa de propagação. Durante esta segunda etapa (Figura 3b), as unidades iniciadas vão adicionando outros monómeros numa sucessão rápida. O centro ativo é continuamente recolocado no fim da cadeia em crescimento. A propagação prossegue até à etapa de terminação que pode ocorrer por recombinação (Figura 3c1), quando duas cadeias em crescimento reagem entre si, ou por desproporção (Figura 3c2) quando um átomo instável se transfere de uma cadeia polimérica radicalar para outra.

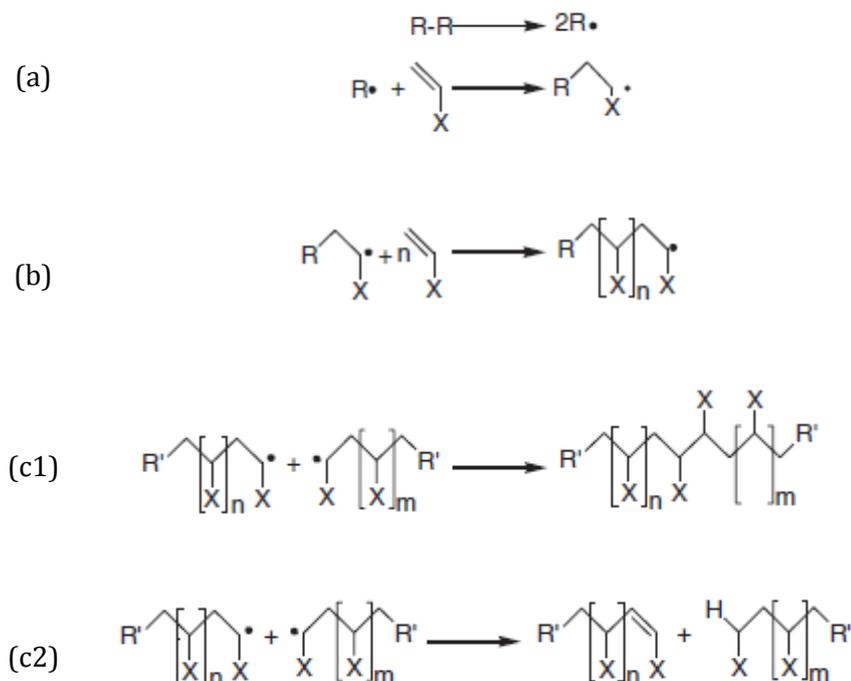


Figura 3. Mecanismo geral da polimerização radicalar, adaptado de (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013).

Uma etapa crítica na preparação dos polímeros impressos molecularmente (MIP) é a remoção do *template* da sua estrutura, dado que a formação de cavidades específicas ocorre apenas após o processo de extração das moléculas de *template* utilizado na síntese do polímero. A eficiência desta extração pode ser condicionada por fatores como a solubilidade no solvente de extração e o grau de ligações cruzadas existente na estrutura polimérica. A maioria dos estudos relativos ao desenvolvimento de MIPs refere que o processo de extração decorre até ao momento em que os métodos de análise empregues não conseguirem detetar a presença de *template* no extrato. Contudo, é aconselhável a avaliação da quantidade de *template* extraído, uma vez que a extração incompleta poderá resultar numa redução do número de cavidades disponíveis para receber o analito, ou mesmo em erros analíticos provocados por uma libertação não controlada do *template* que possa permanecer no polímero após extração (*bleeding*) (Lorenzo *et al.*, 2011).

Após a etapa de extração, formam-se sítios ativos específicos, complementares em forma, tamanho e grupos funcionais relativamente ao *template*. Depois de formados, estes sítios ativos ficam disponíveis para estabelecer o reconhecimento e ligação ao analito, que em muitos dos casos corresponderá ao próprio *template*. Segundo as publicações relativas à impressão molecular, a capacidade de ligação poderá ser maximizada se o conjunto analito e MIP estiver na presença do solvente utilizado no decorrer do processo de polimerização (Sellergren, 2000).

1.7. Abordagens para a preparação de polímeros impressos molecularmente

Atualmente podem destacar-se dois tipos principais de abordagem para a preparação de polímeros impressos molecularmente, a covalente e a não-covalente. Para além destas podem encontrar-se abordagens alternativas e menos usuais como a semi-covalente e a mediada por metais. A classificação de cada uma das abordagens é baseada na forma como o monómero interage com o *template* e no subsequente tipo de interação entre o analito e a matriz polimérica. Em seguida é apresentada uma análise sobre cada uma destas estratégias referindo os pontos fortes e respetivas desvantagens.

1.7.1. Abordagem covalente

A abordagem covalente envolve uma ligação covalente entre monómero e *template* para a formação do complexo. Este complexo, também denominado por pré-polímero é posteriormente incorporado na matriz polimérica, sendo necessário recorrer a processos químicos, como a hidrólise, para a extração do respetivo *template*. O subsequente processo de reconhecimento será também baseado no estabelecimento de ligações covalentes entre analito e polímero. Wulff e Sarhan (1972) foram os primeiros a desenvolver esta estratégia para a síntese de um MIP seletivo ao ácido D-glicérico. Os autores descreveram a copolimerização do complexo D-gliceril (*p*-vinilanilida)-2,3-O-*p*-vinilfenilborato com o divinilbenzeno (*cross-linker*), seguindo-se uma etapa de hidrólise para a extração do *template* e formação das cavidades específicas no MIP (Figura 4).

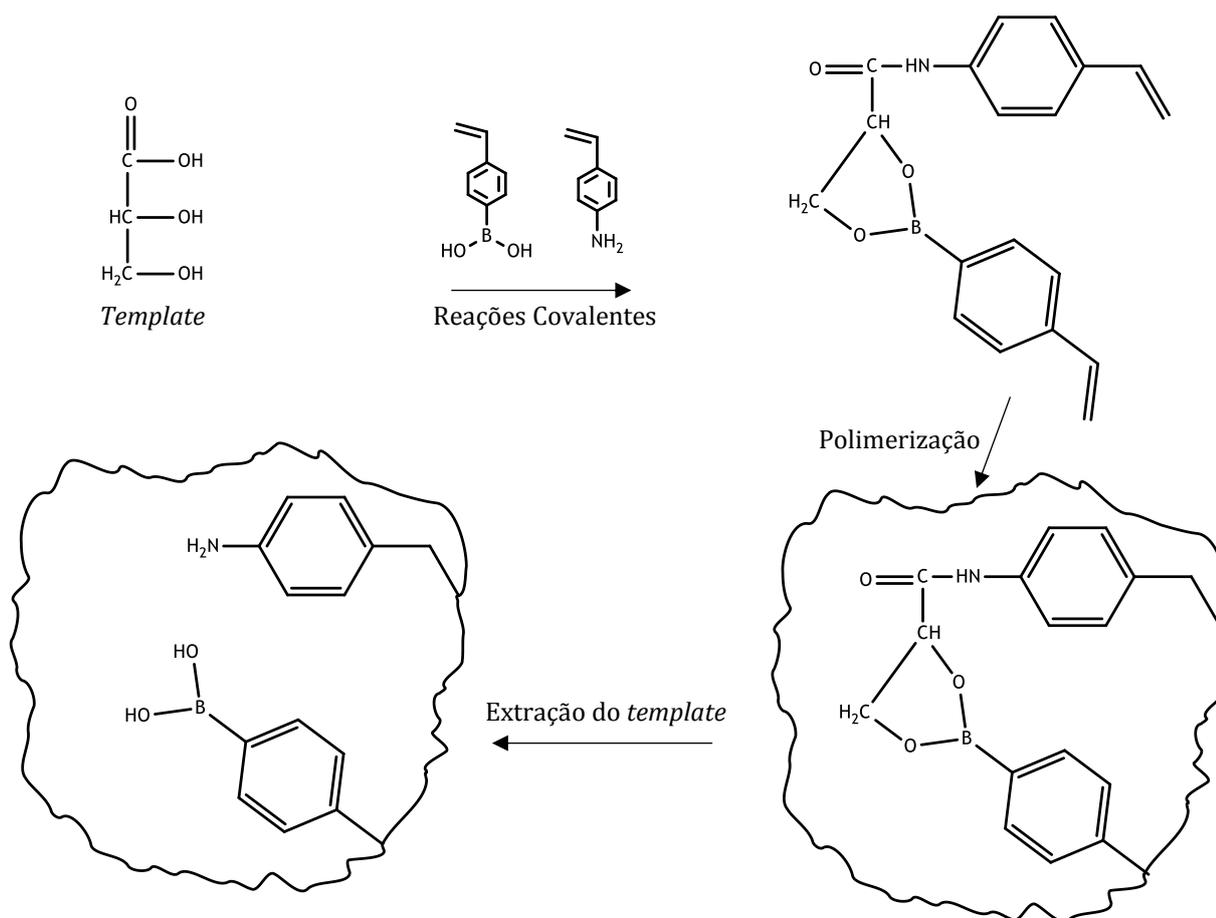


Figura 4. Abordagem covalente para a impressão molecular do ácido D-glicérico, desenvolvida por Wulff e Sarhan (1972).

Como principal vantagem desta abordagem destaca-se a estabilidade do complexo formado entre o *template* e o monómero, que permite aumentar a homogeneidade das cavidades produzidas, resultando numa redução significativa do número de interações não específicas. Contudo, esta abordagem é apenas aplicável a um número limitado de monómeros e *templates*, os quais devem apresentar funcionalidades adequadas. Por outro lado, após polimerização torna-se necessário a aplicação de processos químicos laboriosos para permitir a extração do *template* incorporado na matriz polimérica. Finalmente, os MIPs produzidos de acordo com esta abordagem demonstram uma cinética de ligação mais lenta, o que limita aplicabilidade dos polímeros (Pichon e Haupt, 2006).

1.7.2. Abordagem não-covalente

Em alternativa à abordagem covalente e às limitações apresentadas, Mosbach e o seu grupo de trabalho, propuseram uma abordagem não-covalente, a qual tem sido amplamente utilizada para a síntese de MIPs (Arshady e Mosbach, 1981). Nesta estratégia, o complexo *template*-monómero

é obtido através da formação de interações não-covalentes, como forças electroestáticas, ligações de hidrogénio ou forças de van der Waals.

Um dos mecanismos de interação mais importantes nesta abordagem é a formação de ligações de hidrogénio, em que o átomo de hidrogénio se liga a um átomo eletronegativo (maioritariamente oxigénio ou azoto). Os valores típicos de energia para as ligações de hidrogénio podem variar entre 10 a 40 kJ.mol⁻¹, bastante superiores às típicas interações baseadas em forças de van der Waals (1 kJ.mol⁻¹). No entanto, estas interações são consideravelmente inferiores às ligações covalentes que apresentam energias de ligação da ordem dos 500 kJ.mol⁻¹ (Selligren, 2000). Em comparação com a abordagem covalente, a natureza das interações na estratégia não-covalente facilitam o processo de remoção do *template*, o qual pode ser realizado através de uma simples extração com solvente por quebra das ligações intermoleculares. Esta estratégia é também vantajosa por ser compatível com uma grande variedade de monómeros comerciais, que podem interagir com um maior número de moléculas alvo. Outra das vantagens que caracterizam esta estratégia é a elevada cinética que permite que o polímero se ligue mais rapidamente ao analito. A abordagem não-covalente é também caracterizada pelo uso de excesso de monómero face ao *template*, o que poderá resultar na distribuição de monómero fora das cavidades e consequentemente aumentar as interações não específicas com o analito. Por outro lado, a estabilidade do complexo *template*-monómero é menor, dado a fragilidade das interações estabelecidas, o que poderá conduzir a um aumento da heterogeneidade das cavidades formadas no polímero.

Na Figura 5 apresenta-se um exemplo da abordagem não-covalente usada por Ramström *et al.* (1996) para a síntese de um MIP com o cortisol. Nesta representação, as moléculas de ácido metacrílico (monómero), interagem com o cortisol (*template*) através de ligações de hidrogénio, formando o complexo pré-polimérico. Os autores descrevem a utilização de uma razão estequiométrica entre *template* e monómero de 1:10, baseado na capacidade exibida pelo *template* para estabelecer ligações de hidrogénio. O complexo é posteriormente polimerizado na presença do dimetacrilato de etilenoglicol (*cross-linker*), seguindo-se a extração do *template* por lavagem com solvente. Após lavagem, o MIP revelou capacidade de se ligar novamente ao cortisol, mesmo na presença de compostos estruturalmente semelhantes ao analito. Apesar disso, os ensaios de reconhecimento molecular confirmaram a heterogeneidade das cavidades que, como referido anteriormente, se trata de um dos problemas encontrados nesta abordagem.

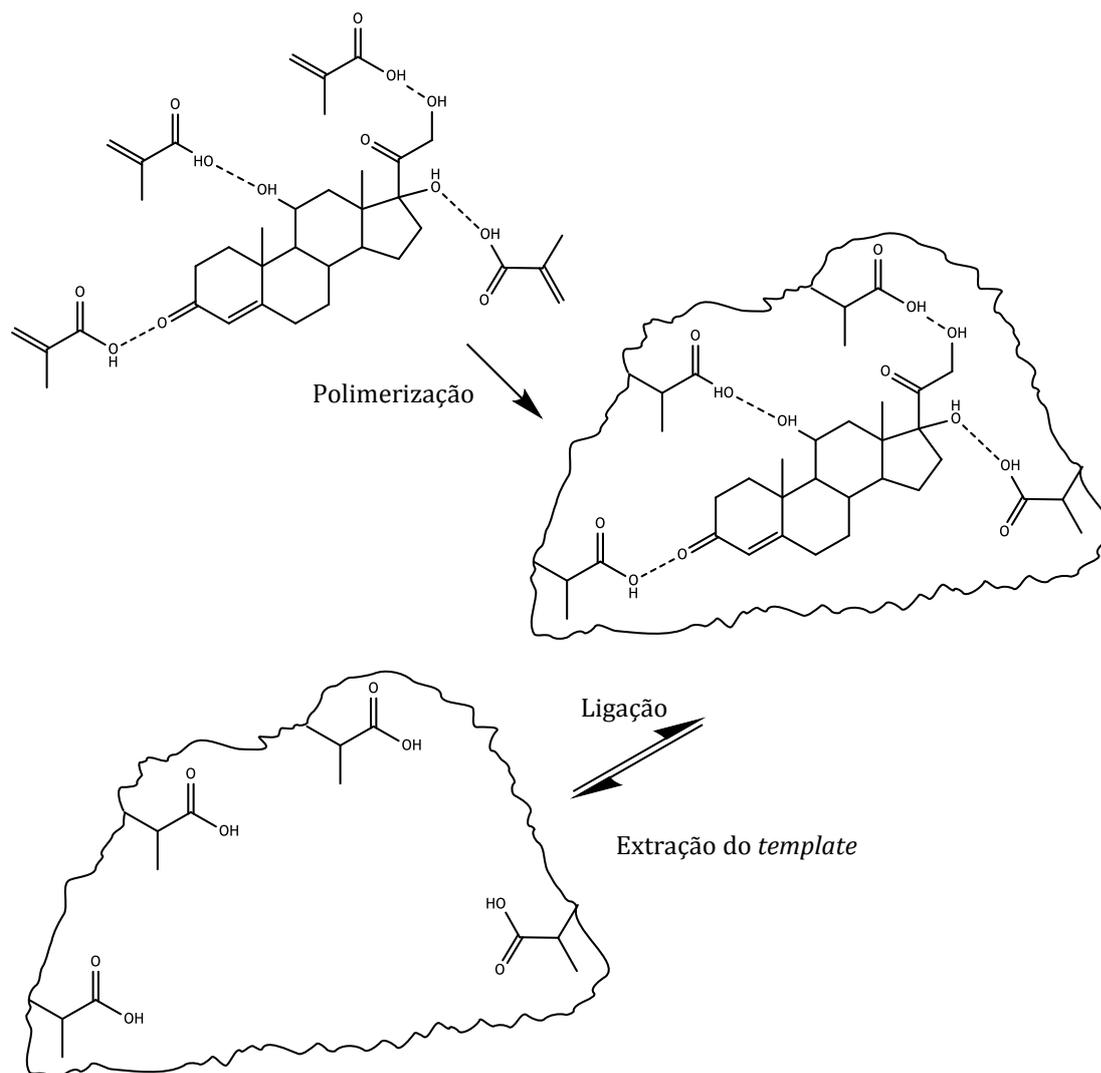


Figura 5. Abordagem não-covalente para a impressão molecular do cortisol. Adaptado de (Ramström *et al.*, 1996).

1.7.3. Abordagem semi-covalente

Whitcombe *et al.* (1995) propuseram a abordagem semi-covalente, que pode ser vista como uma estratégia híbrida que assenta no estabelecimento de interações covalentes entre *template* e monómero durante a pré-polimerização, com a subsequente ligação do polímero ao analito a basear-se em interações não-covalentes. Os autores propuseram o uso de um grupo ligante entre o *template* e o monómero que é posteriormente eliminado durante o processo químico aplicado para a remoção do *template*. Em geral, esta abordagem combina as vantagens e desvantagens das abordagens anteriores. Assim, permite a obtenção de um pré-polímero mais estável que irá resultar na formação de um MIP com uma cinética mais rápida com respeito ao analito. Por outro

lado, apresenta menor compatibilidade ao nível de monómeros e *templates*, para além de implicar a utilização de processos mais complexos para extração do *template* (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013).

A abordagem semi-covalente é exemplificada no estudo de Cacho *et al.* (2006), através da preparação de um MIP com propazina. Depois da formação do complexo entre a propazina (*template*) e o cloreto de metacrililo (monómero), realizou-se a polimerização na presença do dimetacrilato de etilenoglicol (*cross-linker*). No final, à semelhança da abordagem covalente, foi necessário extrair o *template* por hidrólise. Durante a caracterização do polímero, os autores fizeram uma comparação com outro MIP, produzido nas mesmas condições, mas de acordo com a abordagem não-covalente. Desta comparação foi interessante verificar que o MIP semi-covalente apresentou uma capacidade de adsorção 52% superior e cavidades com maior índice de homogeneidade. Apesar disso, os dados das isotérmicas demonstraram que a constante de afinidade (K_o , parâmetro obtido da aplicação do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados experimentais) do MIP semi-covalente foi bastante inferior à observada para o MIP não-covalente. Este resultado pode ser atribuído às razões estequiométricas de *template* e monómero usadas, que no caso do MIP não-covalente foram de 1:4 e de 1:1 no MIP semi-covalente. O excesso de monómero pode resultar na formação de complexos de ordem superior o que se traduz em cavidades altamente específicas no MIP não-covalente.

1.7.4. Abordagem mediada por metais

Os iões metálicos podem ser envolvidos no processo de impressão atuando como *templates* ou como parte da interação entre *template* e monómero funcional. A síntese de MIPs de acordo com esta abordagem pode seguir diferentes estratégias: (i) formação de ligações cruzadas com um reagente bifuncional contendo ligantes metálicos; (ii) copolimerização de complexos metálicos com um *cross-linker*; (iii) impressão à superfície na interface de emulsões água-óleo através de um rearranjo com monómeros funcionais que contém uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica.

Esta abordagem é bastante versátil, permitindo uma boa interação com diferentes moléculas biológicas. Ao contrário do que acontece nas ligações de hidrogénio e interações eletrostáticas, a interação metálica não é afetada pelo tipo de solvente utilizado na polimerização.

Hart e Shea (2001) sintetizaram um MIP para o reconhecimento de péptidos partindo de um complexo péptido-metal em solução aquosa. O ião metálico utilizado foi o níquel, enquanto que a acrilamida e o N,N'- etilenobis(acrilamida) foram utilizados como monómero e *cross-linker*, respetivamente. Os resultados indicaram que a utilização da água na reação de polimerização e na etapa de reconhecimento molecular se revelou vantajosa face aos sistemas orgânicos. Wu e Li

(2004) sintetizaram polímeros seletivos a três ácidos (fórmico, acético e propiônico) utilizando 4-vinilpiridina e dimetacrilato de etilenoglicol como monómero e *cross-linker*, respetivamente. Para tal, inicialmente prepararam complexos formados pelos ácidos em estudo e iões de cobre, seguindo a estratégia de coordenação metálica. Ao mesmo tempo utilizaram também a abordagem não-covalente para a impressão direta de cada um dos ácidos. No final os autores verificaram que a utilização de complexos metálicos conduziu a polímeros com maior capacidade de reconhecimento molecular, quando comparados com polímeros impressos diretamente com os respetivos ácidos. Segundo estes autores o método proposto pode ser encarado como uma solução para a dificuldade de impressão de pequenas moléculas e também para os problemas associados ao reconhecimento molecular em solventes polares.

1.8. Componentes e fatores que influenciam a síntese de MIPs

Antes da preparação de um MIP devem ser tidas em conta as principais variáveis experimentais envolvidas, entre elas, natureza e razões estequiométricas do *template*, monómero(s) funcional(ais), *cross-linker*, iniciador, solvente porogénico, método de iniciação e duração da polimerização. Sabe-se que estas variáveis possuem um impacto bastante significativo nas características químicas, morfológicas e propriedades de ligação exibidas pelo MIP. À luz da abordagem mais comum para a preparação de MIPs, ou seja, a não-covalente, segue-se uma análise sobre os principais componentes para a síntese de MIPs e reflexão sobre o seu impacto nas propriedades finais do polímero.

1.8.1. *Template*

O sucesso do processo de impressão molecular é significativamente influenciado pela qualidade das interações que se estabelecem entre o *template* e o monómero funcional. Idealmente estas interações devem ser suficientemente fortes para que no final da síntese, o mecanismo de reconhecimento possa ser favorecido. Assim, deve ser realizada uma escolha cuidada destas espécies por forma a obter um MIP com cavidades bem definidas (Cormack e Elorza, 2004).

As considerações fundamentais com respeito à escolha do *template* são a sua estabilidade nas condições de polimerização, a ausência de grupos polimerizáveis e solubilidade na mistura de pré-polimerização. O *template* deve também ser similar à estrutura do analito de forma a que o

reconhecimento molecular por parte do MIP seja mais eficaz. Como tal, na síntese de MIPs é bastante usual que *template* e analito sejam representados pela mesma molécula. Tal como mencionado anteriormente, o processo de remoção do *template* é uma das etapas mais críticas para a síntese de MIPs, sendo que nem sempre é possível remover por completo este componente da matriz polimérica. Como consequência direta, verifica-se uma diminuição das cavidades específicas. Por outro lado, durante a aplicação do respetivo MIP, pode ocorrer uma libertação não controlada das moléculas de *template* que ficaram retidas na matriz, fenómeno denominado por *bleeding*. Nos casos em que *template* e analito são idênticos, o *bleeding* pode afetar os resultados, levando à obtenção de falsos positivos (Lorenzo *et al.*, 2011). Como forma de prevenir os problemas inerentes ao fenómeno de *bleeding* foi proposta a utilização de *templates* baseados em estruturas análogas aos próprios analitos (Andersson *et al.*, 1997). Esta solução está no entanto dependente de fatores como disponibilidade e custo destes compostos com estruturas análogas, cuja utilização poderá resultar numa capacidade de reconhecimento inferior à de um MIP preparado utilizando o analito como *template* (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). Finalmente a utilização de um análogo estará também dependente de possíveis interferências causadas na quantificação do analito, aspeto que deverá ser previamente avaliado (Tamayo *et al.*, 2007).

1.8.2. Monómero funcional

O monómero funcional tem como objetivo disponibilizar grupos funcionais que possam formar um complexo com o *template* através de interações covalente ou não-covalentes. Na abordagem covalente o *template* dita o número de monómeros funcionais que podem ser ligados de modo covalente. Por sua vez, na abordagem não-covalente, existe uma razão estequiométrica ótima para o conjunto *template*-monómero, a qual poderá ser obtida de forma empírica através da avaliação de diferentes formulações de MIP. Considera-se que a formação deste complexo segue o princípio de Le Chatelier, no qual o aumento da concentração dos componentes irá favorecer a formação do pré-polímero, aumentando por isso o número final de cavidades específicas e consequentemente a capacidade de ligação do polímero (Yan e Row, 2006). Como regra de ouro, o monómero funcional é utilizado em excesso face ao *template*, com razões estequiométricas típicas de 1:4, relativamente a *template*:monómero. Contudo, é sempre importante compatibilizar a funcionalidade destas duas espécies, com base no número de ligações de hidrogénio que o monómero e o *template* podem estabelecer (Cormack e Elorza, 2004).

Os monómeros mais comuns para a síntese de MIPs encontram-se descritos na Figura 6 e incluem o ácido metacrílico (MAA), ácido acrílico (AA), 2- ou 4-vinilpiridina (2-VP ou 4-VP), acrilamida (AC), etc. Dentro destes, o MAA é tido como o monómero universal, devido à

possibilidade de interagir com as moléculas de *template* por interações covalentes e não-covalentes (Kandimalla e Ju, 2004b).

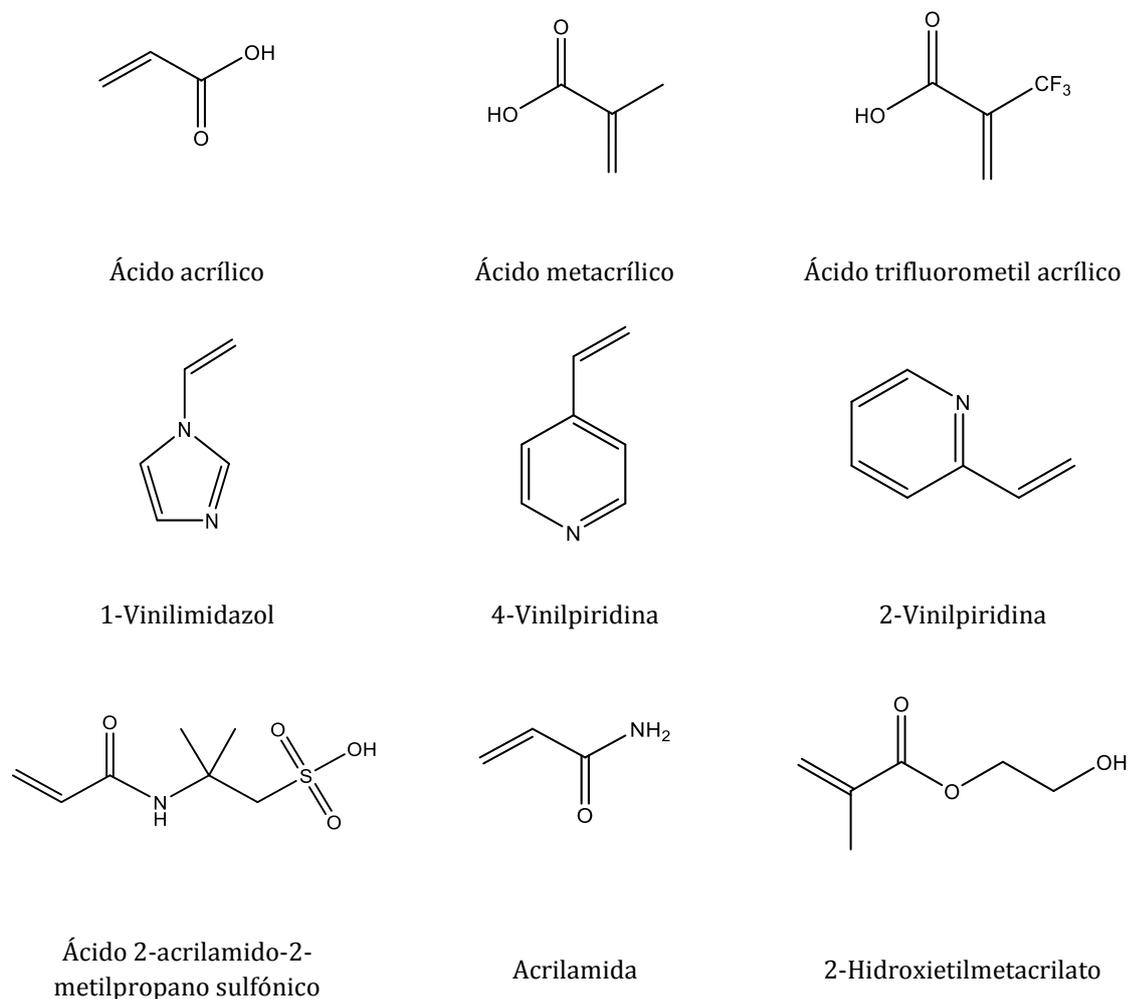
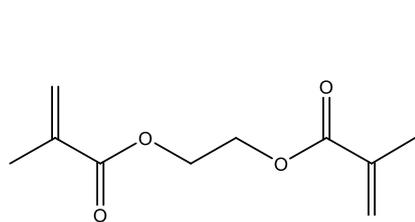


Figura 6. Estruturas dos monómeros mais comuns para a síntese de MIPs.

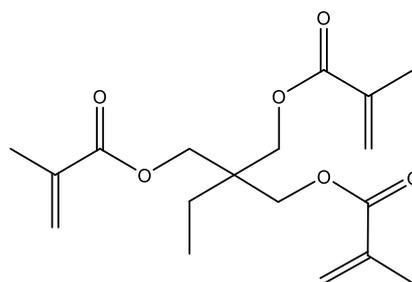
1.8.3. *Cross-linker*

O papel desempenhado pelo *cross-linker* é o de controlar a morfologia da matriz polimérica, que pode ser do tipo gel, macroporoso ou pó. Para além disso, o *cross-linker* atua ao nível da estabilidade das cavidades formadas no MIP, de forma a que estas possam reconhecer de forma específica o analito. Finalmente, este componente permite conferir estabilidade mecânica à matriz polimérica (Cormack e Elorza, 2004). De um modo geral, é possível afirmar que o tipo e a quantidade de *cross-linker* aplicado têm uma influência profunda na seletividade e capacidade de ligação do MIP. Assim, para MIPs produzidos com concentrações de *cross-linker* demasiado

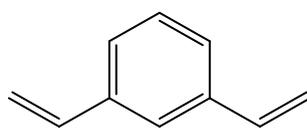
elevadas verifica-se uma estrutura de maior rigidez, com menor mobilidade das cadeias poliméricas e menor número de cavidades específicas. Por outro lado, concentrações demasiado baixas resultam em MIPs demasiado flexíveis, do tipo gel, incapazes de manter a configuração das cavidades formadas (Chen *et al.*, 2011). Numa formulação típica de MIPs, a percentagem molar ótima de *cross-linker* pode ser encontrada entre 50 a 80% relativamente ao número total de moles de monómero, *cross-linker* e *template* (Spivak, 2005). Na Figura 7 são apresentados alguns dos *cross-linkers* mais comuns ao nível da impressão molecular, dos quais se destacam o dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), o trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) e o divinilbenzeno (DVB).



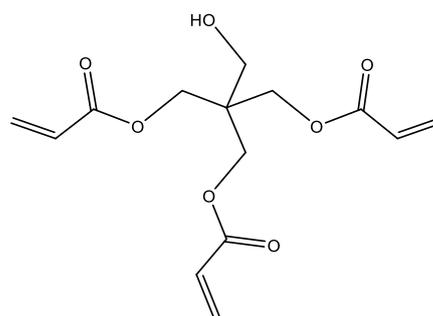
Dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA)



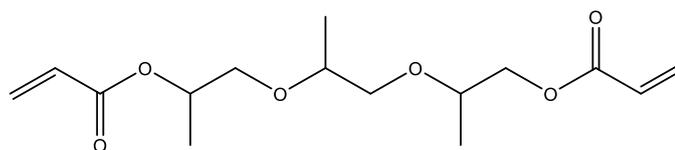
Trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM)



Divinilbenzeno (DVB)



Triacrilato de pentaeritrol



Diacrilato de tripropilenoglicol

Figura 7. Estruturas dos *cross-linkers* mais comuns para a síntese de MIPs.

1.8.4. Solvente porogénico

Para muitos considerado um agente porogénico, o solvente de polimerização desempenha um papel de relevância no processo de impressão. Trata-se de um componente utilizado com o propósito de produzir redes poliméricas macroporosas que facilitem a transferência de massa e facilitem o acesso do analito às cavidades formadas no MIP. Este solvente tem também como função solubilizar os principais componentes da polimerização (*template*, monómero, *cross-linker* e iniciador), formando uma única fase (Cormack e Elorza, 2004).

No caso particular da abordagem não-covalente, o grau de interação entre o *template* e o monómero, na etapa de pré-polimerização, é influenciado pela natureza do solvente utilizado. Dado que esta abordagem se baseia essencialmente na formação de ligações de hidrogénio entre *template* e monómero, torna-se aconselhável a utilização de solventes orgânicos apróticos e apolares, como o tolueno e o clorofórmio. Por outro lado, a seleção de solventes próticos e polares, como água e metanol, podem resultar na interrupção dessas interações, diminuindo a taxa de impressão e, conseqüentemente, o número de cavidades formadas. Num estudo realizado por Song *et al.* (2009b), foi analisado o efeito do solvente porogénico na capacidade do MIP em reconhecer o analito, neste caso a quercetina. Neste estudo foram sintetizados quatro MIPs utilizando os seguintes solventes porogénicos: 1,4 dioxano, tetrahydrofurano, acetona e acetonitrilo, que se encontram por ordem crescente de polaridade. Numa comparação da capacidade de adsorção de cada um dos MIPs verificou-se uma eficiência de adsorção superior para o MIP produzido na presença de um dos solventes com menor polaridade, o tetrahydrofurano (THF). Por outro lado, a utilização do solvente mais polar (acetonitrilo) resultou num MIP com menor capacidade de adsorção, o que segundo os autores pode ser justificado por uma maior competição com o analito pelas interações com o monómero.

Um aspeto importante exibido pelos MIPs preparados em solventes orgânicos apolares, reside no facto de se verificar uma menor capacidade de reconhecimento do analito quando estes MIPs são aplicados em meios aquosos. Por sua vez, em meios compostos pelo solvente que é aplicado na polimerização, verifica-se uma melhoria da capacidade do MIP em reconhecer o analito. Esta característica apresentada pelos MIPs é denominada por efeito de memória (Spivak *et al.*, 1997). A baixa *performance* dos MIPs em meios aquosos é atualmente um dos maiores desafios na área da impressão molecular, uma vez que muitos dos analitos que despertam maior interesse se encontram presentes em matrizes aquosas.

1.8.5. Iniciador de polimerização

Como referido no tópico de introdução aos polímeros impressos molecularmente, a polimerização radicalar é o mecanismo mais comum para a síntese de MIPs. Durante a primeira etapa dá-se a formação de radicais livres gerados através da ativação de um iniciador que pode ocorrer de modo térmico ou fotoquímico. Os iniciadores mais importantes usados neste mecanismo são os compostos azo e peróxi ilustrados na Figura 8. Em geral, estes compostos são usados em baixos níveis comparados com o monómero, tipicamente 1% em percentagem mássica ou molar com respeito ao monómero e *cross-linker* (Cormack e Elorza, 2004). De forma a garantir um bom rendimento na reação de polimerização deve ser assegurado que o oxigénio presente no meio reacional seja previamente removido, uma vez que este gás poderá reagir com os radicais livres formados e assim retardar o processo de polimerização. A remoção do oxigénio pode ser realizada com ultra-sons ou através do borbulhamento na mistura reacional de um gás inerte, como por exemplo azoto ou árgon. A título de exemplo, o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo (AIBN) foi aplicado como iniciador na síntese de um MIP para a análise de dois antimicrobianos (*triclosan* e *triclocarban*) em solos e biosólidos. Após purga do oxigénio, do sistema, com azoto durante 5 min, a ativação do iniciador deu-se com recurso ao aquecimento da mistura polimérica até os 60 °C (temperatura de decomposição do AIBN) (Verma e Xia, 2010).

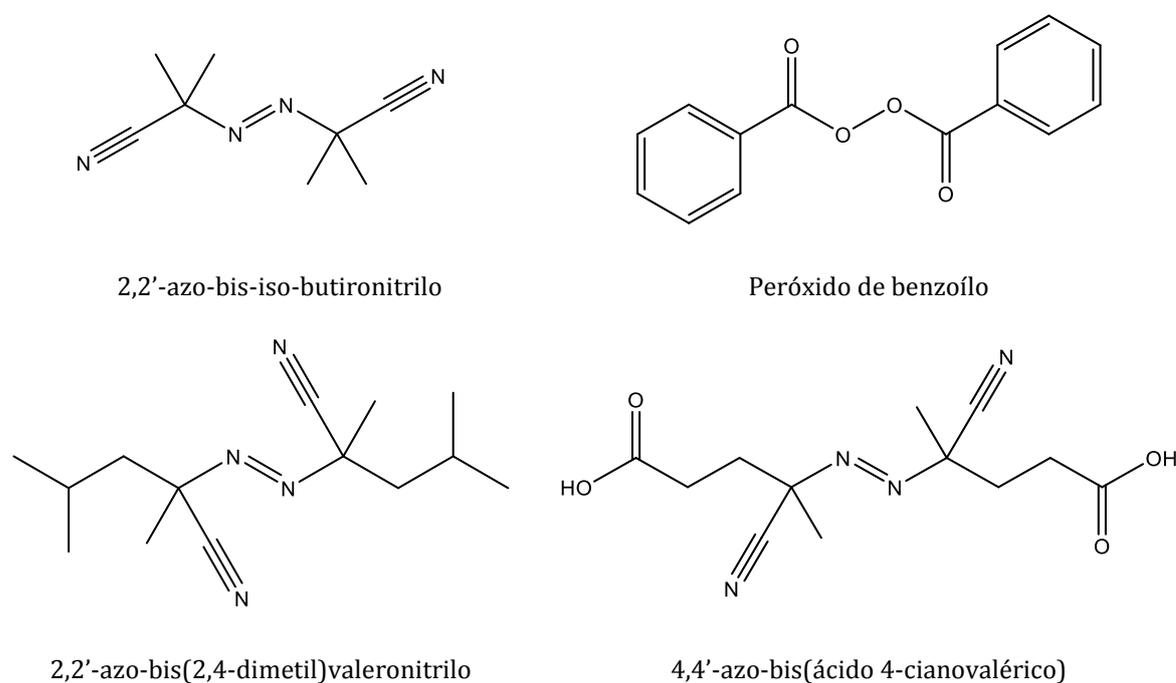


Figura 8. Estruturas químicas dos iniciadores mais comuns para a síntese de MIPs.

1.9. Métodos de preparação de MIPs

Os polímeros impressos molecularmente podem ser preparados numa variedade de formas físicas e propriedades de acordo com a aplicação a que se destinam. Por exemplo, as partículas microesféricas são a melhor escolha para procedimentos baseados na extração em fase sólida, enquanto aplicações bioquímicas ou de libertação controlada de fármacos requerem a utilização de nanopartículas. Neste capítulo será apresentada uma visão geral sobre os principais métodos de polimerização utilizados no processo de síntese de MIPs.

1.9.1. Polimerização em *bulk*

Com base nos métodos existentes para síntese de MIPs, a polimerização em *bulk* tem sido descrita como o procedimento mais usual para a obtenção deste tipo de polímeros. Neste tipo de polimerização, todas os componentes, monómero, *cross-linker*, *template* e iniciador são dissolvidos no solvente porogénico. A polimerização dá-se na ausência de oxigénio, após iniciação térmica, num intervalo de temperaturas entre 40 e 70 °C, ou por ativação fotoquímica a temperaturas mais baixas, 0 a 15 °C (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). No final, é obtido um monolito que é sujeito a processos mecânicos de moagem e peneiração, resultando em partículas irregulares com diâmetros entre os 10 e os 25 µm, com aplicação em técnicas de separação analítica como a cromatografia (Guiochon, 2007) e a eletroforese capilar (Huang *et al.*, 2009).

Apesar da simplicidade e segurança desta técnica, podem-se destacar desvantagens como a formação de partículas heterogéneas, bem como o elevado desperdício de material polimérico que resulta das perdas durante o processamento mecânico das partículas até que estas atinjam o tamanho desejado. Para além disso, a moagem das partículas pode provocar a destruição das cavidades ou alterar a forma das mesmas tornando-as inacessíveis ao analito (Pichon e Haupt, 2006). Um exemplo da aplicação deste método de polimerização é dado por Verma e Xia (2010), na síntese de um MIP para a extração de *triclosan* e *triclocarban* em solos e biosólidos. Para a síntese deste MIP foram misturados: monómero (4-VP), *template* (4,4'-diclorobenzofenona), *cross-linker* (EGDMA), iniciador (AIBN) e solvente porogénico (diclorometano), seguindo-se uma purga com azoto. A polimerização decorreu a 60 °C durante 24 h. No final da polimerização, o sólido obtido foi moído e peneirado, tendo sido recolhida a fração correspondente a um diâmetro de partícula inferior a 45 µm. Esta fração foi posteriormente lavada para remoção do *template* e aplicada como sorbente para a técnica de SPE.

1.9.2. Polimerização em suspensão

Esta técnica é vista como um método simples, capaz de produzir partículas homogêneas com tamanhos na ordem das dezenas de μm . A mistura reacional, constituída por monómero, *template*, *cross-linker*, iniciador e solvente porogénico é dispersa numa fase imiscível, como por exemplo água, formando gotas que são estabilizadas por um surfatante adequado, nas quais ocorre a reação de polimerização. Entre os estabilizantes mais utilizados neste método pode-se destacar o álcool polivinílico (PVA), como descrito, por exemplo, no estudo realizado por Flores *et al.* (2000) sobre a síntese de um MIP seletivo ao colesterol. O benzo(a)pireno (Lai *et al.*, 2004), bisfenol A (Kawaguchi *et al.*, 2005) e a atrazina (Matsui *et al.*, 2000) são alguns exemplos de compostos analisados com sucesso por MIPs produzidos pelo método de suspensão, utilizando água e PVA como dispersante e surfactante, respetivamente. Apesar disso, a utilização da água como solvente de dispersão poderá afetar o número de cavidades produzidas no MIP. Este facto é justificado por uma competição com o *template* pelas ligações de hidrogénio, que impede uma interação conveniente entre monómero e *template*. No estudo apresentado por Mayes e Mosbach (1996) é relatado a utilização de um líquido perfluorocarbonado como solvente de dispersão na síntese de um MIP pelo método de suspensão. Segundo os autores, este solvente permite assegurar uma fase inerte e imiscível com todos os componentes da fase orgânica, e parece não ter comprometido a qualidade da interação entre *template* e monómero. No entanto, o sucesso desta metodologia encontrava-se dependente da síntese de um surfactante perfluoropolimérico. Para evitar o uso de surfactantes ou estabilizantes, foram apresentadas pequenas alterações ao método de suspensão, que se basearam no uso de óleo mineral ou óleo de silicone, como meios de dispersão, para MIPs destinados à análise de propanolol (Kempe e Kempe, 2004) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Wang *et al.*, 2006). Como desvantagens destacam-se a obtenção de partículas com um gama de dimensões mais alargadas relativamente ao protocolo base e a incompatibilidade entre alguns dos solventes típicos da impressão molecular e estes meios de dispersão.

1.9.3. Polimerização em emulsão

A polimerização em emulsão assume-se como uma alternativa à produção de partículas poliméricas com tamanhos na ordem dos μm . A polimerização em emulsão inicia-se com a dispersão da fase orgânica (*template*, monómero e *cross-linker*) na fase contínua constituída, de um modo geral, por água. A presença de um surfactante, como por exemplo o dodecil sulfato de sódio (Tan e Tong, 2007) promove a formação de micelas à volta da fase orgânica, na qual vai entrar o iniciador para que ocorra a reação de polimerização. Esta técnica foi aplicada com sucesso na impressão de proteínas como ribonuclease A (Tan e Tong, 2007) e albumina (Tan *et al.*, 2008).

Trata-se de uma técnica que não requer a utilização de solventes orgânicos e que apresenta como grande vantagem a possibilidade de produção em larga escala. No entanto, tal como no método de suspensão, pode verificar-se uma interferência no processo de impressão, causada pela presença da água (Yan e Ramström, 2005).

1.9.4. Polimerização por precipitação

A polimerização por precipitação é um método que permite obter partículas com diâmetros entre os nm e os μm . Nesta técnica, monómero, *template*, *cross-linker* e iniciador são dissolvidos num volume de solvente porogénico bastante superior ao utilizado na polimerização em *bulk*. Durante este processo dá-se o crescimento individual das cadeias poliméricas até ao momento em que se tornam insolúveis no solvente e começam a precipitar. Pelo facto de se tratar de uma polimerização em meio diluído, deve ser assegurado que o monómero utilizado permita uma interação suficientemente forte com o *template*. Comparada com a polimerização em *bulk*, esta técnica conduz à formação de partículas com maior capacidade de ligação, devido a uma razão superior entre a área e volume (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). Na preparação de um MIP para a análise de propanolol, Pérez-Moral e Mayes (2004) verificaram que o método de polimerização por precipitação conduziu a um polímero com maior capacidade de reconhecimento do analito, comparativamente a MIPs produzidos com os métodos de *bulk*, suspensão ou emulsão. Apesar das vantagens apresentadas pelo método de precipitação, pode-se destacar como principal problema a necessidade de um volume elevado de solvente porogénico, o que implica maior impacto ambiental e também um aumento do custo de produção do MIP.

1.9.5. Polimerização *multistep swelling*

Neste método, são sintetizadas partículas de látex, que vão ser dispersas numa solução aquosa. Estas partículas vão posteriormente aumentar de volume após a adição de um composto orgânico, insolúvel na água. Mais tarde é adicionada uma outra fase que contém monómero, *template*, *cross-linker*, iniciador e solvente porogénico, que após migração para o interior das partículas de látex, dá início à polimerização. Tipicamente este método produz partículas com dimensões entre 0,5 e 50 μm . Apesar das partículas obtidas com esta técnica se revelarem homogéneas ao nível de tamanho e forma, são necessários procedimentos e condições de reação complexas. Para além disso requer a utilização de um meio aquoso que poderá interferir no processo de impressão e, conseqüente, na seletividade do MIP (Yan e Row, 2006). Um exemplo desta abordagem é dado por Nakamura *et al.* (2016) na síntese de um MIP preparado para a análise de um pesticida

(estricnina). Embora os resultados apresentados tenham sido satisfatórios, o polímero obtido apresentou um fator de impressão inferior a um MIP obtido pelo método de precipitação.

1.9.6. Outras metodologias de polimerização

Para além das técnicas de polimerização anteriormente mencionadas, têm sido introduzidas outras metodologias na tentativa de preparar MIPs mais atrativos e competitivos. Uma dessas técnicas é o processo sol-gel, no qual precursores designados por organosilicas, são inicialmente hidrolisados para a formação de uma solução coloidal e em seguida, após policondensação, formam materiais de sílica reticulados (Díaz-García e Laíño, 2005). Os precursores mais comuns para este processo são o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), o feniltrimetoxissilano (PTMS), o tetrametoxissilano (TMOS) e o tetraetoxissilano (TEOS). Atualmente o processo de sol-gel apresenta como vantagens a facilidade de preparação de materiais à temperatura ambiente sem que ocorra decomposição química ou térmica. Por outro lado, recorre a solventes com menor impacto para o ambiente, como o etanol, o que difere dos solventes típicos utilizados nos métodos de polimerização convencionais (Lofgreen e Ozin, 2014). Partindo do 2,4-dinitrotolueno como *template*, Lopez-Nogueroles *et al.* (2013b) reportam a síntese de um MIP seletivo aos nitro *musks* pelo método sol-gel. Para a síntese deste polímero os autores utilizaram o PTMS como monómero e o TEOS como *cross-linker*. Após síntese, o MIP foi testado como sorbente para SPE revelando recuperações superiores a um sorbente comercial, para os 5 nitro *musks* em análise.

Para além do processo sol-gel, pode destacar-se a eletropolimerização que permite a síntese de MIPs com aplicabilidade na área dos sensores. Com base nesta metodologia os MIPs são gerados sob a forma de filme na superfície de um eletrodo, utilizando para tal monómeros como pirrol, anilina, *o*-fenilenodiamina (*o*-PD) e o *p*-aminobenzenotiol (*p*-ATP). Entre as vantagens da eletropolimerização pode destacar-se o controlo da espessura de filme polimérico que é crucial para a deteção do analito e a possibilidade de integração do filme em qualquer superfície de eletrodo (Pernites *et al.*, 2011). A título de exemplo, Li *et al.* (2012) aplicaram o método de eletropolimerização para a síntese de um filme de MIP sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo. O sensor obtido foi aplicado com sucesso para a determinação de um filtro-UV (benzofenona) em embalagens para alimentos, demonstrando resultados ao nível de outros métodos para a análise deste composto.

O elevado grau de ligações cruzadas, que caracterizam a estrutura do MIP produzido de acordo com os métodos convencionais, pode resultar em extrações incompletas do *template*, baixa capacidade de ligação e resistência à transferência de massa. Como tal, foi desenvolvida uma técnica de impressão à superfície, em que o *template* passa a ser impresso à superfície ou próximo da superfície do material (Gao *et al.*, 2007). A impressão à superfície consiste em utilizar um

suporte, o qual é inicialmente imobilizado e modificado para posteriormente ser revestido com um polímero, neste caso o MIP. Os suportes mais comuns nesta técnica são a sílica gel (He *et al.*, 2008), as nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) (Zhang *et al.*, 2009), o quitosano (Wang *et al.*, 2009) e membranas de alumina (Li *et al.*, 2006) entre outros.

A utilização de nanopartículas de óxido de ferro como suporte para a impressão molecular representa uma estratégia especialmente atrativa para a síntese de MIPs (Figura 9).

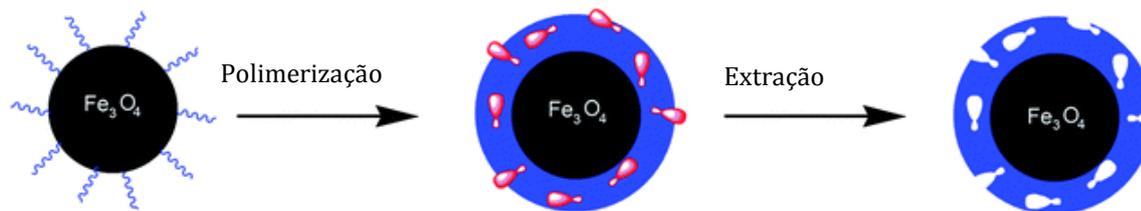


Figura 9. Representação esquemática do processo de produção de MIP magnéticas pela técnica de impressão à superfície.

Após o processo de reconhecimento molecular que decorre da aplicação do MIP, o polímero pode ser separado da amostra através da aplicação de um campo magnético externo, o que permite substituir as habituais etapas de centrifugação e filtração. Deste modo, o processo de recuperação do MIP será economicamente mais viável e simples. No que diz respeito ao procedimento, são necessárias três etapas para a preparação de MIPs magnéticos de acordo com a técnica de impressão à superfície. A primeira etapa consiste na preparação das nanopartículas que vão servir de suporte, seguindo-se a modificação da superfície dessas mesmas nanopartículas de modo a favorecer a polimerização. Na última etapa dá-se a formação do MIP de acordo com o mecanismo de polimerização radicalar ou sol-gel (Chen *et al.*, 2011). Do ponto de vista de execução, a opção pela técnica de impressão à superfície implica a utilização de sistemas mais complexos em comparação com as técnicas convencionais, para além de implicar tempos de síntese mais longos.

Como referido anteriormente, a polimerização radicalar representa o principal mecanismo utilizado na síntese de MIPs, dada a sua compatibilidade com uma grande variedade de monómeros, condições de polimerização e tolerância a diferentes solventes. Os MIPs que daqui resultam podem, contudo, exibir estruturas mais heterogêneas devido à dificuldade em controlar o tamanho das cadeias através das respetivas reações de terminação. No sentido de suprimir estas limitações surgiram novos mecanismos, mais versáteis, denominados por métodos de

polimerização radicalar controlada, do inglês *Controlled "Living" Radical Polymerization* (CLRP). A CLRP engloba várias estratégias entre as quais a polimerização radicalar por transferência atômica (ATRP), polimerização mediada por azoto (NMP), polimerização de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT) e a polimerização *iniferter* (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). Dentro destas estratégias é possível destacar a polimerização RAFT, que pode ser aplicada a uma variedade significativa de monómeros e condições de polimerização. A implementação desta estratégia demarca-se das restantes pela introdução de um agente de transferência de cadeia, normalmente compostos tiocarboníltio, num sistema convencional de polimerização radicalar. Como se pode verificar pelo mecanismo apresentado na Figura 10, a polimerização RAFT tem início com a formação de radicais livres que reagem posteriormente com as moléculas de monómero, levando à formação de radicais poliméricos de propagação (Figura 10a). Estes são adicionados ao agente RAFT, resultando num radical intermédio (Figura 10b) que pode reiniciar a polimerização através da reação com o monómero, formando um novo radical polimérico (Figura 10c). Posteriormente é estabelecido um equilíbrio entre os dois radicais poliméricos em propagação e o agente RAFT inativo, o que se traduz numa probabilidade idêntica de crescimento para todas as cadeias poliméricas que exibem menor dispersão (Figura 10d). Finalmente, a polimerização termina quando os radicais poliméricos se combinam (Figura 10e).

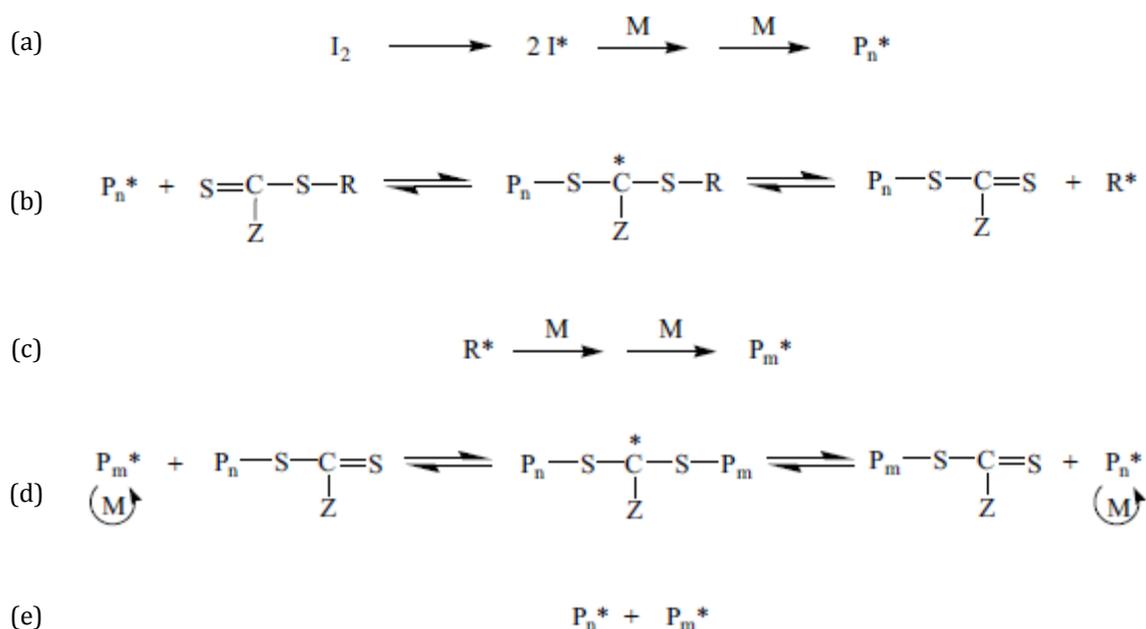


Figura 10. Mecanismo geral da polimerização RAFT, adaptado de (Ye, 2016). Iniciador - I, Monómero - M, Radicais poliméricos - P_n e P_m , Radical - R.

Titirici e Sellergren reportaram a produção de um MIP sobre a superfície de partículas de sílica, através da adição de um agente RAFT, o qual foi comparado com outro MIP produzido nas mesmas condições, mas sem a utilização desse mesmo agente (Titirici e Sellergren, 2006). Após análise por microscopia eletrônica foi possível verificar que as partículas preparadas sob a mediação do agente RAFT apresentaram uma superfície lisa, resultante de uma deposição uniforme do filme de MIP. Por outro lado, na ausência do agente RAFT, verificou-se uma deposição heterogênea, com a aglomeração de partículas. Os autores verificaram também uma melhoria das propriedades de transferência de massa no MIP produzido à luz deste novo mecanismo, confirmado através da avaliação da eficiência de colunas cromatográficas empacotadas com os dois MIPs em estudo.

Numa outra vertente tem-se verificado o desenvolvimento de novas formas de ativação para o processo de polimerização, como por exemplo o aquecimento por micro-ondas, dada a rapidez de aquecimento, seletividade e eficiência. Assim, no estudo desenvolvido por Zhang *et al.* (2009) é reportada a aplicação do micro-ondas para a síntese de um MIP magnético, seletivo à atrazina, preparado de acordo com a técnica de polimerização em suspensão. Com esta fonte de ativação os autores verificaram que tempo de polimerização foi reduzido para 1/10 relativamente ao processo convencional de aquecimento. Por outro lado, os ensaios de reconhecimento molecular permitiram constatar uma melhoria da seletividade para com a atrazina, relativamente às partículas de MIP produzidas com recurso a um banho termostático.

Devido às suas características como estabilidade térmica, miscibilidade com água e solventes orgânicos e baixo ponto de fusão, os líquidos iônicos passaram a ser estudados como solventes porogénicos para a síntese de MIPs. Recentemente Xu *et al.* (2010) descreveram a utilização de um líquido iónico, BMIM⁺PF₆⁻ para a preparação de um MIP impresso com diclorvos (pesticida), de acordo com a polimerização em *bulk*. Após síntese, o MIP foi testado como sorbente para a técnica de SPE e comparado com um sorbente comercial de C18. Para esta comparação foi utilizada uma solução aquosa contaminada com o pesticida em análise e dois compostos análogos. A análise cromatográfica dos extratos revelou que o sorbente comercial teve um efeito de concentração semelhante para os 3 compostos, devido à ausência de seletividade. Por sua vez, o MIP permitiu um efeito de concentração superior para o pesticida em análise, indicando que o sorbente polimérico era mais adequado para a separação e extração do diclorvos.

1.10. Caracterização de polímeros impressos molecularmente

A caracterização dos polímeros impressos molecularmente pode ser dividida em três áreas: caracterização química, morfológica e avaliação da capacidade de reconhecimento molecular.

1.10.1. Caracterização química

Uma das técnicas aplicada na caracterização química dos MIPs é a microanálise elementar que permite identificar elementos específicos como o carbono, hidrogénio, azoto, cloro, enxofre e oxigénio. Por outro lado, fornece informação quantitativa sobre a composição do MIP, evidenciando diferenças entre o monómero e o *cross-linker*. Esta técnica pode também ser utilizada para detetar a presença do *template* na matriz polimérica, apesar de ser pouco sensível para detetar quantidades vestigiais.

Para além da microanálise, é relativamente comum a análise de MIPs por intermédio da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Tal como acontece no caso dos compostos orgânicos, os polímeros exibem bandas de absorção na região do infravermelho que podem fornecer informação sobre a sua composição. Trata-se de uma técnica com sensibilidade para analisar os grupos funcionais que estão contidos na matriz polimérica. Esta técnica permite avaliar o grau de polimerização através da análise de ligações duplas não reagidas (Manesiotis *et al.*, 2009) e pode também servir como método de confirmação da presença de interações não-covalentes, como é o caso das ligações de hidrogénio (Song *et al.*, 2009a).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é outra técnica que fornece informação sobre a composição química dos polímeros molecularmente impressos. No caso dos MIPs, a RMN-C¹³ pode ser aplicada para seguir a progressão das ligações cruzadas e para avaliar a quantidade de ligações duplas por reagir após polimerização. Apesar disso, a aplicação do RMN para a caracterização de MIPs é ainda limitada (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013).

1.10.2. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos polímeros impressos molecularmente fornece informação sobre o volume específico de poros, tamanho e distribuição de poros e área específica dos materiais. Dentro desta caracterização incluem-se a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e de transmissão (TEM), ensaios de sorção em atmosfera de azoto, porosimetria por intrusão de mercúrio e cromatografia inversa por exclusão de tamanho (ISEC) (Cormack e Elorza, 2004).

A sorção em azoto consiste na exposição de uma massa de polímero seco a gás de azoto, numa gama de pressões. Após medição da quantidade de gás adsorvido em função da pressão, são traçadas as isotérmicas e aplicado de forma mais comum a teoria de Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T) para a avaliação da área superficial, volume de poros e diâmetro médio de poros. De um modo semelhante, a porosimetria de mercúrio é também utilizada nos estudos de sorção do MIP, sendo, contudo, mais sensível para a avaliação de poros de maiores dimensões (macroporos). Por outro lado, o número de estudos com a aplicação deste técnica tem vindo a diminuir, devido aos problemas associados à utilização do mercúrio (Lowell *et al.*, 2004).

As técnicas de microscopia são essenciais para a caracterização de MIPs, fornecendo informação sobre o grau de homogeneidade do material, topografia da superfície e também sobre o tamanho e forma das partículas poliméricas. Dentro destas técnicas, a microscopia eletrónica de varrimento é mais utilizada para a caracterização dos MIPs, uma vez que permite obter imagens de mais fácil interpretação do que a técnica de TEM, a mais baixo custo e condições de operação de menor complexidade (Sawyer *et al.*, 2008).

Por sua vez, a técnica de ISEC permite a análise de polímeros no estado húmido, ao contrário do que acontece com as técnicas de sorção. Este aspeto é bastante significativo dado que se aproxima mais da realidade encontrada na aplicação destes polímeros. Numa análise típica por ISEC, o sólido poroso é utilizado como fase estacionária numa coluna de fluxo. Em seguida, padrões de polímeros lineares solúveis são eluídos nessa mesma coluna a um caudal fixo. Da aplicação de modelos matemáticos adequados, resulta a informação sobre a estrutura porosa do polímero utilizado como fase estacionária (Ousalem *et al.*, 2000).

1.10.3. Avaliação das propriedades de reconhecimento molecular

Os MIPs são polímeros com um elevado grau de ligações cruzadas que se formam na presença de um *template*. A remoção desse *template* resulta na formação de cavidades, que do ponto de vista teórico, deverão ser capazes de reconhecer e se ligar de forma específica ao analito alvo. De forma a avaliar estas propriedades de reconhecimento molecular, os MIPs são tipicamente submetidos a ensaios de adsorção em solução para determinação da capacidade do analito em se ligar ao polímero. Por outro lado, a avaliação das propriedades dos MIPS pode também ser realizada após aplicação direta do polímero como fase estacionária de métodos cromatográficos e determinação de parâmetros como o fator de seletividade (α) e fator de retenção (k) (Spivak, 2005).

O método mais comum para avaliação da capacidade de ligação dos MIPs é a adsorção em solução (Spivak, 2005). No que diz respeito ao procedimento típico, uma quantidade conhecida

de polímero é colocada em contacto com uma solução que contém o analito alvo. Posteriormente a mistura é agitada até que o equilíbrio seja atingido, período após o qual uma amostra representativa da fase líquida é separada do polímero por filtração ou centrifugação. Em seguida esta amostra é analisada, por exemplo, por métodos cromatográficos, permitindo determinar, por diferença, a quantidade de analito que ficou ligada ao polímero. Paralelamente é realizado o mesmo tipo de análise para um polímero de referência, designado por NIP, do inglês, *non-imprinted polymer*. Este polímero é sintetizado nas mesmas condições que o MIP, mas sem *template*. O NIP possui as mesmas propriedades químicas que o MIP, no entanto não exhibe cavidades específicas na sua matriz. A comparação dos resultados de adsorção entre estes dois polímeros permite avaliar a eficiência do processo de impressão, através da ocorrência de cavidades específicas no MIP (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

Após o tratamento dos resultados obtidos nos ensaios de adsorção, são usualmente traçadas as isotérmicas de adsorção do MIP e NIP, que resultam da representação da quantidade de analito adsorvida pelos polímeros (Q_{ads}) em função da concentração livre na fase líquida no equilíbrio (C_L). Com o objetivo de obter isotérmicas de adsorção representativas dos materiais em estudo pode ser necessário a otimização de dois fatores: a quantidade de polímero aplicada, bem como a natureza do solvente utilizado. Assim, um aumento da quantidade de polímero permitirá aumentar a sensibilidade perante a presença de cavidades específicas. Por outro lado, a existência de interações específicas apenas poderá ser confirmada com a utilização de solventes de baixa polaridade nos ensaios de adsorção. Na Figura 11 é apresentada uma representação geral das isotérmicas para o MIP e para o NIP.

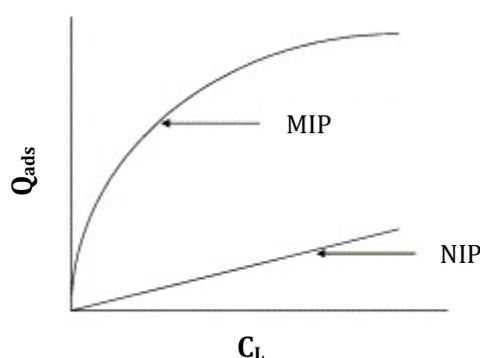


Figura 11. Representação geral das isotérmicas de adsorção para o MIP e respetivo NIP. Adaptado de (Spivak, 2005).

Numa primeira análise, a curvatura da isotérmica do MIP é explicada pela presença de cavidades específicas na estrutura deste polímero, ao passo que uma isotérmica linear sugere a ocorrência de adsorção não específica, como é característico do NIP. Assim, para a isotérmica representativa do MIP é tipicamente verificado, numa fase inicial, um crescimento acentuado da

quantidade de analito adsorvido, que resulta de uma ocupação preferencial das cavidades previamente formadas. À medida que a concentração de analito vai aumentando, verifica-se um abrandamento da quantidade que é adsorvida, até ao momento em que se atinge um patamar. Este momento resulta da ocupação de todos os sítios ativos capazes de reter o analito, o que corresponde à saturação do material. Por sua vez, a isotérmica do NIP demonstra uma capacidade inferior para se ligar ao analito, sendo que a ausência de curvatura sugere não existirem locais preferenciais para a adsorção. Esta observação pode ser explicada pela ausência de cavidades na estrutura do NIP, pelo que a adsorção neste material ocorre de modo não específico (Spivak, 2005).

Nos últimos anos, a caracterização das propriedades de reconhecimento molecular tem despertado o interesse da comunidade científica, que tem desenvolvido estudos que afirmam que os MIPs podem exibir cavidades com uma vasta gama de afinidades e seletividades.

A representação geral das isotérmicas de adsorção (Figura 11) nem sempre traduz com exatidão a performance de ligação dos MIPs dado a distribuição dos locais de ligação poder ser mascarada pela curvatura da respetiva isotérmica (Umpleby *et al.*, 2004). Como tal, tornou-se necessária uma análise mais quantitativa através da avaliação dos parâmetros de ligação. Estes podem ser obtidos a partir da isotérmica do polímero, após a aplicação de um modelo específico de ligação. Este modelo é inicialmente selecionado de acordo com a sua capacidade para reproduzir de forma exata os dados experimentais da isotérmica. Assim, os modelos de ligação podem ser divididos em duas classes: modelos discretos e modelos contínuos. Nos modelos discretos é considerada a existência de um número finito de diferentes locais de ligação, com cada classe a possuir uma afinidade de ligação independente. Os modelos de ligação discretos que mais se destacam são o modelo de isotérmicas de Langmuir e bi-Langmuir, que assumem a existência de uma e duas classes de locais de ligação, respetivamente (Umpleby *et al.*, 2004). Estes modelos são normalmente descritos através do método de Scatchard, no qual os dados experimentais da isotérmica são representados no formato de concentração adsorvida sobre concentração livre (Q_{ads}/C_L) em função de Q_{ads} (García-Calzón e Díaz-García, 2007). No caso concreto de sistemas homogéneos, a representação de Scatchard apresentará uma única linha reta, confirmando a presença de um único tipo de locais de ligação. No entanto, o caso mais frequente é a obtenção de um gráfico sob a forma de curva, o que confirma a existência de locais de ligação heterogéneos (Figura 12). Nesta situação podem ser realizados dois ajustes lineares aos dados experimentais, o que permite fazer a distinção entre dois tipos de sítios de ligação. Assim, a reta com maior declive mede os locais com maior afinidade, ao passo que a reta com menor declive corresponderá aos locais de ligação com menor afinidade (Spivak, 2005).

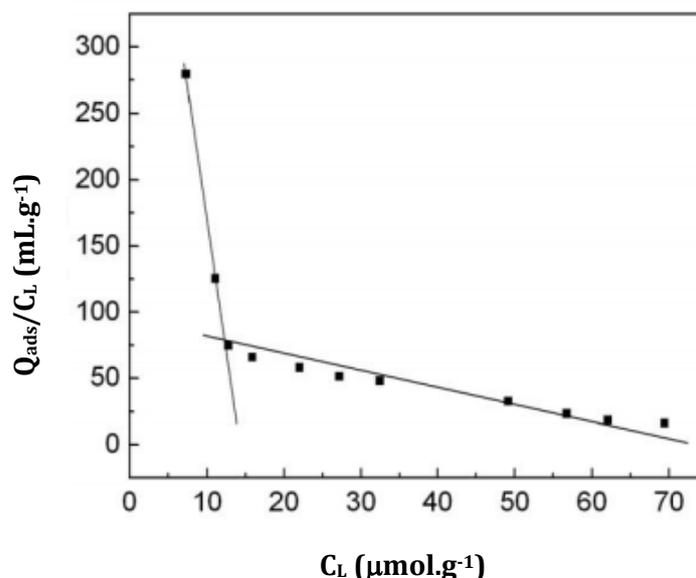


Figura 12. Aplicação do método de Scatchard para a adsorção de roxitronicina, adaptado de (Yu *et al.*, 2010).

Os modelos de Langmuir e bi-Langmuir defendem que os MIPs são relativamente homogêneos e contêm, como referido anteriormente, uma ou duas classes de locais de ligação. No entanto, de acordo com o estudo realizado por Umpleby *et al.* (2000), os MIPs, em especial os não-covalentes, podem apresentar uma distribuição heterogênea ao nível dos locais de ligação. Esta diferença entre o que é defendido pelos modelos discretos e a realidade do sistema pode levar a inconsistências no cálculo dos parâmetros de ligação, que podem ser amplificadas quando está em causa a comparação de polímeros diferentes.

Devido às limitações demonstradas pelos modelos discretos para caracterizar a heterogeneidade dos MIPs, foram propostos modelos contínuos, como o de Freundlich e Langmuir-Freundlich. Estes modelos representam uma solução mais atrativa, pois permitem uma maior aproximação à distribuição heterogênea dos MIPs e uma quantificação dessa mesma heterogeneidade. O modelo de Freundlich considera que a matriz polimérica apresenta uma superfície heterogênea com diferentes tipos de interações. Na maioria dos casos pode dizer-se que o modelo de Freundlich é uma generalização do modelo de Langmuir para superfícies heterogêneas com uma energia de distribuição correspondente a um decréscimo exponencial. Apesar de o modelo de Freundlich defender que a quantidade de analito adsorvido aumenta com a concentração em solução, é apenas aplicável a superfícies altamente heterogêneas, representando valores típicos de adsorção para uma gama restrita de concentrações. Por sua vez, o modelo de Langmuir-Freundlich, surge como um modelo híbrido que combina a heterogeneidade da superfície com a interações estabelecidas pelos analitos. Assim, este modelo

permite descrever a adsorção do analito em toda a gama de concentrações para MIPs que apresentem superfícies homogêneas e heterogêneas (Umpleby Li *et al.*, 2001; Umpleby Li *et al.*, 2004; Umpleby Li *et al.*, 2000).

A cromatografia frontal tem sido utilizada para a compreensão das interações estabelecidas entre monómero e *template* e para a estimativa dos parâmetros de adsorção do analito no MIP (Spivak, 2005). Conforme é ilustrado na Figura 13 o procedimento para avaliação das propriedades de reconhecimento molecular por cromatografia frontal inicia-se com a preparação de uma coluna com as partículas de MIP. Depois de se proceder à estabilização da coluna realiza-se uma aplicação contínua de uma solução que contém uma concentração conhecida de analito e um marcador de volume morto que tem como característica o facto de não ficar retido na fase estacionária. À medida que o analito é adsorvido, vai diminuindo a capacidade de adsorção do MIP, até ao momento em que se dá a saturação do polímero. Após a saturação inicia-se a eluição do analito, obtendo-se uma curva característica de *breakthrough* (García-Calzón e Díaz-García, 2007). À semelhança do que ocorre nos ensaios *batch*, este estudo cromatográfico é também aplicado ao polímero de referência (NIP). É também possível avaliar a seletividade do MIP, mediante a injeção de soluções contendo uma mistura de analito com compostos de estrutura análoga a esse mesmo analito (Chapuis *et al.*, 2004).

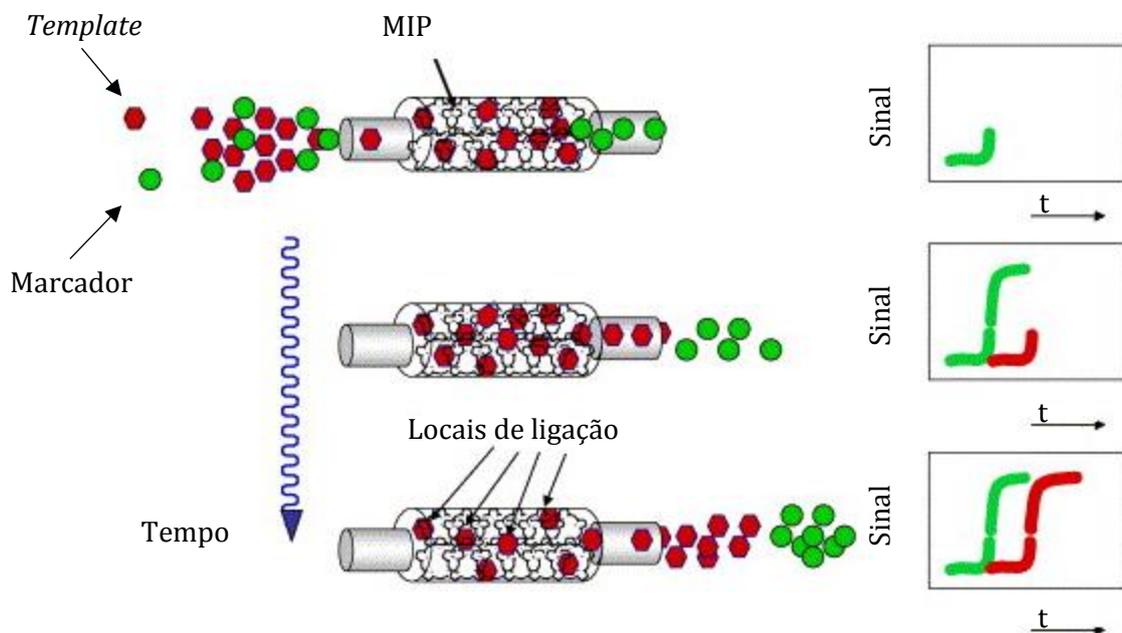


Figura 13. Princípio da cromatografia frontal onde o *template* e um marcador de volume morto são introduzidos em contínuo em colunas preparadas com partículas de MIP. Adaptado de (García-Calzón e Díaz-García, 2007).

A utilização da cromatografia frontal para avaliação das propriedades de reconhecimento molecular comparativamente aos ensaios de adsorção em *batch* apresenta como principal desvantagem o facto de a quantidade de analito usada estar limitada a uma gama de concentrações mais baixa, o que impede a determinação da distribuição de locais de ligação. Por outro lado, a comparação dos dados cromatográficos só é significativa se os ensaios forem realizados sob as mesmas condições, como por exemplo fase móvel e temperatura (Spivak, 2005). Segundo Umpleby *et al.* (2004), a cromatografia frontal implica interações mais fracas entre fase estacionária e analito, pelo que as capacidades de adsorção e as afinidades apresentam valores inferiores aos obtidos pelos ensaios de adsorção em *batch*.

1.11. Aplicações de MIPs para a análise de PCPs

As propriedades peculiares dos MIPs levaram a que estes materiais se tenham tornado numa ferramenta fundamental, com aplicabilidade em diferentes áreas como separação, purificação, sensores e biossensores, catálise e libertação controlada de fármacos. Considerando que os tipos de aplicações para MIPs gerais foram recentemente revistos por Chen *et al.* (2016) decidiu-se dar ênfase aos MIPs destinados à análise de PCPs.

No que diz respeito ao composto considerado para este trabalho e tanto quanto é do conhecimento do autor, não foram encontrados estudos relativos ao desenvolvimento de um MIP específico para o galaxolide. No entanto, o galaxolide surge de forma indireta num estudo referente a um MIP impresso com ciprofloxacina, produzido especificamente para a análise de fluoroquinolonas. Na aplicação do MIP, obtido por precipitação, à técnica de SPE, o galaxolide surge, juntamente com outros contaminantes, no extrato de amostras de água provenientes de estação de tratamento (Prieto *et al.*, 2011). Neste estudo, os autores referenciam recuperações próximas dos 100% para as fluoroquinolonas, enquanto que o galaxolide apenas registou 5% de recuperação. Estes resultados permitiram confirmar a seletividade do MIP para com os analitos alvo. Com base na escassez de publicações envolvendo MIPs e galaxolide, decidiu-se alargar este estudo aos PCPs. Assim, numa análise focada aos produtos de higiene e cuidado pessoal, pretende-se, ao longo deste tópico, sumarizar e discutir as principais aplicações de MIPs a este tipo de contaminantes.

Considerando um período entre 2001 e 2014, foram encontradas dezanove publicações que referenciavam a síntese de MIPs para a análise de PCPs. A Tabela 3 resume as principais características dos estudos, em que se incluem os analitos alvo, componentes envolvidos na síntese dos MIPs, aplicações, metodologias e principais resultados analíticos.

Tabela 3. Aplicação de polímeros impressos molecularmente para a análise de produtos de higiene pessoal.

PCPs	Analito	Amostra	T/M/CL/Polimerização	Aplicação	Técnica Analítica	LOD/LOQ	Rec (%)	Ref
Filtros-UV	BP	Embalagens	BP/ <i>o</i> -PD/Eletropolimerização	Sensor	Potenciometria	1,8 µg.L ⁻¹	N.A	(Li <i>et al.</i> , 2012)
Antimicrobianos	TCS	Águas ambientais	TCS/APTES/TEOS/Impressão à superfície com processo sol-gel	Remoção	HPLC-UV	N.A	Rio: 92,1-95,3%	(Gao <i>et al.</i> , 2010)
		Pasta dos dentes	TCS/AA+MMA/DVB+TRIM/Precipitação	Sensor	Potenciometria	0,55 µg.L ⁻¹	Lago: 90,7-93,6%	(Liang <i>et al.</i> , 2013)
		Solução aquosa	TCS/ <i>o</i> -PD/Eletropolimerização	Sensor	Potenciometria	23,0 µg.L ⁻¹	N.A	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
	TCS, TCC	Solos e Biosólidos	4,4'-DCB/4-VP/EGDMA/ <i>Bulk</i>	MISPE	HPLC-UV	Solos: 40 µg.kg ⁻¹ Biosólidos: 100 µg.kg ⁻¹ - 300 µg.kg ⁻¹	TCC: 88,3-89,9% TCS: 83,1-82,0	(Verma e Xia, 2010)
<i>Musks</i>	MA, MX, MM, MT, MK	Águas ambientais	2,4-DNT/PTMS/TEOS/Sol-gel	MISPE	GC-MS	1,5 – 2,6 ng.L ⁻¹	Rio: 77-92% Mar: 77-87% Água residual: 69-87%	(Lopez-Nogueroles <i>et al.</i> , 2013a)
Conservantes	4-HBA	Solução em Acetonitrilo	4-HBA/AA/EGDMA/ <i>Bulk</i>	N.A	Espectrofotometria-UV/Visível	N.A	N.A	(Hu e Orwoll, 2010)
	<i>p</i> -HB, <i>p</i> -HPA, <i>p</i> -HPPA	Soluções em acetona	<i>p</i> -HB, <i>p</i> -HPA, <i>p</i> -HPPA/4-VP/EGDMA/ <i>Bulk</i>	Coluna Cromatográfica	HPLC-UV	N.A	N.A	(Sun <i>et al.</i> , 2001)

Tabela 3. Aplicação de polímeros impressos molecularmente para a análise de produtos de higiene pessoal (continuação).

PCPs	Analito	Amostra	T/M/CL/Polimerização	Aplicação	Técnica Analítica	LOD/LOQ	Rec (%)	Ref
Conservantes	MtP	Solução aquosa	MtP/APTES/TEOS/Sol-gel	N.A	Espectrofotometria-UV	N.A	N.A	(Meng <i>et al.</i> , 2012)
	BuP	Águas ambientais	BuP/4-VP/EGDMA/ <i>Bulk</i>	MISPE	HPLC-UV	N.A	58%	(Beltran <i>et al.</i> , 2010)
		Águas ambientais	BzP/MAA/EGDMA/Precipitação	MISPE	Potenciometria	3,8 µg.L ⁻¹	82-85%	(Lorenzo <i>et al.</i> , 2013)
	PrP	Cosméticos	PrP/MAA/EGDMA/Precipitação	Sensor	Potenciometria	0,058 µg.L ⁻¹	97,3-102,6%	(Gholivand <i>et al.</i> , 2014)
	2-HB	Cosméticos	2-HB/APTES/TEOS/ Impressão à superfície com processo sol-gel	Remoção	HPLC-UV	N.A	86,9-105 %	(Abdul Raof <i>et al.</i> , 2013)
	BuP, EtP, MtP, PrP	Cosméticos	MtP+PrP/MAA/TPGDA/ <i>In-situ</i>	Sensor	Potenciometria	36,0 – 66,5 µg.L ⁻¹	98,7-101,8%	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
	BA, EtP, MtP, PrP	Soja	EtP/MAA/EGDMA/Precipitação	MISPE	HPLC-UV	16,0 – 24,0 µg. L ⁻¹	88,4-110,6%	(He <i>et al.</i> , 2011)
	MtP, EtP, PrP	Soja	EtP/MAA/EGDMA/ <i>Bulk</i>	MI-SPME	GC	0,22 – 0,30 µg.L ⁻¹	92,2-97,9%	(He <i>et al.</i> , 2012)
	BuP, BzP, EtP, iBuP, iPP, MtP, PrP	Solos e Sedimentos	BzP/MAA/DVB/Precipitação	MISPE	HPLC-UV	Solos: 0,16-0,30 ng.g ⁻¹ Sedimentos:0,16-0,24 ng.g ⁻¹	Solos: 80,2-86,8% Sedimentos: 85,5-88,1%	(Núñez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>p</i> -HB	Extrato de Plantas	PA/AA/EGDMA/Precipitação	MISPE	HPLC-DAD	N.A	16,5-82,1%	(Karasová <i>et al.</i> , 2005)
BA, 4-HBA, SA	Águas ambientais	BA and 4-HBA/4-VP/EGDMA/Impressão à superfície	Remoção	HPLC-UV	1,0 - 20.0 µg. L ⁻¹	83,2-103,0%	(Shi <i>et al.</i> , 2014b)	

Notas: CL – *cross-linker*; LOD – limite de deteção; LOQ – limite de quantificação; M – monómero; N.A – não aplicável; Rec - % de recuperação; T- *template*.

Segundo a literatura, os MIPs têm vindo a ser referenciados como sorbentes seletivos que permitem um tratamento eficaz da amostra antes da sua análise. Assim, a aplicação dos MIPs à técnica de extração em fase sólida, denominada por MISPE, tem sido das mais utilizadas, devido à sua versatilidade e simplicidade. De modo semelhante ao tradicional protocolo de SPE, uma pequena quantidade de MIP é empacotado num cartucho entre dois *fritz*. Na etapa de condicionamento, o sorbente é tratado com solventes adequados de forma a preparar as cavidades para reconhecer o analito. Em seguida, na etapa de *loading*, faz-se passar através do MIP, uma fase líquida que contém o analito. A etapa seguinte, denominada *clean-up*, consiste na aplicação de um solvente capaz de remover possíveis interferentes, sem afetar as interações específicas que se estabelecem entre o MIP e o analito. Finalmente o analito é eluído do MIP, através de um solvente apropriado (Figura 14).

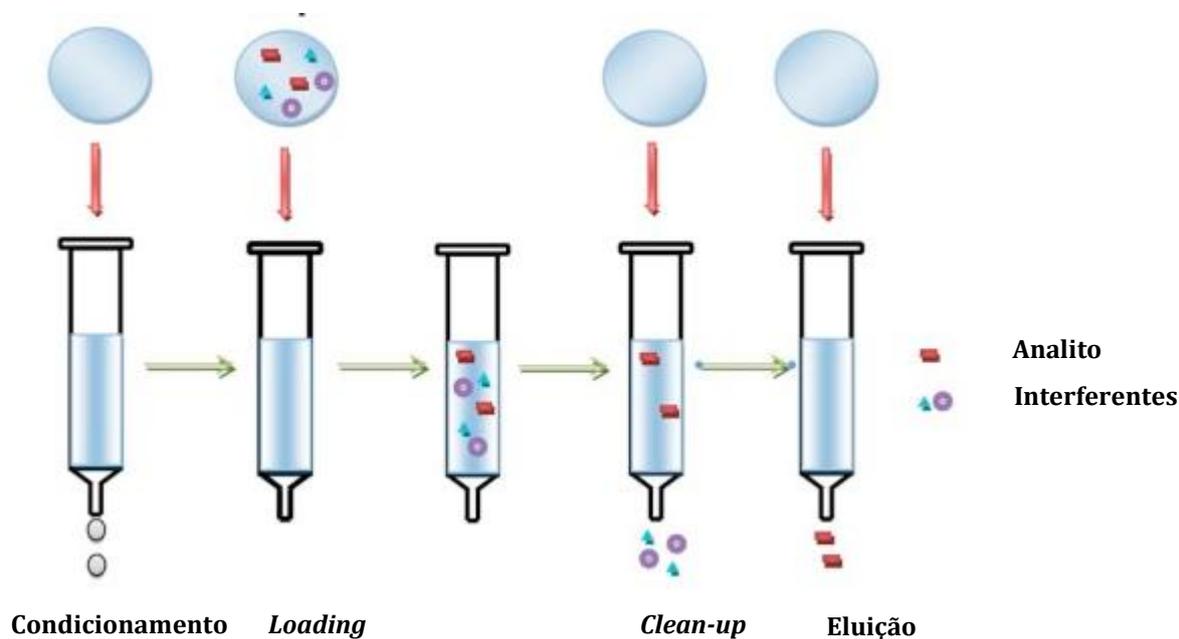


Figura 14. Representação esquemática do procedimento de MISPE. Adaptado de (Płotka-Wasyłka *et al.*, 2015).

No caso dos PCPs foi possível verificar que sete dos dezanove estudos analisados, descrevem a aplicação de MIPs como sorbentes adequados à técnica de SPE. Águas ambientais (Lorenzo *et al.*, 2013), solos (Verma e Xia, 2010), sedimentos (Núñez *et al.*, 2010), extratos de plantas (Karasová *et al.*, 2005) e produtos alimentares (He *et al.*, 2011), representam diferentes tipos de amostras extraídas por MISPE como o objetivo de analisar PCPs. Beltran *et al.* (2010) relatam a preparação de dois MIPs para a análise de parabenos em águas de rio. O primeiro MIP foi preparado de acordo com a abordagem semi-covalente através da polimerização por precipitação, ao passo que o segundo MIP baseado na abordagem não-covalente foi preparado por

polimerização em *bulk*. A aplicação dos dois MIPs ao formato de SPE permitiu verificar que o MIP não-covalente conduziu a recuperações entre 22 e 67% para os compostos em análise, enquanto que o MIP semi-covalente apenas permitiu recuperações entre os 14 e os 39%. Assim, segundo os autores, o excesso de monómero característico da abordagem não-covalente poderá sobrepor-se a uma melhor definição das cavidades obtidas na estratégia semi-covalente, o que implica uma maior retenção dos analitos. Por este motivo os autores decidiram usar o MIP não-covalente para o desenvolvimento de um método de análise de parabenos em amostras de águas reais por extração em fase sólida com MIP, acoplado a um equipamento de cromatografia líquida com detetor ultravioleta (MISPE-HPLC-UV). Os resultados obtidos foram alvo de comparação com um sorbente comercial (HLB Oasis). A extração com o MISPE conduziu a melhores recuperações e a cromatogramas mais limpos do que o sorbente comercial, como se pode ver na Figura 15. Contudo, apenas foi possível a deteção de dois dos quatro parabenos em análise, facto atribuído a interferências na quantificação.

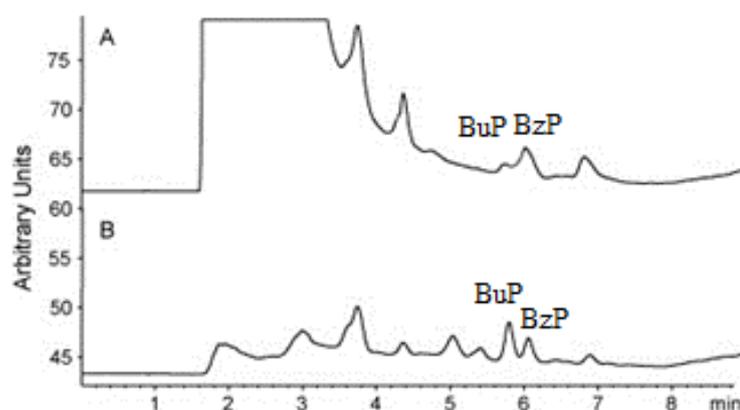


Figura 15. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV para amostras de água real após a extração com C18 (A) e MIP (B), utilizados como sorbentes em procedimentos de SPE. Antes da extração as amostras foram fortificadas com metilparabeno (MtP), etilparabeno (EtP), butilparabeno (BuP) e benzilparabeno (BzP). Adaptado de (Beltran *et al.*, 2010).

Em alternativa Lorenzo *et al.* (2013), apresentaram um MIP seletivo ao butilparabeno preparado pela técnica de polimerização por precipitação. Este trabalho combinou a aplicação da técnica MISPE com a deteção eletroquímica por nanotubos de carbono. Esta metodologia permitiu obter recuperações no intervalo de 82 a 85% para amostras de águas de rio contaminadas a vários níveis com butilparabeno, conduzindo a um limite de deteção de $3,8 \mu\text{g.L}^{-1}$. Apesar da diminuição do limite de deteção deste método em comparação com o método reportado por Beltran *et al.* (2010), os autores observaram uma interferência considerável nas recuperações finais do butilparabeno, aquando da adição de outros parabenos às amostras. Na verdade, as recuperações

aumentaram para valores próximos dos 150% o que se deveu a uma semelhança dos potenciais de oxidação exibidos pelos compostos em análise. Assim, os autores concluíram que os diferentes parabenos em análise não poderiam ser distinguidos e como consequência o sinal medido deveria ser interpretado como a quantidade total de parabenos na amostra. Este exemplo coloca em evidência um dos problemas que pode advir do processo de *design* dos MIPs. Neste caso, *template* e analito correspondiam a compostos distintos, benzilparabeno e butilparabeno, respetivamente. Esta opção baseou-se na necessidade de evitar possíveis interferências provocadas pela libertação não controlada de *template* que pudesse permanecer no MIP, mesmo após a sua lavagem. No entanto, esta escolha produziu um efeito indesejado uma vez que resultou numa capacidade de reconhecimento idêntica para o analito alvo e para os outros parabenos.

Verma e Xia (2010) apresentaram uma interessante comparação entre o desempenho de um MIP e um sorbente comercial (C18) para a extração por SPE de *triclosan* (TCS) e *triclocarban* (TCC) em solos e biosólidos. Para o efeito, o MIP produzido por polimerização em *bulk*, foi impresso com um composto análogo, neste caso a 4,4'-diclobenzofenona, após ter sido confirmada a ausência de interferência na quantificação do TCS e TCC. Os procedimentos SPE foram otimizados para cada sorbente e a análise dos extratos foi realizada por HPLC-UV. No caso particular dos biosólidos verificou-se que o MISPE permitiu obter uma recuperação de 89,9% para o TCC contra 43,3% obtidos com o sorbente comercial de C18. Por sua vez, no caso do TCS, apenas foi possível a sua quantificação após a extração com o MISPE, uma vez que o cromatograma obtido após a extração com C18 revelou a presença de interferências significativas que tornaram impossível a quantificação deste composto nas amostras provenientes de biosólidos. Em comparação com outros métodos igualmente desenvolvidos para a análise de TCS em biosólidos, a metodologia de MISPE-HPLC-UV apresentada por Verma e Xia (2010) apresenta limites de deteção superiores a estudos que envolvem a deteção por LC-MS (Lozano *et al.*, 2010) e GC-MS (Ying e Kookana, 2007), os quais permitem baixar em cerca de 60 vezes os limites obtidos por MISPE-HPLC-UV. No entanto, a grande vantagem do MISPE prende-se com o aumento da seletividade do método sem que seja necessária a aplicação de técnicas complexas baseadas em detetores de massa.

Devido às suas características especiais, como seletividade, boa estabilidade química e facilidade de preparação, os MIPs são considerados adequados para a técnica de SPME, tomando a designação de MISPME. De modo semelhante ao SPME, o MISPME consiste na inserção de uma agulha num vial que contém a amostra, através de um septo. Quando a agulha perfura o septo, a fibra é estendida através da agulha para que ocorra a partição entre a matriz da amostra e a fase estacionária. Isto pode ocorrer de dois modos: *headspace* (HS) ou imersão direta (DI). No HS-SPME, a fibra é exposta à fase de vapor enquanto no DI-SPME, a fibra é imersa diretamente no líquido. A amostra encontra-se em agitação permanente com uma pequena barra magnética e

após extração a fibra é recolhida pela agulha. Em seguida, os analitos são termicamente desorvidos para o sistema de injeção de um cromatógrafo gasoso (GC) ou eluídos com solventes apropriados para um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Vas e Vékey, 2004). O procedimento do MISPME é apresentado na Figura 16. A aplicação do MISPME foi demonstrada pela primeira vez pelo grupo de Koster *et al.* (2001), com a preparação de uma fibra revestida por um MIP para a análise de clenbuterol. O MISPME pode ser de dois tipos: fibras com revestimento de MIP, nas quais uma fibra de sílica é revestida com um MIP ou fibras de MIP monolítico que consiste na síntese direta de fibras com MIP, utilizando capilares como moldes, retirados após polimerização (Zhang *et al.*, 2013). No estudo realizado por He *et al.* (2012) é referenciada a síntese de uma fibra de MIP monolítico para a análise de parabenos em amostras de soja através de GC. Neste trabalho, os autores fizeram a comparação do MISPME com outras fibras comerciais, entre elas, fibras de polidimetilsiloxano (PDMS), de poliacrilato (PA) e de *carbowax*/divinilbenzeno (CW/DVB). A eficiência de extração da fibra de MIP foi significativamente mais alta do que para as fibras comerciais, com recuperações entre 92 e 93% para os três tipos de parabenos em análise. Por outro lado, o MISPME conduziu à obtenção de cromatogramas com menor número de interferências, revelando uma extração efetiva em matrizes complexas.

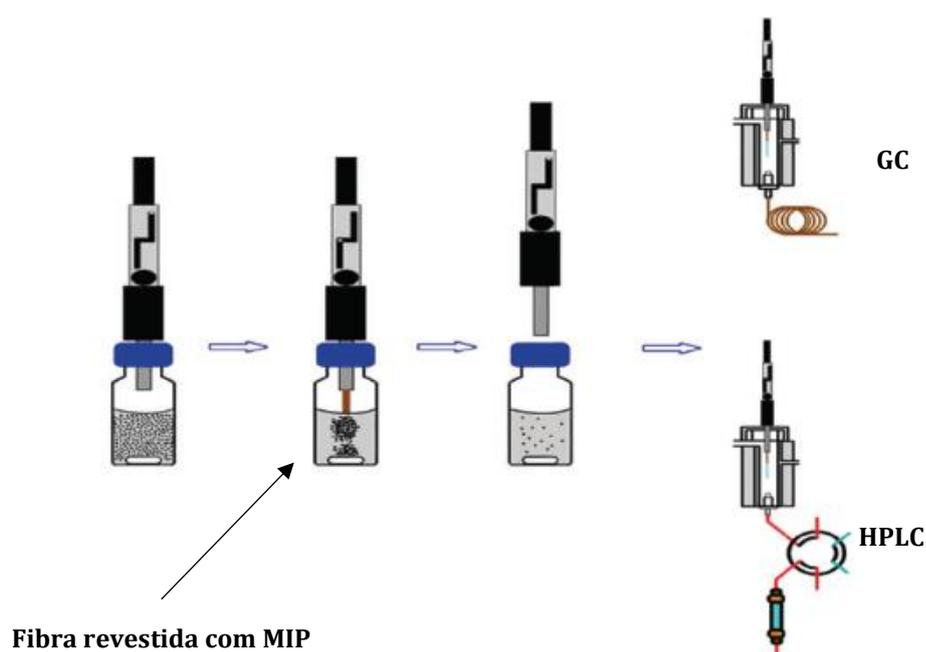


Figura 16. Representação esquemática do procedimento de MISPME. Adaptado de (Chen *et al.*, 2016).

Para além do vasto número de aplicações em técnicas de pré-tratamento, os MIPs podem também ser utilizados como fases estacionárias em técnicas cromatográficas, como por exemplo

HPLC, eletrocromatografia capilar (CEC) e cromatografia em camada fina (TLC), como materiais de empacotamento, ou colunas monolíticas. Por exemplo, Sun *et al.* (2001) prepararam três MIPs por polimerização em *bulk*, utilizando para o efeito ácido *p*-hidroxibenzoico (*p*-HB), ácido *p*-hidroxifenilacético (*p*-HPA) e ácido *p*-hidroxifenilpropiónico (*p*-HPPA) como *templates* para cada um dos MIPs. Após preparação, os MIPs foram transferidos para uma coluna de HPLC para avaliação do efeito de impressão. Estas colunas foram também testadas como meio de separação destes compostos análogos entre si. Com este estudo os autores confirmaram o efeito de impressão para os três MIPs através da avaliação do fator de separação, sendo que este efeito foi evidente para o MIP impresso com *p*-HB, o qual registou um fator de separação de 14,3. De acordo com a resolução da separação cromatográfica, os autores verificaram que o MIP impresso com *p*-HB permitia uma separação eficaz da mistura de *p*-HB e *p*-HPA, bem como da mistura de *p*-HB e *p*-HPPA. No entanto, nenhum dos polímeros conseguiu separar uma mistura composta por *p*-HPA e *p*-HPPA, devido à semelhança estrutural entre os dois compostos, sugerindo a necessidade de um estudo aprofundado para assegurar a sua separação.

A aplicação dos MIPs na área dos sensores químicos, tem sido alvo de uma atenção especial nos últimos anos. Os sensores baseados em MIPs têm sido discutidos como materiais promissores para aplicações clínicas, bioanalíticas, ambientais e controlo de processos (Suryanarayanan *et al.*, 2010). Um sensor é definido como um equipamento composto por um elemento de reconhecimento e um transdutor que transforma a informação química num sinal mensurável (Hulanicki *et al.*, 1991). Muitos investigadores acreditam que num futuro próximo, sensores baseados em MIPs possam competir com técnicas analíticas como cromatografia líquida, espectrometria de massa, métodos espectroscópicos, entre outros (Cheong *et al.*, 2013). A aplicação de MIPs na área dos sensores oferece vantagens como baixo custo de produção, fácil armazenamento, tempo de vida útil alargado e capacidade de ser aplicado em condições críticas.

O aspeto mais importante para o design de sensores com MIPs corresponde ao modo como o polímero é integrado com o transdutor. Isto pode ser feito de dois modos: síntese do polímero através de um método *in-situ*, como a eletropolimerização ou síntese prévia do MIP, por exemplo por polimerização radicalar, com posterior deposição na superfície do transdutor. Neste caso, a eletropolimerização é descrita como o método mais comum para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, embora o número de monómeros funcionais e *cross-linkers* compatíveis com este método seja limitado (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013).

No caso dos PCPs, cinco dos dezanove estudos analisados referenciam o desenvolvimento de MIPs para serem utilizados como elementos de reconhecimento na área dos sensores. De destacar a sua aplicação na deteção de classes como os filtros-UV (Li *et al.*, 2012), antimicrobianos (Liang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009) e parabenos (Gholivand *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010). Liu *et al.*

(2009) relataram o desenvolvimento de um sensor baseado em MIPs para a análise de *triclosan* (antimicrobiano). O sensor foi preparado pela eletropolimerização do monómero *o*-fenilenodiamina (*o*-PD) num eletrodo de carbono vítreo (GCE), na presença do *template* (*triclosan*). O método apresentado conduziu a resultados satisfatórios, mesmo na presença de estruturas similares ao analito, com um limite de deteção de 23,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Recorrendo à mesma técnica de polimerização, Li *et al.* (2012), descrevem a síntese de um sensor com MIP para a determinação de benzofenona (filtro-UV), em embalagens de produtos alimentares, previamente extraídas com etanol. A aplicação do método MIP-GCE a amostras de plásticos para bolos e leite conduziu a níveis de benzofenona entre os 5 e 10 mg.L^{-1} , com um limite de deteção de 1,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados foram comparados com as medições realizadas por HPLC-UV, que representa um método usual para a determinação de benzofenona (Pastorelli *et al.*, 2008), demonstrando concordância entre os dois métodos, o que faz deste tipo de sensores um alternativa viável aos métodos analíticos mais dispendiosos.

Com base no mecanismo de polimerização radicalar, Wang *et al.* (2010) produziram um MIP *in-situ* com metilparabeno e propilparabeno como *templates*, ácido metacrílico e diacrilato de tripropilenoglicol (TPGDA), como monómero e *cross-linker*, respetivamente. Após preparação da mistura polimérica, foi depositado um pequeno volume desta mistura sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE). A polimerização foi iniciada após ativação térmica, resultando na formação de um filme transparente sobre a superfície do eletrodo. Este método de polimerização representa uma alternativa à eletropolimerização na preparação de MIPs para sensores, apresentando como principal vantagem a compatibilidade com um grupo mais alargado de monómeros e *cross-linkers*. Pelo facto de terem utilizado dois *templates*, os autores verificaram capacidades de reconhecimento molecular idênticas, quer para os compostos utilizados na impressão, quer para compostos homólogos (etilparabeno e butilparabeno). Como tal, foi possível determinar com rapidez e exatidão a concentração total de parabenos em amostras de cosméticos. A combinação de um sensor baseado em MIP com a estratégia *multi-template* tem como vantagem a rapidez de deteção e a separação de um grupo de compostos homólogos de uma matriz complexa. Ainda na análise de parabenos, Gholivand *et al.* (2014), prepararam nanopartículas de MIP seletivas ao propilparabeno, através da polimerização por precipitação, as quais foram posteriormente incorporadas num eletrodo de pasta de carbono (CPE) através da mistura de grafite, *n*-ei-cosano e MIP. Ao nível da seletividade, os autores observaram que, na presença de interferentes, o sinal do propilparabeno não se alterou. Para além disso, os resultados obtidos demonstraram boas recuperações do analito em amostras de cosméticos, com valores entre 97 e 103%. Neste estudo, os autores compararam o desempenho do sensor MIP-CPE com outros tipos de sensores utilizados para análise de propilparabeno. Através desta comparação foi possível

verificar que o sensor MIP-GCE permite atingir limites de detecção mais baixos, comprovando a sensibilidade do método proposto.

De acordo com estes resultados, é previsível que o número de publicações sobre a aplicação de MIPs na área dos sensores possa aumentar significativamente num futuro próximo.

1.12. MIPs para a remediação de águas

Alternativamente, os polímeros impressos molecularmente têm sido considerados numa perspetiva de sorbentes com forte potencial para remediação de águas contaminadas. Os MIPs podem ser vantajosos no que diz respeito ao tratamento de águas, uma vez que estes materiais são projetados para remover especificamente um ou mais compostos, ao contrário do que acontece com tecnologias como o carvão ativado cuja utilização implica uma remoção não específica de vários compostos. Um exemplo da aplicação de MIPs para a remoção de PCPs em águas é apresentado por Gao *et al.* (2010). Estes descrevem a combinação do processo de sol-gel com a impressão à superfície em nanotubos de carbono para a obtenção de um MIP seletivo ao *triclosan*. Neste estudo, 50 mL de amostra de águas ambientais previamente contaminadas com TCS foram colocadas em contacto com 100 mg de polímero, durante um período de 30 min. No final, após separação das fases por centrifugação, o *template* foi desorvido do polímero e os eluentes analisados por HPLC-UV. Os resultados demonstraram excelentes recuperações com valores entre 90,7 e 95,3% para águas de rio e lago. Para além disso, o sorbente em estudo demonstrou a possibilidade de ser reutilizado durante pelo menos 6 ciclos consecutivos de adsorção e dessorção, sem registo de perdas de capacidade.

Um dos desafios na implementação dos MIPs para o tratamento de águas, passa pelo aumento da compatibilidade destes sorbentes com o meio aquoso. Nos MIPs não-covalentes, a presença de água é responsável por uma diminuição da capacidade de reconhecimento do analito, uma vez que as moléculas deste solvente podem competir com o analito pelas cavidades existentes no MIP. Com base neste pressuposto, alguns autores descrevem a inclusão de novos monómeros, como as ciclodextrinas, cuja estrutura exhibe uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade hidrofóbica (Folch-Cano *et al.*, 2014). Este tipo de estrutura permite várias formas de interação com o *template*, como ligações de hidrogénio, forças van der Waals, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas (Chen *et al.*, 2011), tornando-a uma escolha atrativa comparada com os monómeros convencionais. A título de exemplo, as ciclodextrinas têm sido aplicadas com sucesso na impressão molecular de compostos como colesterol (Soares *et al.*, 2007), ácido ursólico (Liu *et al.*, 2008), bilirrubina (Yang *et al.*, 2008b), *dextromethorphan* (Roche *et al.*, 2009).

Noutra vertente, Puoci *et al.* (2009) propuseram a inclusão de um co-monomero, o glicidilmetacrilato (GMA), que possui na sua estrutura um anel epóxido. Segundo os autores, a abertura deste anel permite aumentar o carácter hidrofílico do MIP, tornando-o mais compatível com meios aquosos. Num ensaio de adsorção de paracetamol em água, os autores testaram o desempenho do MIP com e sem a abertura do anel epóxido e compararam-nos com os respetivos NIPs, para avaliar o respetivo efeito de impressão. No final, os resultados demonstraram que a abertura do anel epóxido permitiu um aumento do efeito da impressão, comprovado por uma diferença significativa entre a adsorção do paracetamol no MIP e no NIP. Por sua vez, nos polímeros não modificados, a quantidade de paracetamol adsorvida ao MIP e NIP foi praticamente idêntica, revelando que a adsorção foi maioritariamente não específica.

Outro obstáculo à implementação de MIPs para o tratamento de águas está relacionado com a funcionalidade singular que maioria dos MIPs exhibe, ou seja, por norma, estes polímeros são pensados para o reconhecimento de um único analito alvo. No entanto, o processo de tratamento de águas requer a remoção simultânea de vários compostos e, nesse sentido, será desejável que o sorbente utilizado possa exibir capacidade para reconhecer vários analitos. Com base neste pressuposto, vários investigadores desenvolveram esforços para aumentar a funcionalidade dos MIPs. Por exemplo, Venkatesh *et al.* (2014) utilizaram uma estratégia multi-*template* para a remoção simultânea de três contaminantes em meio aquoso. A nicotina, epinefrina e fisostigmina foram utilizados como *templates* para a síntese de um sorbente polimérico, cujo desempenho foi comparado com dois sorbentes comerciais (carvão ativado e uma resina polimérica – XAD). Nesta comparação o MIP revelou uma excelente capacidade de adsorção, cerca de 40 a 60% superior relativamente aos restantes sorbentes. Outra aplicação com sucesso desta estratégia foi reportada por Dai *et al.* (2012), com a produção de um MIP na presença de cinco fármacos – ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno, diclofenac e ácido clofíbrico. O MIP obtido demonstrou seletividade perante os cinco compostos, com remoções próximas dos 100% dos analitos em águas superficiais ao fim de 30 min, mesmo na presença de interferentes.

Numa perspetiva de avaliação do potencial do NIP para processos de tratamento de água Murray e Örmeci (2012) realizaram uma análise comparativa do desempenho do MIP e NIP para a remoção de contaminantes em águas. Segundo estes autores os MIPs pela sua seletividade são mais adequados para o tratamento de águas residuais nas indústrias, em que é necessário remover compostos específicos presentes em concentrações elevadas nos resíduos aquosos gerados. Por outro lado, o NIP conhecido por ser menos seletivo que o MIP, poderá ser utilizado em aplicações que exijam a remoção de diversos contaminantes.

Todos estes trabalhos sugerem que a potencial aplicação dos MIPs para o tratamento de águas está mais próxima de se tornar realidade. Contudo existe ainda um longo caminho para ser

percorrido com alguns desafios, entre eles a incorporação destes materiais nas estações de tratamento e a investigação de possíveis efeitos adversos nos sistemas aquáticos e saúde humana.

Capítulo 2

2. Materiais e Métodos

Neste capítulo descrevem-se os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Na primeira parte é apresentada a listagem dos reagentes, consumíveis e equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental. Em seguida, é descrita a metodologia seguida para a preparação dos padrões e as condições envolvidas no método de análise de galaxolide. Os tópicos subsequentes tratam do desenvolvimento do MIP e do NIP (síntese e extração), da sua caracterização (morfologia e sorção) e também da aplicação destes materiais como sorbentes para a extração em SPE. Finalmente, são apresentados os cuidados adotados para impedir possíveis contaminações com galaxolide, bem como o tratamento de resíduos.

2.1. Reagentes e Consumíveis

Para a preparação do MIP foi utilizado galaxolide (HHCB) a 50% diluído em dietilftalato (DEP), ácido metacrílico (MAA), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo (AIBN), álcool polivinílico (PVA) (hidrolisado 87-89%, com peso molecular 130 000) da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), acetonitrilo (grau HPLC) da VWR (West Chester, EUA) e água destilada.

Nos ensaios de extração do *template* foi utilizado ácido acético (100%) proveniente da Pronalab (Tlalnepantla, Mexico), metanol, n-hexano e acetonitrilo (grau HPLC) da VWR (West Chester, EUA).

Para a preparação da fase móvel em HPLC-FL foi utilizado acetonitrilo (grau HPLC) da VWR (West Chester, EUA), água ultra-pura e ácido acético (100%) proveniente da Pronalab (Tlalnepantla, Mexico).

Os solventes testados na adsorção e procedimentos de extração em fase sólida foram: acetonitrilo, n-hexano e diclorometano (grau HPLC) da VWR (West Chester, EUA) e água destilada.

Ao longo do trabalho utilizaram-se filtros de seringa contendo uma membrana de 0,2 μm de PTFE, fritz, tubos de polipropileno e colunas de vidro para SPE da VWR (West Chester, EUA).

2.2. Equipamento

A análise do galaxolide realizou-se por cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de fluorescência (HPLC-FL). O equipamento trata-se de um Hitachi Elite LaChrom VWR (Darmstadt, Alemanha) equipado com uma bomba L-2130, um injetor automático L-2200, o respetivo sistema de deteção por fluorescência L-2480 e um sistema de aquisição e tratamento de dados (EZChrom Elite Client/Server ver. 3.1.6). A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna C18 de fase reversa Purospher®STAR RP-18 *endcapped* (250 mm x 4 mm; 5 μm) juntamente com uma pré-coluna Purospher®STAR (4 mm x 4 mm; 5 μm), ambas da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Nas medições de volume das soluções padrão foram utilizadas micropipetas com as seguintes capacidades: 10-100 μL , 100-1000 μL e 500-5000 μL da marca Eppendorf (Hamburgo, Alemanha).

No processo de síntese do MIP e do NIP foi utilizada uma placa de agitação magnética com aquecimento, da Velp Scientifica (Usmate, Itália). Relativamente aos ensaios de extração do *template* foi utilizada uma instalação com mantas de aquecimento e um banho de ultra-sons da JP Selecta (Barcelona, Espanha). Por sua vez, para a separação de fases foi utilizada uma centrífuga Rotofix 32A (Hettich, Alemanha)

Para a realização dos ensaios de adsorção foi utilizada uma incubadora com controlo termostático da Lovibond (Dortmund, Alemanha), uma placa de agitação magnética com multi-posições da Velp Scientifica (Usmate, Itália) e peneiros Endecotts (Londres, Reino Unido).

Os ensaios de extração em fase sólida foram realizados num manifold com capacidade para a extração simultânea em 12 colunas, da Macharey Nagel (Duren, Alemanha).

2.3. Preparação dos Padrões

Inicialmente foi preparada uma solução-mãe de galaxolide em metanol, de concentração 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir desta solução concentrada foram preparadas, por diluição numa mistura de acetonitrilo:água (85:15, v/v), 8 soluções padrão com concentrações entre 0,2 e 120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Partindo igualmente da solução-mãe foram preparadas 8 soluções padrão com concentrações

entre 1 e 120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ por diluição em água. A partir da solução-mãe foi preparado semanalmente um padrão de controlo em acetonitrilo:água (85:15, v/v) e em água com concentração de 120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Todas as soluções foram protegidas da luz com folha de alumínio e armazenadas a 4 °C por um período não superior a 1 mês.

2.4. Análise de galaxolide por injeção direta em HPLC-FL

A fase móvel utilizada foi baseada em Schüssler e Nitschke (1998) e consistiu numa solução de acetonitrilo:água (85:15, v/v) acidificada com ácido acético glacial (17 mM).

A fase móvel, preparada com água previamente filtrada, foi levada a desgaseificar com hélio durante 15 minutos antes de ser utilizada. Para as análises cromatográficas foi utilizado um caudal de 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ mantido em modo isocrático. Antes de cada conjunto de injeções, o equipamento foi purgado para remoção do ar presente nas tubagens, de modo a minimizar eventuais interferências. No início de utilização da coluna foi realizada uma sequência de estabilização com a fase móvel referida. No final de cada utilização foi realizada uma sequência de lavagem com acetonitrilo:água (85:15, v/v) com o intuito de remover o ácido acético que pudesse ficar retido na coluna, a fim de evitar a sua degradação.

As análises cromatográficas foram efetuadas à temperatura ambiente, com a injeção de um volume de amostra de 100 μL no sistema, em duplicado. Os parâmetros de fluorescência utilizados na deteção, comprimentos de onda de excitação e emissão ($\lambda_{\text{excitação}}$ e $\lambda_{\text{emissão}}$), foram respetivamente 280 nm e 310 nm. Cada análise teve a duração de 15 minutos, com o galaxolide a apresentar um tempo de retenção médio de aproximadamente 10 minutos.

2.4.1. Parâmetros de validação

Para avaliar a qualidade dos resultados do método de injeção direta em HPLC-FL, foram considerados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, precisão (expressa através do coeficiente de variação, CV %), exatidão (expressa através da percentagem de recuperação), limite de deteção e quantificação e incerteza global.

A linearidade foi avaliada para a gama de concentrações dos padrões utilizados para a construção da reta de calibração. Os limites de deteção e quantificação foram estimados com base

na razão de sinal/ruído igual a 3 e a 10, respetivamente. Por sua vez a precisão foi avaliada através da repetibilidade – coeficiente de variação para seis medições consecutivas do mesmo padrão, nas mesmas condições e a através da precisão intermédia – coeficiente de variação para a análise do mesmo padrão em dias diferentes. Para a avaliação da exatidão utilizou-se o método de adição de padrão a diferentes níveis de concentração em amostras reais e soluções padrão. O valor final da recuperação foi obtido através da razão entre a concentração obtida e a concentração esperada para o analito nas amostras. Finalmente, a incerteza global do método, foi determinada segundo a metodologia *bottom-up* (Group et al., 2000), de acordo com a informação presente no Anexo I.

2.5. Síntese do MIP e do NIP

A preparação do polímero impresso molecularmente com galaxolide foi realizada de acordo com o protocolo de polimerização em suspensão. Inicialmente, preparou-se uma solução 10% (m/m) de PVA, com a dissolução de 1 g de PVA em 90 mL de água destilada, a 60 °C e com agitação magnética a 300 rotações por minuto (rpm). Esta solução foi posteriormente arrefecida até atingir a temperatura ambiente. Para a etapa seguinte de síntese, utilizou-se igualmente um balão de 250 mL para misturar 1 mmole de *template* (galaxolide) e 4 mmole de monómero funcional (MAA), os quais foram dissolvidos em 4,3 mL de acetonitrilo (solvente porogénico). Esta solução foi mantida sob agitação durante 30 minutos para maximizar a interação entre as moléculas de monómero e *template*. Após este período, a solução pré-polimérica, constituída por monómero, *template* e solvente porogénico foi adicionada à solução de PVA. Em seguida adicionaram-se 20 mmole de *cross-linker* (EGDMA) e 43 mg de iniciador (AIBN). Durante 10 minutos a mistura reacional foi purgada com uma corrente de azoto, sob agitação magnética a 1600 rpm, para remoção do oxigénio existente no meio. Após esse período, o balão foi selado, a agitação foi reduzida até 300 rpm e a temperatura incrementada progressivamente até atingir 60 °C. Após estabilização da temperatura, foi contabilizado um período de 24 h para a realização da reação de polimerização. No final da reação, as partículas poliméricas foram filtradas através de papel de filtro de celulose com recurso a uma bomba de vácuo, seguindo-se o processo de extração do *template*. A fase líquida obtida após filtração foi utilizada para análise em HPLC-FL, com o objetivo de avaliar a quantidade de galaxolide impressa no polímero.

A produção do NIP realizou-se de modo semelhante à do MIP, mas sem a adição de *template*.

Na Figura 17 é apresentada a instalação utilizada para a síntese do MIP.

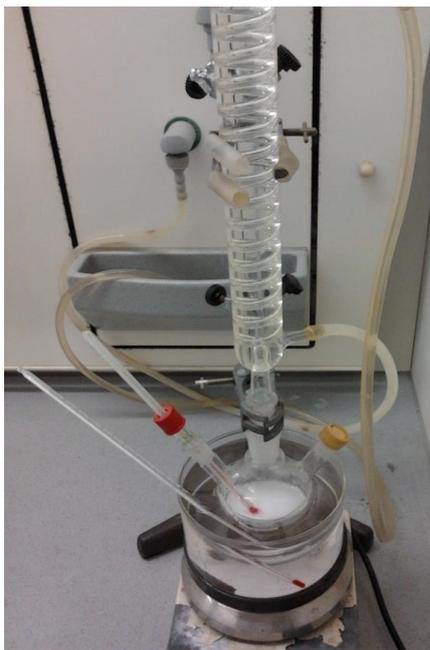


Figura 17. Instalação laboratorial utilizada para a síntese do polímero impresso molecularmente com galaxolide.

2.6. Extração do *template*

A extração do *template* impresso na matriz polimérica foi testada utilizando duas técnicas: Soxhlet e ultra-sons.

Para a extração em Soxhlet após síntese, o MIP foi envolvido em papel de filtro e colocado no interior da câmara de extração, com capacidade para 200 mL. O Soxhlet foi posteriormente conectado a um balão de fundo redondo com 150 mL de uma mistura de metanol:ácido acético (90:10, v/v). O restante sistema de extração era composto por uma manta de aquecimento e um condensador, como se pode verificar na Figura 18. A extração foi realizada durante 24 h, seguindo-se uma fase de arrefecimento. No final recolheu-se 1 mL do extrato para secagem numa corrente de azoto. Após secagem, o extrato foi retomado e diluído em acetonitrilo:água, 85:15, (v/v) para análise em HPLC-FL.



Figura 18. Processo de extração do *template* por Soxhlet.

Para a segunda técnica em estudo foi utilizado um banho ultrassónico com uma potência nominal de 420 W. Após síntese, o MIP foi transferido para um tubo de polipropileno, ao qual se adicionou 40 mL de metanol:ácido acético (90:10, v/v). Com o tubo devidamente selado, realizou-se a extração durante um período de 30 min. No final, a amostra foi centrifugada e o extrato recolhido após filtração com discos de PTFE 0,2 μm . Tal como no procedimento anterior, 1 mL de extrato foi levado à secura em corrente de azoto e analisado por HPLC-FL, após retoma e diluição em acetonitrilo:água, 85:15, (v/v).

De referir que o NIP foi lavado com o mesmo solvente utilizado na extração do MIP, para remoção de espécies não reagidas. Antes de serem utilizados, ambos os polímeros foram levados a secar numa estufa a 50 °C, durante um período de 24 h.

2.7. Caracterização do MIP e do NIP

2.7.1. Análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento permite a aquisição de imagens da topografia de superfície através do varrimento da amostra com um feixe de eletrões de alta energia. Através da interação entre os eletrões incidentes e os átomos da superfície da amostra também é possível obter informações sobre a sua composição. As imagens da superfície do material adsorvente foram obtidas num microscópio FEI QUANTA 400 FEG ESEM do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

As amostras foram revestidas com um filme fino de ouro/paládio, por pulverização catódica (*sputtering*), utilizando o equipamento SPI *Module Sputter Coater*.

2.7.2. Área superficial e porosidade

A caracterização textural das amostras foi baseada na isotérmica de adsorção em azoto, determinada a -196 °C com o equipamento Quantachrome NOVA 4200e. As amostras ($\sim 0,1\text{ g}$) foram desgaseificadas a 150 °C durante 3 h, sob vácuo. A área superficial das amostras ($S_{B.E.T}$) foi calculada pela equação Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T). O volume total de poros foi avaliado para uma pressão relativa de 0,95 e o diâmetro médio de poros foi determinado através da teoria de densidade funcional (DFT) (Seaton *et al.*, 1989). Estas análises foram realizadas no laboratório E-301, pertencente à unidade do Laboratório de Separação e Engenharia da Reação-Laboratório de Catálise e Materiais (LSRE-LCM) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP).

2.7.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi efetuada num sistema de análise térmica TG 209 F1 Iris ® Netzsch (Selb, Alemanha) no laboratório E-101 do LEPABE (FEUP) e consistiu na determinação por perda de massa, durante um processo de aquecimento, dos teores de humidade, voláteis, carbono fixo e cinzas.

A metodologia consistiu no aquecimento de cerca de 30 mg de amostra (MIP/NIP) numa atmosfera de azoto ($30\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$) de 25 a 700 °C , a $2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$, seguido de um patamar isotérmico de 9 min.

2.8. Cinética de adsorção

Com o objetivo de determinar a influência do tempo de contacto na adsorção do galaxolide no MIP e no NIP, bem como compreender o mecanismo de adsorção, foram realizados ensaios cinéticos em *batch*. Para o efeito pesaram-se 20 mg de polímero (MIP ou NIP) para frascos de vidro, aos quais se adicionaram 5 mL de uma solução de $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de galaxolide em água. Os frascos foram colocados numa incubadora (Dortmund, Alemanha) a temperatura constante e as soluções foram agitadas a 500 rpm durante diferentes períodos de tempo (5, 10, 20, 40, 60 e 120 min). Ao fim desse tempo, os frascos foram retirados da incubadora e a suspensão filtrada com discos de PTFE $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Estes ensaios foram posteriormente repetidos, nas mesmas condições, para uma solução de galaxolide a $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em acetonitrilo. A par destes ensaios, foram realizados

brancos, ou seja, o polímero em contacto com a fase líquida, sem analito, para avaliar possíveis interferências causadas por *bleeding* ou contaminação laboratorial. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e as amostras analisadas por um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FL).

A quantidade de galaxolide adsorvida nos polímeros em cada amostra foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$Q = \frac{(C_0 - C) \times V}{m} \quad (1)$$

em que Q ($\mu\text{g.g}^{-1}$) representa a quantidade adsorvida, C_0 e C ($\mu\text{g.L}^{-1}$) a concentração inicial e final de galaxolide, respetivamente, V (L) o volume de solução e m (g) a massa de polímero.

2.9. Isotérmicas de adsorção

Os ensaios de equilíbrio foram realizados em frascos de vidro, com um massa de MIP/NIP de 20 mg em contacto com 5 mL de soluções de galaxolide em acetonitrilo com concentrações entre os 30 e os 7000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. De modo semelhante ao procedimento para os ensaios de cinética, as amostras foram agitadas a 500 rpm, durante 120 min, numa incubadora a temperatura constante. Após os 120 min os frascos foram retirados da incubadora e a suspensão filtrada com discos de PTFE 0,2 μm . De referir igualmente a realização de brancos. Estes ensaios foram realizados em triplicado e no final as amostras foram analisadas por HPLC-FL. A quantidade de galaxolide adsorvida em cada amostra foi determinada pela equação 1.

2.10. Procedimento para o MISPE/NISPE

Para o estudo da aplicabilidade dos polímeros MIP e NIP para a extração e análise de galaxolide em águas, utilizaram-se colunas de vidro para SPE, com capacidade para 8 mL. Estas colunas foram empacotadas manualmente com 200 mg de cada um dos polímeros, entre dois *fritz* de teflon. As colunas foram colocadas numa unidade de vácuo para a extração em fase sólida, com capacidade para 12 colunas. Inicialmente, as colunas foram condicionadas com 5 mL de n-hexano, seguidos de 5 mL de água. Em seguida, 50 mL da amostra foram passados pelas colunas, na etapa

de *loading*. Para a etapa de lavagem foram utilizados 5 mL de uma mistura de metanol:água (35:65, v/v), seguindo-se a eluição com 5 mL de n-hexano. O eluato foi recolhido e evaporado sob uma corrente de azoto. O resíduo foi posteriormente retomado em 500 μ L de acetonitrilo:água (85:15, v/v) e analisado por HPLC-FL.

2.11. Validação do método MISPE-HPLC-FL para análise de galaxolide em águas.

O método de MISPE-HPLC-FL, tal como o método de injeção direta, foi validado através da avaliação da linearidade, limites de deteção e quantificação, precisão, exatidão e incerteza global. Para tal, foi utilizado um método de calibração externa, através da extração no MISPE de seis padrões de galaxolide em água, com concentrações entre os 0,1 e os 20 μ g.L⁻¹, nas condições referidas no tópico 2.10 (Figura 19). Ao mesmo tempo, foi realizado um branco, com água sem fortificação. Para cada concentração foram realizadas extrações em triplicado, com a respetiva injeção em HPLC-FL dos eluatos.



Figura 19. Instalação de MISPE utilizada para análise de galaxolide em águas.

Para a determinação da precisão do método, utilizou-se água pura contaminada com galaxolide a 3 níveis de concentração (0,1 ; 5 e 20 μ g.L⁻¹), com extrações em três dias consecutivos. Após injeção dos respetivos eluatos foi determinado o coeficiente de variação para avaliação da precisão intermédia do método.

Por sua vez, para a avaliação da exatidão foi utilizada uma amostra de água de afluente de ETAR, a qual após filtração foi contaminada com galaxolide a 0,4; 5 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para cada nível de concentração foram realizadas 6 extrações, para além do respetivo branco laboratorial (água de afluente sem fortificação). No final, após análise, foi calculada a recuperação para cada uma das extrações.

Do mesmo modo que para o método de injeção direta, a incerteza global do método MISPE-HPLC-FL foi avaliada através da metodologia de cálculo apresentada no Anexo I.

De referir que as colunas utilizadas neste estudo foram consecutivamente regeneradas, com a passagem de 10 mL de n-hexano, após cada extração. Este volume permitiu assegurar que os níveis se situassem abaixo do limite de deteção do método, garantindo a exatidão e precisão na análise de galaxolide.

2.12. Precauções para evitar contaminação cruzada

O galaxolide pode ser encontrado em vários produtos utilizados no nosso dia, como por exemplo cremes, perfumes, entre outros. Deste modo, foram tomadas precauções que passaram por não usar produtos com fragrância nos dias destinados à realização de trabalho experimental, tendo este cuidado sido alargado aos investigadores que partilhavam o mesmo laboratório. Para além disso, todo o material de vidro não calibrado foi lavado somente com solventes orgânicos (acetona, n-hexano) e água destilada, sendo posteriormente levados a uma estufa a uma temperatura de 400°C, por um período de 1 h.

2.13. Tratamento dos resíduos gerados

Todos os resíduos líquidos gerados ao longo deste trabalho foram recolhidos em recipientes fechados, devidamente rotulados e armazenados longe da luz e de fontes de ignição para posterior tratamento por parte do sistema de gestão ambiental da FEUP - EcoFEUP. Os resíduos sólidos gerados (MIP e NIP) foram também armazenados em recipientes fechados e encaminhados para posterior tratamento por incineração.

Capítulo 3

3. Resultados e Discussão

3.1. Desenvolvimento, implementação e validação de um método de análise de galaxolide por HPLC-FL

Com este trabalho pretendeu-se preparar um polímero impresso molecularmente (MIP) para o reconhecimento seletivo de galaxolide em matrizes aquosas. Como referido anteriormente, a obtenção de características desejáveis no que se refere a morfologia e uniformidade das partículas e das cavidades específicas, está dependente das espécies químicas utilizadas e da sua combinação. Nesse sentido, a estratégia seguida para a preparação deste MIP passou pela avaliação e otimização do processo de impressão molecular.

Para tal, foi necessário desenvolver uma metodologia analítica que permitisse a análise de amostras provenientes da reação de polimerização e da etapa de extração do *template*. Com base nas espécies utilizadas na preparação deste tipo de polímeros, era expectável que as amostras resultantes da polimerização pudessem exibir alguma complexidade. Para além do galaxolide (*template*), poderiam existir vestígios de monómero, *cross-linker* e iniciador, diluídos numa mistura de solvente porogénico (acetonitrilo) e água. Outro dos propósitos desta metodologia analítica seria a sua aplicação à caracterização do MIP e do respetivo NIP, através da análise de amostras provenientes de ensaios de adsorção.

Com o objetivo de detetar e quantificar o *musk* galaxolide em soluções aquosas provenientes das etapas de preparação, caracterização e aplicação dos polímeros desenvolveu-se e validou-se um método analítico sensível e expedito, recorrendo para isso à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de fluorescência (HPLC-FL), através de injeção direta.

A identificação e quantificação do composto foi obtida após injeção direta de padrões de galaxolide preparados numa mistura de acetonitrilo:água (85:15, v/v), à temperatura ambiente. Na Figura 20 está representado um cromatograma de uma solução padrão de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) de concentração 120 µg.L⁻¹. O pico do galaxolide surge com um

tempo de retenção de cerca de 10 min, seguido de um pequeno pico, assimétrico (11 min), o qual é descrito como um subproduto do processo de produção do galaxolide (Schüssler e Nitschke, 1998).

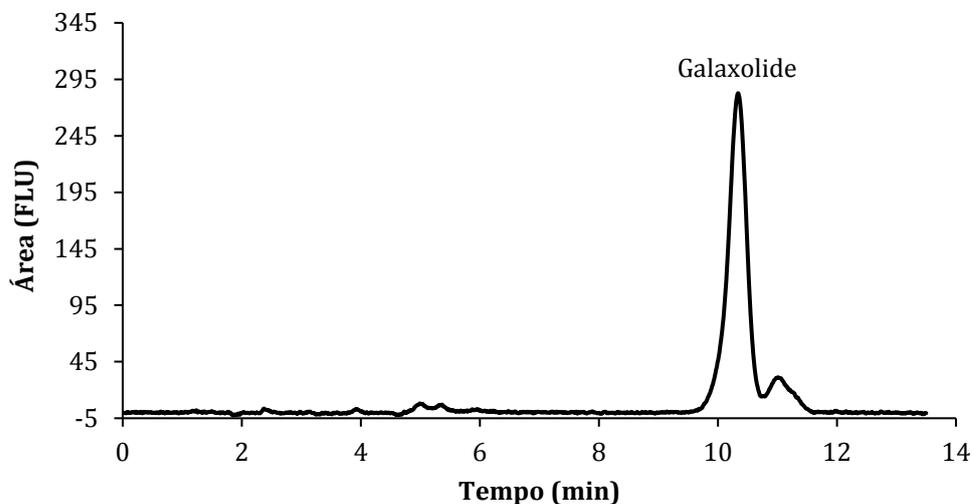


Figura 20. Cromatograma obtido após a injeção de 100 μL de um padrão de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) a 120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A análise foi realizada por HPLC-FL, com uma mistura de acetonitrilo:água acidificada com ácido acético glacial, 100% (85:15 v/v) a um caudal de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A detecção foi realizada a um comprimento de onda de excitação e de emissão de 280 e 310 nm, respetivamente.

3.1.1. Efeito de matriz e outras possíveis fontes de incertezas associadas ao método

O efeito de matriz (EM) de um método analítico corresponde à variação da resposta instrumental causada pela presença de outros componentes ou interferentes (Smeraglia *et al.*, 2002). No sentido de minimizar ou eliminar esta interferência têm sido propostas várias estratégias, tais como a mudança das fases móveis (Benijts *et al.*, 2004), alteração do método de preparação das amostras (Chambers *et al.*, 2007; Matuszewski *et al.*, 1998), a utilização de diferentes técnicas de calibração – *matrix-matched calibration* (Kmellár *et al.*, 2008) ou mesmo a adição de padrão interno (Wu *et al.*, 2010a). Outra das estratégias para reduzir o impacto dos interferentes consiste na diluição das amostras a injetar (Kruve *et al.*, 2009).

Do processo de polimerização em suspensão, para além das respetivas partículas poliméricas, resulta uma fase aquosa composta por galaxolide que não é retido no polímero e outras espécies químicas que não reagiram na etapa de polimerização. Nesse sentido interessava perceber se a presença de outras espécies químicas, como por exemplo o ácido metacrílico (monómero), o

dimetacrilato de etilenoglicol (*cross-linker*) e o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo (iniciador) poderiam alterar a resposta obtida para o galaxolide usando o método proposto.

O efeito de matriz poderia também vir a fazer-se sentir na etapa de extração, com a otimização da lavagem do polímero bem como nos ensaios de caracterização dos polímeros. Estas etapas implicam a quantificação de galaxolide em soluções compostas só por água ou acetonitrilo e em solventes diferentes dos utilizados no método de injeção direta, entre eles a mistura de metanol:água.

Como tal, para a avaliação do efeito de matriz foram preparados padrões de galaxolide com concentração igual a 120 µg.L⁻¹ nos solventes que se pretendiam estudar. Por sua vez, para o ensaio com os interferentes provenientes da polimerização, recorreu-se à fase aquosa obtida após preparação do NIP. Na base desta escolha esteve o facto de na síntese do NIP se utilizarem os mesmos reagentes que no MIP, com a exceção do uso do *template*, o que permite partir de uma matriz onde não existe o analito. A esta matriz fez-se a adição de galaxolide de forma a obter um padrão de concentração 120 µg.L⁻¹. Cada uma destas amostras foi injetada em triplicado e no final foi calculado o efeito de matriz, definido através da seguinte equação:

$$EM (\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad (2)$$

em que *B* representa a área média do padrão no solvente ou matriz em análise e *A* a área média do padrão no solvente usado no método proposto (acetonitrilo:água, 85.15, v/v).

Pela análise da Tabela 4 pode-se verificar que, com a exceção do acetonitrilo, as restantes matrizes conduziram a uma diminuição de sinal, uma vez que apresentam valores inferiores a 100%. Esta interferência é mais significativa para o caso da água, visto que o desvio da resposta neste solvente é superior a 15%. Considerou-se por isso que a resposta do galaxolide em água justificaria a realização de uma calibração independente, enquanto os desvios nas respostas em metanol:água e na matriz reacional podem ser consideradas desprezáveis, ficando incluídas na incerteza analítica.

Tabela 4. Efeito de matriz baseado nas razões das áreas obtidas para o galaxolide nos diferentes tipos de matrizes e solventes, com o respetivo desvio padrão (DP).

Solvente/Matriz	EM (%) \pm DP
Acetonitrilo	100,2 \pm 0,3
Água	78,1 \pm 0,2
Metanol:Água (35:65, v/v)	92,0 \pm 1,6
Matriz Reacional	87,9 \pm 0,2

Na Figura 21 é possível encontrar uma comparação entre a resposta para um padrão de galaxolide preparado na matriz reacional de polimerização e um padrão de galaxolide preparado no solvente do método proposto, ou seja, acetonitrilo:água. Como se pode verificar, a injeção de um padrão na matriz reacional produz um sinal significativo, próximo dos dois minutos, para além do sinal de galaxolide aos 10 minutos. No entanto, os interferentes presentes nesta matriz não afetam a identificação do pico de galaxolide, que apresenta um formato e tempo de retenção semelhantes ao obtido para o padrão de controlo. Ao nível da quantificação, como ficou comprovado pelo cálculo do efeito de matriz, o desvio obtido para esta matriz é inferior a 15%, pelo que o método proposto poderá ser aplicado na análise deste tipo de amostras.

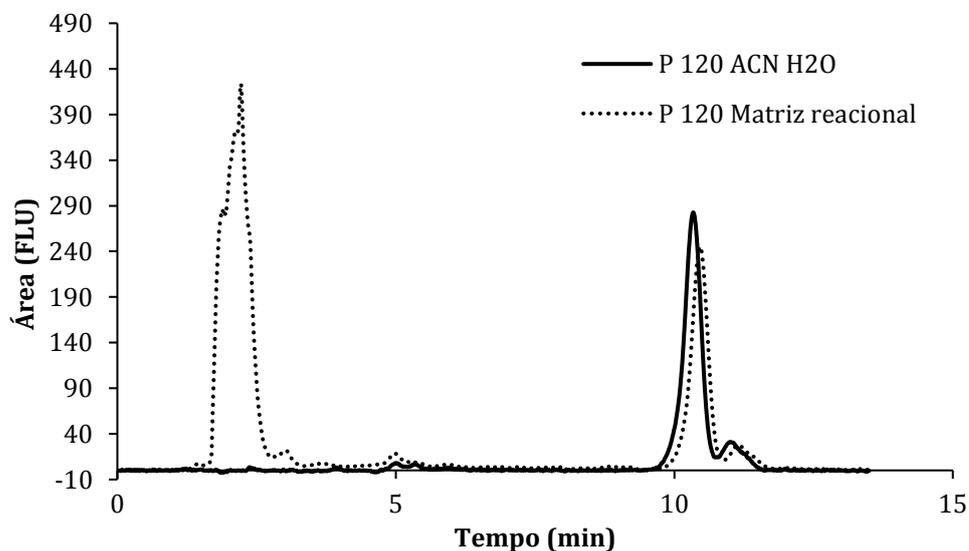


Figura 21. Cromatogramas obtidos após a injeção de 100 μ L de dois padrões de galaxolide 120 μ g.L⁻¹ preparados em acetonitrilo:água e na matriz reacional que resulta da reação de polimerização. A análise foi realizada em HPLC-FL, com uma mistura de acetonitrilo:água acidificada com ácido acético glacial, (85:15, v/v) a um caudal de 1mL.min⁻¹. A deteção foi realizada a um comprimento de onda de excitação e de emissão de 280 e 310 nm, respetivamente.

De acordo com o tipo de solvente, uma parte das amostras resultantes das etapas referenciadas anteriormente poderiam ser injetadas diretamente. A outra parte, devido à maior volatilidade dos solventes envolvidos teria de ser levada à secura e retomada no solvente de análise. Deste modo era fundamental confirmar possíveis perdas de analito nos casos em que fosse necessário aplicar um processo de secagem às amostras. Para esse efeito foram preparados padrões de galaxolide de concentração $120 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos seguintes solventes: n-hexano, diclorometano, misturas de n-hexano:diclorometano com composição - 33:67, 50:50 e 67:33, v/v e metanol:ácido acético (90:10, v/v). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada um dos padrões e aplicada uma corrente suave de azoto até ser atingida a secura. Os resíduos foram posteriormente dissolvidos com acetonitrilo:água (85:15, v/v) utilizando o mesmo volume da alíquota. As amostras foram injetadas no equipamento analítico e a resposta obtida foi comparada com o padrão de controlo. Após a realização destes ensaios em triplicado foram obtidas recuperações entre 90,9 e 99,1%. Assim, conclui-se que a etapa de evaporação e mudança de solvente não conduz a perdas significativas de galaxolide.

3.1.2. Estudo da linearidade, limites de deteção e quantificação

A validação de um método analítico passa pela determinação de um conjunto de parâmetros estatísticos que possibilita a avaliação das suas características, entre elas:

- a) Linearidade – reta de calibração e limites de deteção e quantificação;
- b) Precisão – ensaios de repetibilidade e precisão intermédia;
- c) Exatidão – ensaios de recuperação pelo método de adição padrão;
- d) Incerteza global associada (metodologia *bottom – up*).

No seguimento dos resultados obtidos para o efeito de matriz foram realizadas duas calibrações para a análise de galaxolide. Foram preparados oito padrões de galaxolide numa mistura de acetonitrilo:água (85:15, v/v), numa gama de concentrações entre 0,2 e $120 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para a calibração em água foram também preparados oito padrões de galaxolide, mas com concentrações entre 1 e $120 \mu\text{g.L}^{-1}$. De referir que cada padrão foi injetado em duplicado. Na Figura 22 são apresentadas as respetivas curvas de calibração e os limites de confiança associados (95%).

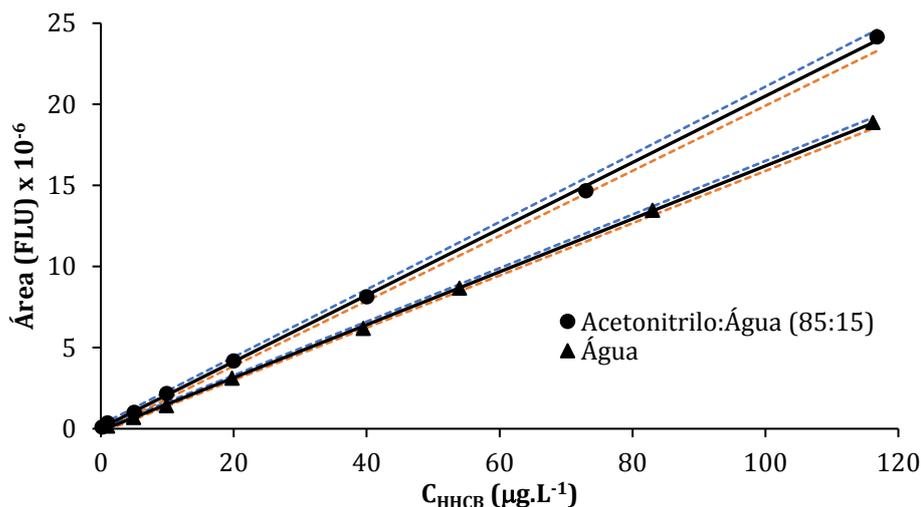


Figura 22. Retas de calibração para a injeção direta de padrões de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) e em água com os respectivos intervalos de confiança.

De acordo com os critérios descritos em Miller e Miller (2000), um método é adequado para análise se:

- A razão entre o desvio-padrão do declive (s_a) e o declive (a) for inferior a 5%;
- A ordenada na origem (b) contiver a própria origem, ou seja, se $b-s_b < 0 < b+s_b$;
- O coeficiente de correlação (R) for superior a 0,995.

Pela observação dos parâmetros de linearidade apresentados na Tabela 5, verifica-se que os três critérios anteriormente mencionados são cumpridos, pelo que as retas de calibração obtidas são adequadas para a análise do composto em estudo.

Tabela 5. Parâmetros de linearidade associados à reta de calibração para a quantificação de galaxolide.

	Acetonitrilo:Água (85:15, v/v)	Água
$A = (a \pm s_a) C + b \pm s_b$	$(205 \pm 2) \times 10^3 C (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) + (5 \pm 8) \times 10^4$	$(163,2 \pm 0,8) \times 10^3 C (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) + (4 \pm 5) \times 10^4$
s_a/a (%)	0,8	0,5
R	0,9998	0,9999
$b+s_b$ (FLU.L.µg⁻¹)	129181	85603
$b-s_b$ (FLU.L.µg⁻¹)	-33865	-5603

A determinação dos limites de detecção e quantificação foi obtida com base na razão sinal/ruído (S/N) igual a 3 e a 10, respetivamente. Foi obtido um limite de detecção de $0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $0,14 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o método em acetonitrilo:água, enquanto para o método em água se obtiveram limites de detecção e quantificação de $0,31$ e $0,58 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Tanto quanto é do conhecimento do autor apenas é possível encontrar um estudo na literatura com a quantificação de galaxolide por HPLC com detetor de fluorescência (Schüssler e Nitschke, 1998). Neste estudo a injeção direta de amostras aquosas de galaxolide sem pré-tratamento conduziu a um limite de detecção de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. O método desenvolvido por estes autores foi posteriormente aplicado com sucesso a amostras ambientais, nas quais o galaxolide adsorvido em sólidos tinha sido previamente extraído com etanol.

Em termos comparativos pode dizer-se que os métodos de injeção direta apresentados neste trabalho conseguem atingir limites de detecção mais baixos que o descrito na literatura, servindo os propósitos desta parte do trabalho.

3.1.3. Avaliação da Precisão

A precisão mede o grau de proximidade entre resultados analíticos obtidos para uma série de medições da mesma amostra, realizadas nas mesmas condições. Para o estudo da precisão de um método é comum avaliar-se a repetibilidade e a precisão intermédia. A repetibilidade é definida como o desvio padrão relativo de um mínimo de seis medições, do mesmo padrão, nas mesmas condições e espaçadas do menor tempo possível. Por sua vez, a precisão intermédia implica a variação de uma das condições experimentais, sendo também ela expressa através do desvio padrão relativo, de no mínimo seis medições do mesmo padrão. De referir que para a avaliação da precisão intermédia se fez variar o dia de análise, ou seja, o mesmo padrão foi analisado em seis dias consecutivos.

Para a determinação da precisão dos métodos propostos foram utilizados padrões de galaxolide a três níveis de concentração – $0,2$; 40 e $120 \mu\text{g.L}^{-1}$ para acetonitrilo:água e 1 , 40 e $120 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a água. Os resultados obtidos são apresentados em termos de coeficiente de variação (%CV), nas Tabela 6 e 7.

Tabela 6. Estudo da precisão do método analítico para análise de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v).

(n=6)	0,2 µg.L ⁻¹	40 µg.L ⁻¹	120 µg.L ⁻¹
Repetibilidade (CV%)	2,9	1,8	1,3
Precisão Intermédia (CV%)	6,8	3,8	2,4

Tabela 7. Estudo da precisão do método analítico para análise de galaxolide em água.

(n=6)	1 µg.L ⁻¹	40 µg.L ⁻¹	120 µg.L ⁻¹
Repetibilidade (CV%)	6,5	4,3	2,9
Precisão Intermédia (CV%)	5,8	4,1	3,4

Como se pode verificar, os coeficientes de variação apresentam valores abaixo de 10%, mesmo a baixas concentrações, pelo que se pode concluir que os métodos apresentados são precisos.

3.1.4. Avaliação da Exatidão

O grau de proximidade entre o resultado obtido e o resultado esperado é medido através da exatidão, que pode ser avaliada através da utilização de material de referência certificado ou através de ensaios de recuperação.

Para este trabalho a exatidão foi avaliada através da adição de padrão a três níveis de concentração. Para o método em acetonitrilo:água avaliou-se a recuperação em soluções padrão a 0,2; 40 e 120 µg.L⁻¹ tendo sido obtida a uma recuperação média de 98,3%. Relativamente ao método em água foram avaliadas as recuperações para quatro tipos de águas reais: torneira, rio, afluente e efluente (ETAR), a 1, 40 e 120 µg.L⁻¹. A inclusão de diferentes tipos de águas neste estudo teve como propósito avaliar a aplicabilidade do método de injeção direta na quantificação de galaxolide em amostras reais.

Tabela 8. Estudo de exatidão do método analítico HPLC-FL.

	Recuperação (%) (n=3)		
	1 µg.L ⁻¹	40 µg.L ⁻¹	120 µg.L ⁻¹
Água Torneira	45,4 ± 1,3	102,9 ± 0,6	87,7 ± 0,4
Água Rio	52,4 ± 3,0	111,0 ± 0,3	88,8 ± 0,8
Água Afluente	54,1 ± 4,0	109,6 ± 1,0	97,5 ± 0,5
Água Efluente	55,5 ± 0,3	119,2 ± 0,3	92,2 ± 0,4

De acordo com os valores que são apresentados na Tabela 8, as recuperações obtidas para os ensaios com amostras reais são consideradas aceitáveis para níveis de contaminação intermédios e altos. Por sua vez, para níveis de adição mais baixos as recuperações foram significativamente menores, variando entre 45,5 e 55,5%, o que poderá ser justificado por nos encontrarmos nas proximidades do limite de detecção. Concluiu-se por isso que, o método de injeção direta não será o mais indicado para a análise de amostras reais com galaxolide a níveis vestigiais.

3.1.5. Avaliação da Incerteza Global

A incerteza dos métodos propostos foi avaliada através da metodologia *bottom-up* descrita pela EURACHEM (2000) (Group *et al.*, 2000). De acordo com esta metodologia e com este método específico de análise, considerou-se que a incerteza analítica dependeria de quatro fontes principais de incerteza: a incerteza associada à preparação de padrões (U_1), a incerteza associada à reta de calibração (U_2), a incerteza associada à precisão (U_3) e a incerteza associada à exatidão (U_4). No Anexo I encontra-se descrito o procedimento de cálculo, bem como as expressões necessárias para estimar a incerteza global. Na Figura 23 podem ser encontrados os pesos relativos de cada fonte (U_1 , U_2 , U_3 e U_4) em função da concentração de padrão de galaxolide para os dois métodos de injeção direta. Como se pode verificar, o impacto de cada uma das fontes de incerteza consideradas varia consoante a concentração de galaxolide. Assim, para uma gama de concentrações inferior a 20 µg.L⁻¹, a fonte de incerteza com maior impacto no resultado final está associada à reta de calibração (U_2). Por sua vez, para concentrações superiores verifica-se que a incerteza global passa a ser significativamente influenciada pela precisão e exatidão dos respetivos métodos de injeção direta.

Fazendo a representação da incerteza global em função da concentração do analito resultam as representações gráficas presentes na Figura 24. Da análise destes gráficos conclui-se que para

concentrações superiores a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, a incerteza global do método é pouco significativa apresentando valores entre 2,6 e 12,7%. No entanto, a incerteza aumenta drasticamente para concentrações inferiores, atingindo valores próximos de 47 e 63%, em cada um dos métodos, para concentrações iguais a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. No caso do método para padrões de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v), obteve-se um valor de incerteza bastante elevado, para uma concentração de analito na ordem dos $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Perante estes valores pode-se afirmar que a concentração real de uma amostra virá afetada de uma incerteza considerável, em particular para baixas concentrações. Por outro lado, a quantificação de galaxolide pelo método injeção direta em água, poderá mesmo conduzir a resultados abaixo do limite de detecção.

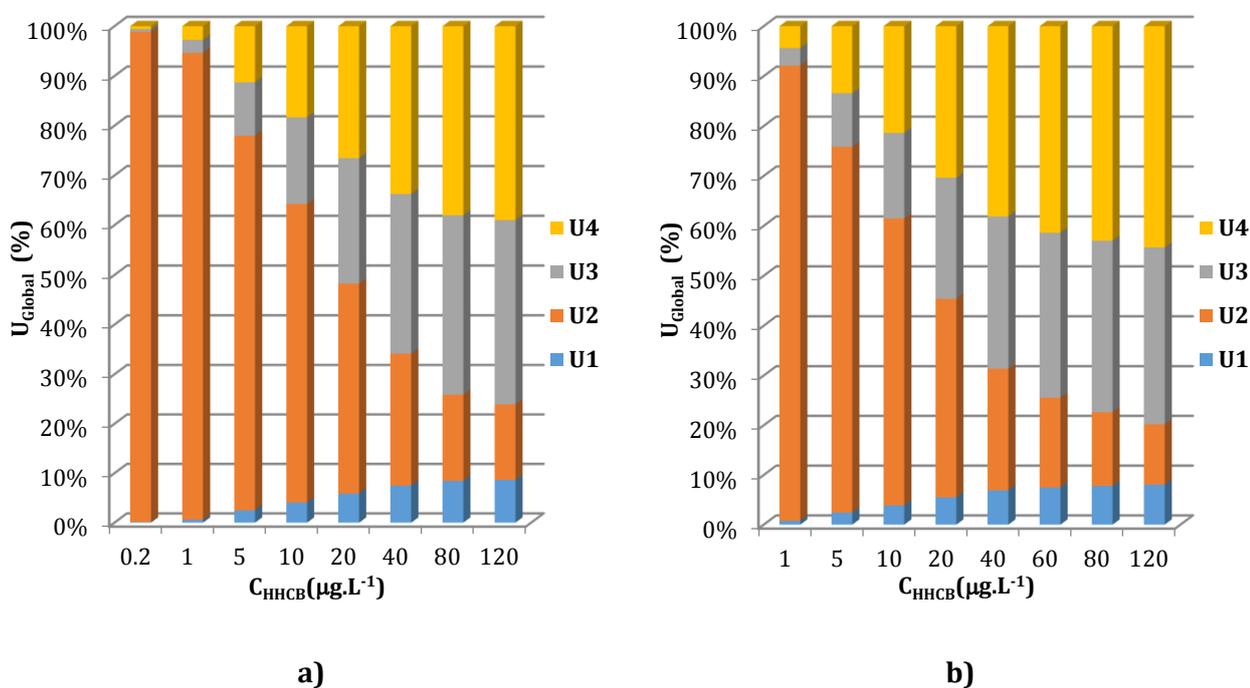


Figura 23. Contribuição das incertezas individuais no resultado da incerteza global para a quantificação de galaxolide em a) acetonitrilo:água (85:15, v/v) e b) água por injeção direta em HPLC-FL. U_1 - incerteza associada à preparação de padrões; U_2 - incerteza associada à reta de calibração; U_3 - incerteza associada à precisão; U_4 - incerteza associada à exatidão.

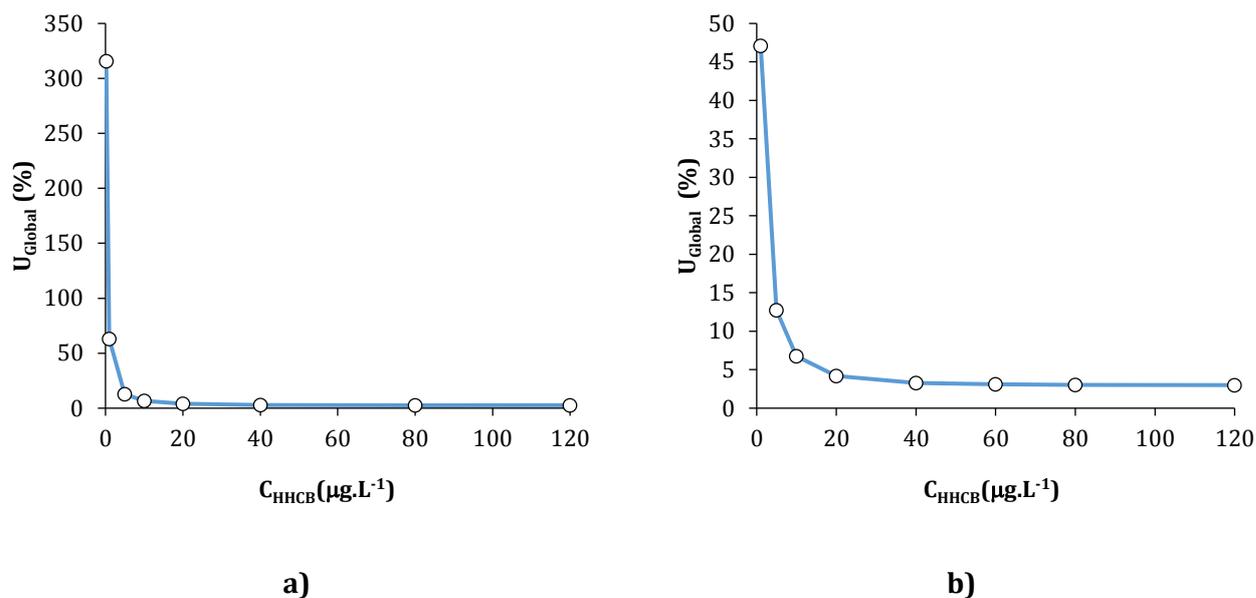


Figura 24. Incerteza global da metodologia analítica para a quantificação de galaxolide em a) acetonitrilo:água (85:15, v/v) e b) água por injeção direta em HPLC-FL.

3.1.6. Conclusão

A análise e quantificação de galaxolide nas diferentes etapas de síntese e caracterização de polímeros impressos molecularmente conduziu ao desenvolvimento de dois métodos analíticos, consoante o solvente, os quais foram validados com sucesso. Foram obtidos limites de deteção de 0,07 e 0,31 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a análise de galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) e água, respetivamente. Da avaliação da precisão concluiu-se que os métodos, na gama de concentrações 0,2 a 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$, apresentavam variações na resposta inferiores a 10%, conduzindo, por isso, a resultados precisos. No que diz respeito à exatidão, os ensaios realizados com soluções padrão permitiram obter resultados satisfatórios para o método em acetonitrilo:água, com uma recuperação média de 98,3%. Na aplicação de amostras reais nos ensaios de recuperação para análise de galaxolide em água verificaram-se recuperações entre 87,7 e 119,2% para concentrações de analito entre 40 e 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por sua vez, para concentrações mais próximas do limite de deteção foi observado uma diminuição considerável das recuperações, com valores entre 45,4 e 55,5%.

Para ambos os métodos é possível verificar que a incerteza global aumenta consideravelmente para concentrações de galaxolide inferiores a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, para concentrações de analito superiores a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ os valores de incerteza situam-se entre 3 e 12%. Este resultado aliado às baixas recuperações registadas para contaminações de menor concentração permitem concluir

que o método de injeção direta para a quantificação de galaxolide em amostras aquosas reais não será o mais adequado, uma vez que este se encontra tipicamente em níveis vestigiais, ou seja, entre os ng e os $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Brausch e Rand, 2011). Não obstante do objetivo final de analisar amostras reais, concluiu-se que os métodos de injeção direta aqui apresentados são adequados para a análise de galaxolide nas matrizes em estudo.

3.2. Síntese de um polímero impresso molecularmente seletivo ao galaxolide

Neste tópico descreve-se o processo de síntese de uma estrutura polimérica capaz de reconhecer e captar seletivamente a molécula de galaxolide em amostras aquosas. Como ponto de partida para a construção deste tipo de materiais, designados por polímeros impressos molecularmente (MIPs), foi realizada uma escolha criteriosa do tipo de protocolo a seguir, e das espécies químicas a utilizar.

Diante das abordagens existentes para o processo de impressão molecular, destaca-se, como referido no capítulo 1.7, a covalente e a não-covalente. Para a síntese deste MIP decidiu-se adotar a abordagem não-covalente pela versatilidade demonstrada ao nível da aplicação a um maior número de moléculas de *template*, permitindo também uma escolha mais flexível das espécies químicas para a construção destes materiais. Por outro lado, a natureza das interações envolvidas nesta abordagem permite que a remoção do *template* e recuperação do analito possam ser realizadas com uma simples extração por meio de solvente (Yan e Ramström, 2005).

Como analisado no capítulo de introdução aos MIPs (capítulo 1.7), os componentes básicos para a síntese destes polímeros consistem num *template*, um ou mais monómeros funcionais, um *cross-linker*, um iniciador da reação de polimerização e um solvente porogénico. Para a seleção destes componentes efetuou-se uma análise preliminar da bibliografia referente aos trabalhos publicados sobre a síntese de MIPs para a análise, ou extração da classe de compostos, que tal como o galaxolide, se inserem nos produtos de higiene e cuidado pessoal (PCPs). Assim, para um período compreendido entre 2001 e 2014 foram encontradas dezanove publicações sobre MIPs específicos para PCPs - 13 dos quais para a classe de conservantes (Beltran *et al.*, 2010; Gholivand *et al.*, 2014; He *et al.*, 2012; He *et al.*, 2011; Hu e Orwoll, 2010; Karasová *et al.*, 2005; Lorenzo *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2012; Núñez *et al.*, 2010; Raof *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2014a; Sun *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010), 4 para agentes antimicrobianos (Gao *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009; Verma e Xia, 2010), 1 para filtros-UV (Li *et al.*, 2012) e 1 para *musks* (Lopez-Nogueroles *et al.*, 2013b). Para estes dezanove trabalhos publicados, foram avaliadas as espécies químicas e o tipo de técnica de polimerização selecionados para a síntese do respetivo MIP.

Numa primeira análise confirmou-se que todos os estudos descrevem a síntese de MIPs de acordo com a abordagem não-covalente. No seguimento desta estratégia foi possível concluir que em 84% dos estudos se utilizou o analito como *template*, o que poderá ser justificado pelo objetivo

de maximizar a obtenção de cavidades compatíveis com o analito, em forma e tamanho. Esta opção poderá, no entanto, ser desvantajosa, pelo risco de libertação não controlada de moléculas de *template* (fenómeno de *bleeding*), durante a aplicação do MIP, resultando na obtenção de falsos positivos. Com base nesta análise e pelas razões já expostas, decidiu-se utilizar o próprio analito, ou seja, o galaxolide, como molécula de *template*, para a síntese do MIP em questão. A utilização do galaxolide em detrimento de moléculas com algum grau de similaridade, como por exemplo o tonalide, é suportada pelo objetivo de maximizar a afinidade do polímero para com a molécula do analito e também pelo desconhecimento de estudos sobre a utilização dessas mesmas moléculas como *templates* para a síntese de MIPs.

Relativamente aos possíveis monómeros funcionais, na análise das dezanove publicações compatíveis com a síntese destes polímeros para análise de PCPs, destacam-se espécies convencionais como o ácido metacrílico (MAA), o ácido acrílico (AA) e a 4-vinilpiridina (4-VP) (Vasapollo *et al.*, 2011). O monómero mais utilizado foi o MAA (32%), seguido da 4-VP (21%). Nestes estudos foi também observada a aplicação de outro tipo de monómeros como 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), feniltrimetoxissilano (PTMS) e *o*-fenilenodiamina (*o*-PD), que resultam da aplicação de técnicas de polimerização mais recentes para a síntese de MIPs como a impressão à superfície e a eletropolimerização (Figura 25).

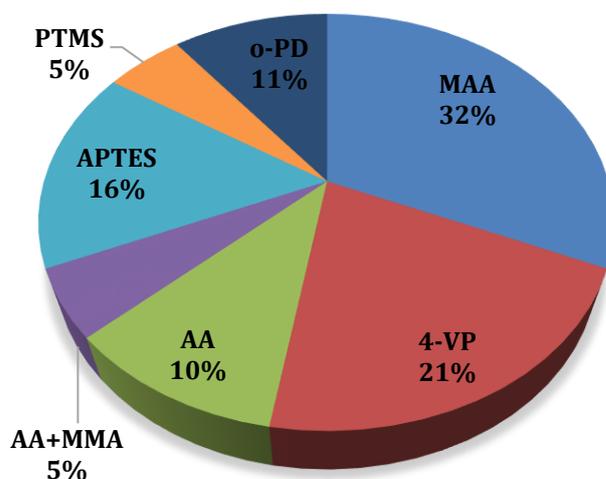


Figura 25. Tipo de monómero utilizado nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs. AA, acrilamida; APTES, 3-aminopropiltriétoxissilano; MAA, ácido metacrílico; MMA, metacrilato de metilo; *o*-PD, *o*-fenilenodiamina; PTMS, feniltrimetoxissilano; 4-VP, 4-vinilpiridina.

As razões da seleção do ácido metacrílico como o mais comum para a preparação de MIPs, devem-se à facilidade desta espécie química em estabelecer ligações de hidrogénio com uma grande variedade de compostos e também por permitir que a remoção do *template* possa ocorrer

em condições moderadas de temperatura (Kandimalla e Ju, 2004a). Com base nestas características, o MAA foi escolhido como monómero funcional.

No que diz respeito ao solvente porogénico, é sabido que a sua natureza influencia significativamente a estabilidade do complexo formado entre o monómero e o *template*. Para além disso, este solvente possui um papel fundamental nas características morfológicas dos MIPs, influenciando a porosidade e a área superficial destes materiais. Nos MIPs destinados à análise de PCPs, destaca-se a utilização do acetonitrilo como solvente porogénico, tendo sido utilizado em 47% dos estudos (Figura 26). De salientar também a utilização de solventes com valores de constante dielétrica mais baixa, como o tolueno, clorofórmio e diclorometano, que a nível da literatura referente a MIPs, são considerados como mais favoráveis ao processo de impressão (Yan e Ramström, 2005). Apesar de uma constante dielétrica mais elevada relativamente aos solventes anteriormente mencionados, o acetonitrilo é igualmente apropriado para o processo de síntese de MIPs. Tal facto é justificado por características como solubilidade e menor aptidão para a formação de ligações de hidrogénio, as quais são essenciais para a escolha do solvente porogénico (Yan e Ramström, 2005). De acordo com a Figura 26, verificou-se que 32% dos estudos analisados não referem a utilização de solvente porogénico, facto que se deve à utilização de técnicas de polimerização que não requerem o recurso a solventes. Após análise cuidada, considerou-se como adequada a utilização do acetonitrilo, baseado na capacidade em solubilizar o monómero e *template* seleccionados e também pelo baixo risco de interferência nas interações que se possam estabelecer entre o monómero e o *template* (Yan e Ramström, 2005).

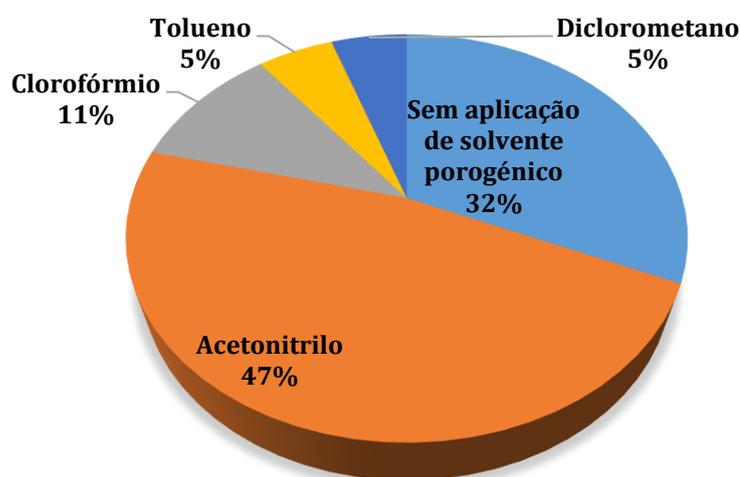


Figura 26. Tipo de solvente porogénico utilizado nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs.

No que diz respeito ao reagente responsável pelas ligações cruzadas nos MIPs, o *cross-linker*, os artigos analisados citam o dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) como o mais utilizado

(Figura 27). Com uma importância bastante significativa para a produção de MIPs baseados em PCPs surge o tetraetoxissilano (TEOS) que é um *cross-linker* específico do processo em sol-gel. Pela versatilidade e pelo facto de ser o *cross-linker* mais comum, seleccionou-se o EGDMA para a síntese do MIP seletivo ao galaxolide.

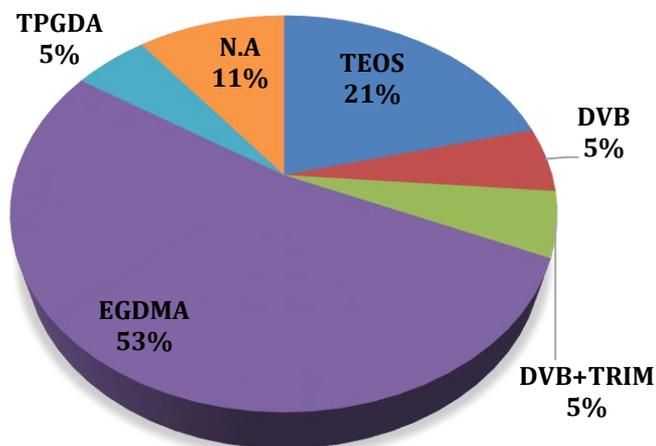


Figura 27. Tipo de *cross-linker* utilizado nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs. DVB, divinilbenzeno; EGDMA, dimetacrilato de etilenoglicol; TEOS, tetraetoxissilano; TPGDA, tripropileno glicol diacrilato; TRIM, trimetacrilato de trimetilolpropano. N.A, sem aplicação de *cross-linker*.

Dentro dos iniciadores e dos estudos em análise, foi possível verificar que todas as polimerizações com recurso a iniciador se deram na presença do 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo (AIBN). Trata-se de um iniciador que pode ser ativado por via térmica a temperaturas acima dos 60 °C, ou por via fotoquímica através da irradiação de luz ultravioleta entre os 300-360 nm. Nestas condições, o AIBN gera radicais livres que vão iniciar a polimerização dos monómeros funcionais e do *cross-linker* (Sellergren, 2000). É sem dúvida o iniciador mais utilizado na preparação de MIPs (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013), razão pela qual foi seleccionado para a preparação do MIP descrito neste trabalho.

Outro parâmetro relevante para síntese do MIP é a escolha da técnica de polimerização. O método a utilizar não só determina o formato e propriedades do MIP, como permite também definir a sua aplicação. De acordo com os estudos sobre MIPs para a análise de PCPs, foi possível verificar que a técnica mais recorrente foi a polimerização por precipitação (Figura 28). Outra técnica bastante utilizada foi a polimerização em *bulk* que é considerada por muitos uma técnica simples e segura, apesar das desvantagens associadas ao tamanho irregular de partícula (Pichon e Haupt, 2006). As restantes técnicas descritas foram o processo em sol-gel, a impressão à superfície e a eletropolimerização cujo objetivo passa pela síntese de MIPs com aplicabilidade na área dos sensores. Para o MIP em estudo, o processo de seleção da técnica de polimerização

baseou-se, sobretudo, nos recursos existentes no laboratório, custos envolvidos, tempo de execução e na experiência adquirida anteriormente neste grupo de investigação (Figueiredo *et al.*, 2015). Com base nestes fatores, decidiu-se seguir a técnica de polimerização em suspensão que, apesar de não se encontrar descrita nos estudos que envolvem MIPs e PCPs, se distingue pela reprodutibilidade de resultados e pela possibilidade de produção em larga escala. Estes aspetos poderão, aliás, ser bastante vantajosos para aplicação do MIP a nível industrial. Por outro lado, trata-se de uma técnica que conduz à obtenção de partículas dispersas e uniformes, com diâmetros teóricos na ordem das dezenas de micrómetros, com uma vasta gama de aplicabilidade (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). Apesar disso, esta técnica pode apresentar como limitação a interferência do solvente de dispersão, por norma a água, nas interações estabelecidas entre o *template* e o monómero funcional, influenciando as propriedades de reconhecimento do analito (Chen *et al.*, 2011). Comparada com técnicas mais atuais, como por exemplo, a impressão à superfície, a polimerização em suspensão destaca-se pela simplicidade de execução, permitindo obter partículas poliméricas num tempo inferior (Yan e Row, 2006).

Para além das espécies químicas já referidas, a técnica em suspensão requer a utilização de dois reagentes adicionais, um solvente de dispersão, neste caso a água e um agente estabilizador (tipicamente álcool polivinílico) para evitar a coagulação das gotas de monómero (Turiel e Martin-Esteban, 2004; Zhang *et al.*, 2003).

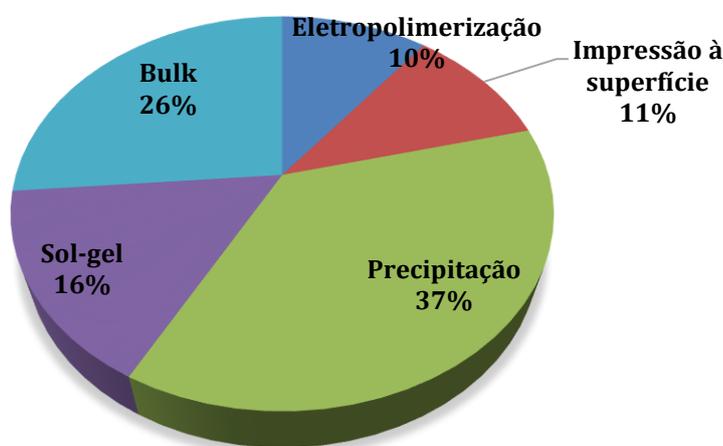


Figura 28. Técnicas de polimerização aplicadas nos dezanove estudos sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs.

A análise dos componentes envolvidos no processo de síntese dos MIPs, permitiu definir as espécies químicas e a técnica para o desenvolvimento de um MIP seletivo ao galaxolide. Seguindo uma abordagem não-covalente, selecionou-se o galaxolide como molécula de *template*, o ácido metacrílico como monómero funcional, o dimetacrilato de etilenoglicol como *cross-linker* e o

acetonitrilo como solvente porogénico. Esta mistura reacional foi polimerizada de acordo com a técnica em suspensão, utilizando como iniciador o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo e como fase dispersiva a água que continha um estabilizador, o álcool polivinílico.

A nível da literatura referente a MIPs produzidos em suspensão parece existir conformidade relativamente às espécies químicas utilizadas no processo de impressão. Assim as espécies MAA, EGDMA e AIBN, representam, por norma, o monómero, *cross-linker* e o iniciador mais utilizados. Para além disso, a utilização de PVA e água na fase dispersiva é também bastante usual (Lai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2001; Liu e Lei, 2012; Matsui *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2008a). Como alternativa à água e ao PVA, Mayes e Mosbach (1996) propõem a utilização de um tensoativo fluorado, previamente sintetizado e de um solvente perfluorocarbonado, para a produção de um MIP seletivo a (*terc*-butoxicarbonilo)-L-fenilalanina. Segundo estes autores, este solvente permitiria evitar a interferência causada pela água nas interações estabelecidas entre *template* e monómero. Apesar do MIP obtido apresentar uma boa *performance*, a utilização destes dois novos compostos impõe limitações na aplicabilidade e praticabilidade do processo. Relativamente ao solvente porogénico concluiu-se que os MIPs produzidos em suspensão utilizam para a sua formulação solventes apolares como é o caso do tolueno (Wang *et al.*, 2012) e do clorofórmio (Lai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008a). Nesse sentido a inclusão do acetonitrilo, representa a utilização de um conjunto, que tanto quanto é do conhecimento do autor, nunca foi utilizado previamente.

3.2.1. Preparação de diferentes formulações de polímero

Na primeira fase deste trabalho, com o objetivo de encontrar as razões molares mais adequadas para obtenção do polímero realizaram-se ensaios de otimização fazendo variar um a um as proporções das três principais espécies químicas envolvidas na síntese do MIP: *template*, monómero e *cross-linker*. Esta otimização baseou-se, por isso, na avaliação de nove formulações, conforme expresso na Tabela 9. O desempenho dos polímeros impressos molecularmente com base no modelo não-covalente está bastante dependente do número e extensão das interações moleculares entre o monómero funcional (M) e o *template* (T) na solução pré-polimérica (Alexander *et al.*, 2006; Andersson e Nicholls, 1997; Nicholls *et al.*, 2001). Sendo descrito como um processo em equilíbrio, a associação T:M é favorecida pela adição de monómero em excesso, relativamente ao número de moles de *template*. Com base neste pressuposto e tendo como ponto de partida a razão estequiométrica mais usual de 1:4 (T:M) para a síntese de MIPs (Vasapollo *et al.*, 2011), decidiu-se testar três razões decrescentes de T:M.

Devido ao impacto que tem em aspetos que vão desde a morfologia da matriz polimérica à estabilidade da cavidade formada, o *cross-linker* assume-se como uma das principais variáveis a

controlar no processo de síntese deste tipo de polímeros. Do ponto de vista de uma reação de polimerização, devem ser utilizadas concentrações mais elevadas de *cross-linker* de forma a obter materiais mecanicamente mais estáveis e com poros mais acessíveis resultantes do processo de produção do material. Com base nesta premissa foram utilizadas razões estequiométricas de *cross-linker* compreendidas entre 60 e 80% relativamente ao número total de moles dos três tipos de espécies em estudo.

Para cada uma das formulações foi obtida uma massa aproximada de 2,5 g de polímero. No final da reação de polimerização recolheu-se uma amostra da fase líquida que, após filtração, foi analisada por HPLC-FL. Com esta análise pretendia-se avaliar a extensão da interação entre monómero e *template*, através do cálculo da quantidade de galaxolide retido no polímero após reação. Com base na equação 3 foi possível calcular a taxa de impressão em cada uma das formulações testadas.

$$\begin{aligned} \% \text{ Taxa de impressão} \\ = \frac{m_{\text{galaxolide}_{\text{inicial}}} - m_{\text{galaxolide}_{\text{MR}}}}{m_{\text{galaxolide}_{\text{inicial}}}} \times 100 \end{aligned} \quad (3)$$

em que $m_{\text{galaxolide}_{\text{inicial}}}$ representa a massa de *template* (mg) utilizado na polimerização e $m_{\text{galaxolide}_{\text{MR}}}$ a massa de *template* (mg) que fica na matriz reacional após reação.

Tabela 9. Razões estequiométricas de *template*:monómero (T:M) e monómero:*cross-linker* (M:CL) investigados para a otimização do polímero impresso molecularmente.

Formulação	T/M	M/CL
MIP1		1:2
MIP2	1:4	1:3
MIP3		1:5
MIP4		1:2
MIP5	1:6	1:3
MIP6		1:5
MIP7		1:2
MIP8	1:8	1:3
MIP9		1:5

Nas formulações testadas verificou-se que praticamente todo o *template* ficou retido na matriz polimérica, com percentagens de impressão iguais ou superiores a 99%, indicando que as concentrações de monómero e *cross-linker* parecem não ter efeito na quantidade de *template* que é incorporado na matriz polimérica. Zhang e Hu (2012) apresentam um balanço mássico realizado ao *template* durante o processo de síntese de um MIP impresso com um composto estrogénico (17 β -Estradiol). Partindo do mesmo monómero funcional (MAA) e de uma razão de *template*:monómero igual a 1:4,8 é possível verificar que após reação, apenas 4% do *template* utilizado na formulação fica retido na matriz polimérica. A comparação destes resultados com aqueles que foram obtidos para as formulações em estudo, sugerem maior número de pontos de interação entre monómero e *template*, o que se poderá traduzir na formação de um maior número de cavidades específicas para receber o analito.

Após análise da morfologia dos polímeros foram encontradas pequenas diferenças nas formulações em estudo. Nos casos dos polímeros MIP1 a MIP6, foram obtidas partículas esféricas com diâmetros compreendidos entre 38 e 150 μm , após separação com peneiros. No entanto, para os polímeros MIP7 a MIP9 foi obtido um aglomerado compacto que implicou a aplicação de processos mecânicos para a obtenção de partículas dispersas. Por essa razão, as formulações MIP7 a MIP9, que envolvem a utilização de razões estequiométricas iguais a 1:8 entre *template* e monómero foram descartadas, visto que o objetivo passava por obter partículas dispersas, evitando por isso o recurso a processos de moagem que pudessem destruir e alterar a morfologia das cavidades produzidas.

3.2.2. Estudos preliminares de extração do *template* por Soxhlet

O processo de síntese de um polímero impresso molecularmente é finalizado com a remoção das moléculas de *template* que ficam retidas na matriz polimérica. A etapa de extração, é por isso, de elevada importância, na medida em que determina a qualidade das cavidades formadas no MIP, bem como a sua capacidade para captar o analito, permitindo um bom desempenho do material produzido. Pelas razões anteriormente apresentadas, uma remoção incompleta pode influenciar diretamente os limites de deteção e a precisão dos métodos analíticos que envolvam a aplicação de MIPs, conduzindo a resultados erróneos (Peng-Ju *et al.*, 2007).

Na literatura referente a MIPs é possível encontrar a descrição de diferentes técnicas para a remoção do *template* (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013), nomeadamente extração com solvente, extração fisicamente assistida ou por aplicação de solventes em condições sub ou

supercríticas (Figura 29). As considerações para a seleção da técnica assentam em aspetos como a simplicidade de implementação, tempo de operação, quantidade de solvente e custos.

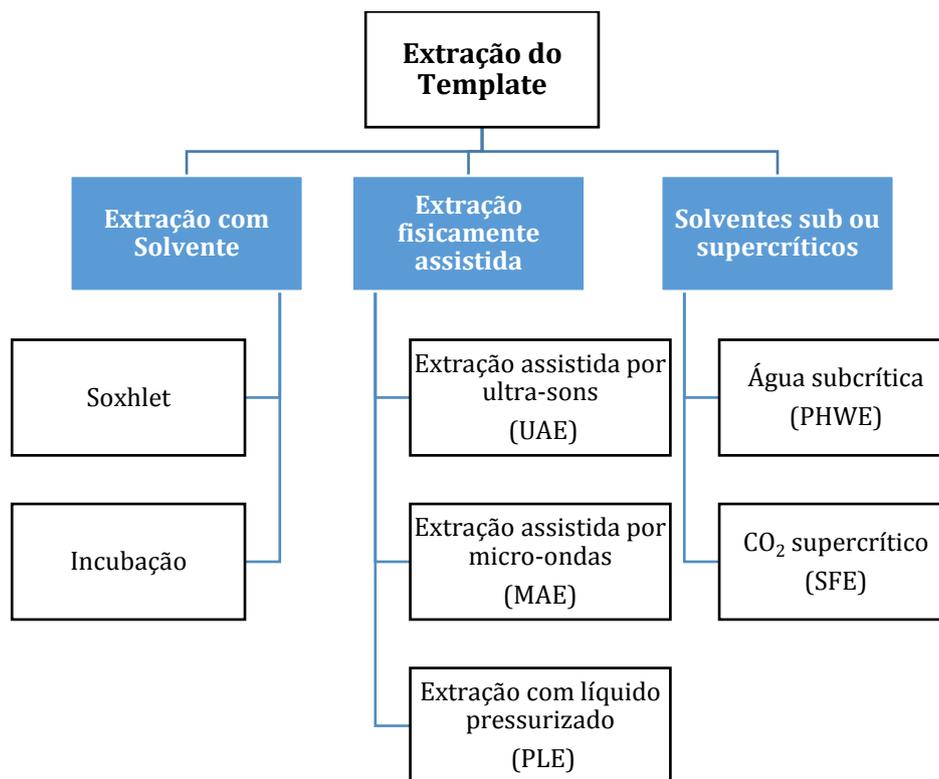


Figura 29. Métodos de extração do *template* em MIPs, adaptado de (Lorenzo *et al.*, 2011).

Pelo facto de se tratar de um processo de fácil aplicação, decidiu-se numa fase preliminar, aplicar o método de extração em Soxhlet para a remoção do *template*. Entre as vantagens deste método destacam-se o baixo custo, o aumento de solubilidade do *template* pelo uso de solvente aquecido e aplicabilidade a uma gama alargada de MIPs. De referir, contudo, algumas desvantagens associadas a este método, como por exemplo o consumo elevado de solvente e os tempos médios de extração que em muitos dos casos podem atingir 48 (Kueseng *et al.*, 2009) ou mais horas (Byun *et al.*, 2010).

O processo de extração requer a utilização de um solvente capaz de interagir com o polímero, provocando um aumento do volume da cadeia polimérica para a libertação das moléculas de *template*. Este fenómeno de aumento de volume por parte do MIP é chamado de *swelling*. O solvente a aplicar deverá também permitir a disrupção das interações entre o *template* e o polímero, processo que poderá ser melhorado com a adição de ácidos ou bases (Ellwanger *et al.*, 2001). Com base nestes pressupostos, para os ensaios preliminares de extração de *template*, foi utilizada uma solução de metanol:ácido acético (90:10, v/v), a qual representa uma das mais usais e eficientes neste tipo de processo (Lorenzo *et al.*, 2011).

Este ensaio preliminar tinha como propósito investigar a capacidade de extração do solvente selecionado e inferir sobre a relação entre o tipo de formulação e o número teórico de cavidades disponíveis para a captação de galaxolide. Assim, foi calculada a eficiência de extração em cada uma das formulações, recorrendo para isso à equação 4.

% Eficiência de extração

$$= \frac{m_{galaxolide_{extrato}}}{m_{galaxolide_{impressa}}} \times 100 \quad (4)$$

em que $m_{galaxolide_{extrato}}$ representa a massa de galaxolide (mg) presente no solvente de extração após a etapa de remoção de *template* e $m_{galaxolide_{impressa}}$ a massa de galaxolide (mg) retida no MIP após reação de polimerização.

O cálculo das eficiências de extração para as formulações em estudo permitiu elaborar o gráfico da Figura 30, no qual é possível verificar que a capacidade total de extração não ultrapassa os 23%.

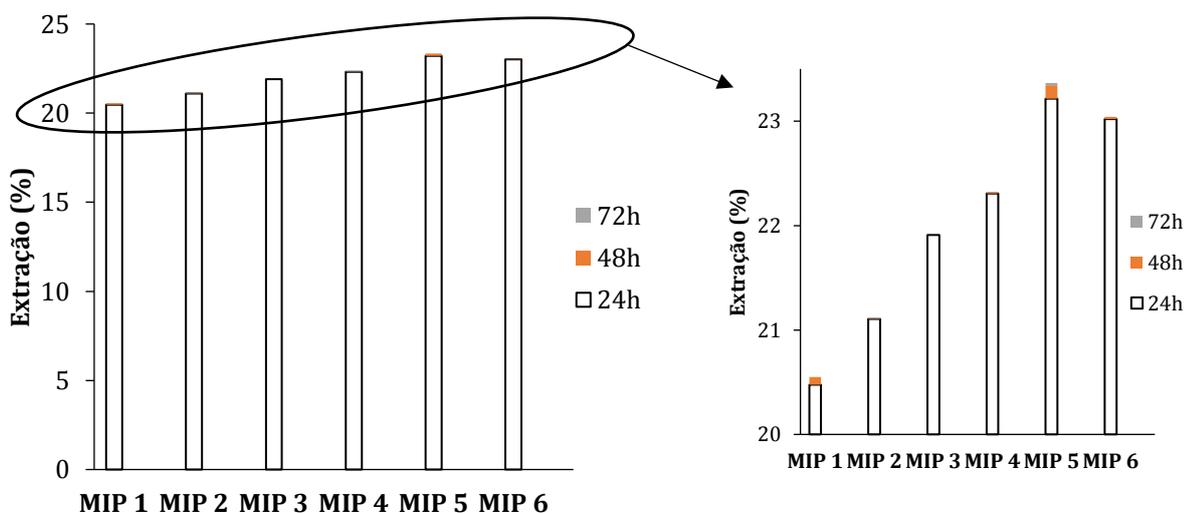


Figura 30. Eficiência do processo de extração em Soxhlet com metanol/ácido acético (90:10, v/v) em seis formulações de MIPs.

Verifica-se também que, apesar de se tratar de diferentes formulações, as percentagens de extração são bastante semelhantes entre si, o que parece indicar que a acessibilidade do solvente de extração às moléculas de *template* não é afetada pela concentração das principais espécies químicas envolvidas na síntese do polímero em estudo. Por outro lado, conclui-se que o método

de extração testado é mais eficiente nas primeiras 24 h sendo pouco significativa a contribuição dos ciclos subsequentes para a remoção do *template*.

3.2.3. Otimização do processo de extração do *template*

A baixa capacidade de extração obtida no ensaio preliminar conduziu à necessidade de melhorar o processo de extração. Para o efeito, procurou-se trabalhar apenas com uma formulação, sobre a qual iriam incidir os estudos de otimização do processo de extração do *template*. De acordo com as dezanove publicações analisadas no capítulo 3.2, sobre o desenvolvimento de MIPs para a análise de PCPs, verificou-se que a razão estequiométrica de 1:4:20 (T:M:CL) foi a mais aplicada, surgindo em oito dos dezanove estudos analisados. Relativamente às restantes publicações, foi possível constatar a aplicação da razão 1:6:30 em duas situações, sendo que para os outros estudos se verificou a utilização de razões estequiométricas distintas. Analisando os estudos que descrevem a aplicação da razão 1:4:20 para a formulação dos seus MIPs, foi possível verificar que todos eles se referem a *templates* inseridos na mesma classe de PCPs, os parabens, utilizando preferencialmente o MAA e o 4-VP como monómeros funcionais e o EGDMA e DVB como *cross-linkers*. Assim, parece existir uma relação entre o tipo de *template*, monómero e *cross-linker* utilizados e a composição ótima, para a formação do MIP. Ao nível das técnicas de polimerização foi possível constatar uma compatibilidade desta razão estequiométrica com diferentes metodologias, entre elas, precipitação, *bulk* e impressão à superfície.

No que diz respeito à impressão de galaxolide na matriz polimérica, os resultados demonstraram não existirem diferenças ao nível das formulações testadas. Tendo isso em conta e excluindo os MIPs 7 a 9, qualquer uma das anteriores formulações poderia ser selecionada como mais adequada. Nesse sentido, foi definido como critério para a escolha da formulação otimizada, a proximidade às razões estequiométricas mais usuais para a síntese de MIPs, descrito na literatura (Yan e Ramström, 2005). Com base neste critério selecionou-se o MIP3, com as razões estequiométricas de 1:4:20 relativos a *template*, monómero e *cross-linker*. Partindo desta formulação foram realizados ensaios de otimização ao nível da extração.

3.2.3.1. Comparação entre a extração por Soxhlet e por Ultra-sons

Para avaliar a influência da técnica de extração na remoção do galaxolide do MIP, foram testados dois métodos – Soxhlet e ultra-sons. Apesar da existência de um conjunto de outras técnicas, como por exemplo a extração com fluídos supercríticos e a extração assistida por micro-

ondas, estas apresentam como grandes desvantagens os elevados custos na aquisição dos equipamentos e alguns problemas de estabilidade. Nesse sentido, optou-se por testar estas duas técnicas mais convencionais (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). Para este estudo foi mantido o solvente de extração utilizado nos ensaios preliminares, ou seja, metanol:ácido acético (90:10, v/v). Foram utilizados dois MIPs, sintetizados nas mesmas condições, de acordo com a formulação MIP3, dos quais foram retiradas três amostras com cerca de 600 mg de polímero. Os tempos de extração e os volumes aplicados foram definidos com base no estudo de Zhu *et al.* (2011) que reportam a síntese de microesferas de MIP seletivas a *kaempferol*. Para síntese do polímero foram testados a acrilamida e a 2-vinilpiridina como monómeros e o dimetacrilato de etilenoglicol como *cross-linker*. O solvente porogénico consistiu numa mistura de metanol e acetonitrilo e como iniciador foi utilizado o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo. Neste estudo, os autores avaliaram a capacidade de eluição por ultra-sons e por Soxhlet, recorrendo a uma mistura de metanol:ácido acético (90:10, v/v). Assim, foram definidos um volume de 150 mL e um tempo de extração de 24 h para a técnica de Soxhlet e 40 mL durante 30 mins para a técnica de ultra-sons. Os ensaios foram realizados em triplicado. No final de cada extração foi determinada a quantidade de galaxolide presente em cada um dos extratos, após injeção em HPLC-FL da respetiva amostra, evaporada e retomada no solvente de análise (acetonitrilo:água, 85:15, v/v). A capacidade de eluição foi definida como a razão entre a massa de galaxolide extraída e a massa de MIP utilizada. Na Tabela 10 são apresentadas as condições de extração testadas, bem como a capacidade de eluição dos dois métodos em estudo.

Tabela 10. Condições e capacidade de eluição, com os respetivos valores de desvio-padrão (DP), das técnicas testadas para a extração de galaxolide do MIP.

Método de extração	V solvente (mL)	Tempo de eluição (h)	Capacidade de eluição ($\mu\text{g}_{\text{HHCB}} / \text{g}_{\text{MIP}} \pm \text{DP}$)
Soxhlet	150	24	66 \pm 6
Ultra-sons	40	0,5	254 \pm 2

Comparando as capacidades de eluição dos dois métodos, podemos verificar que a técnica de ultra-sons apresenta uma capacidade de eluição superior à obtida pela extração em Soxhlet. No estudo que serviu de base para esta análise, Zhu *et al.* (2011) observaram, igualmente, uma maior quantidade de *template* extraído após um ciclo de 30 min em ultra-sons (1008 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em comparação com a extração de 24 h em Soxhlet (902 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Como é facilmente perceptível estes valores são significativamente superiores aos apresentados na Tabela 10, o que poderá ser

justificado pelas diferenças ao nível do tipo de técnica, espécies químicas, nomeadamente o tipo de *template* e razões estequiométricas utilizadas nos dois MIPs em comparação. Como referido anteriormente a alteração destas variáveis pode resultar em estruturas poliméricas com cavidades de maior ou menor acessibilidade, o que influencia diretamente a extração do *template*.

Neste caso conclui-se que, pelo facto de permitir uma capacidade de eluição significativamente mais elevada, mas também pelo menor tempo de extração que envolve, a técnica de ultra-sons parece ser o método de extração do *template* mais adequado.

3.2.3.2. Otimização do solvente de extração

De seguida foi investigado o desempenho de diferentes tipos de solvente para o processo de extração das moléculas de *template*. Para o efeito foram comparadas as capacidades de eluição dos seguintes solventes: metanol:ácido acético (90:10, v/v), acetonitrilo, acetonitrilo:água (85:15, v/v) e n-hexano. Como referido anteriormente, a mistura de metanol:ácido acético tem sido amplamente descrita com o solvente ideal e mais eficiente na lavagem dos MIPs. Por outro lado, é também defendido que a proximidade entre o solvente porogénico e o solvente de lavagem poderá aumentar a eficiência da extração (Ellwanger *et al.*, 2001), pelo que se decidiu incluir o acetonitrilo e a mistura de acetonitrilo:água neste estudo. Adicionalmente, incluiu-se o n-hexano visto tratar-se de um solvente que, pela baixa polaridade que apresenta, tem vindo a ser frequentemente aplicado na extração de *musks* em diversas matrizes (Lee *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015).

Para este estudo foram utilizados quatro MIPs, sintetizados de acordo com a formulação ótima, ou seja, 1:4:20 (T:M:CL), dos quais foi retirada uma amostra de cerca de 600 mg. Cada uma destas amostras foi extraída em ultra-sons, com 40 mL de solvente, durante 30 min. Após extração, as amostras foram centrifugadas e o extrato injetado em HPLC-FL para determinação da quantidade de galaxolide extraído. No caso do n-hexano e da mistura metanol:ácido acético (90:10, v/v), os extratos foram levados à secura e retomados em acetonitrilo:água (85:15, v/v) antes da análise. Para os restantes solventes os extratos foram injetados diretamente no equipamento de cromatografia.

Na Tabela 11 é apresentada a capacidade de eluição de cada um dos solventes testados. Pela análise desta tabela pode verificar-se que a utilização de solventes, cuja composição é igual ou próxima à do solvente porogénico (acetonitrilo), conduz a uma menor quantidade de galaxolide extraído. Um aspeto importante para que a libertação das moléculas de *template* seja favorecida é o aumento de volume (*swelling*) da estrutura polimérica (Ellwanger *et al.*, 2001). Nesse sentido, é desejável uma forte interação do solvente com o polímero, de forma a aumentar o efeito de

swelling e assim permitir o acesso às zonas onde o *template* se encontra (Park *et al.*, 2005). Pode-se então concluir que quer o acetonitrilo, quer a água não são solventes adequados e que o seu uso resulta numa extração menos eficiente do *template*. Em comparação com estes dois solventes, a mistura de metanol e ácido acético promove um aumento significativo da capacidade de remoção do *template*. Para alguns autores a utilização do ácido acético é justificada pela possibilidade de disrupção das interações entre monómero e *template*, o que facilita a sua libertação (Omidi *et al.*, 2014). Não obstante, o solvente com melhor capacidade de extração é claramente o n-hexano ($316 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), sobrepondo-se aos restantes solventes em estudo.

Tabela 11. Capacidade de eluição dos solventes testados no processo de extração por ultra-sons e respetivos valores de desvio-padrão (DP).

Solvente de Extração	Capacidade de eluição ($\mu\text{g}_{\text{HHCB}} / \text{g}_{\text{MIP}} \pm \text{DP}$)
Metanol:Ácido acético (90:10, v/v)	254 ± 2
Acetonitrilo	15 ± 4
Acetonitrilo:Água (85:15, v/v)	14 ± 2
n-hexano	316 ± 25

Concluiu-se por isso que o n-hexano é o solvente que melhor interage com a cadeia polimérica, permitindo, nas condições estudadas, libertar uma maior quantidade de *template*. Com base nestes resultados, a escolha do solvente, para a extração de *template* em ultra-sons, recaiu sobre o n-hexano.

3.2.3.3. Otimização do tempo de extração

Após a escolha da técnica de ultra-sons e do n-hexano para a extração do *template* foi necessário determinar o número de ciclos para a obtenção de uma extração aceitável. Na grande maioria dos estudos sobre MIPs não é dado qualquer tipo de informação sobre o número de lavagens para a extração completa do *template*. Muitos autores relatam unicamente que os processos de extração decorrem até ao momento em que o método de análise não detete a presença de *template* no extrato (Gu *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013).

Com o objetivo de definir o tempo/número de lavagens ótimo para o MIP em estudo, foram realizadas extrações sucessivas de 30 min em ultra-sons, utilizando 40 mL de n-hexano, renovado a cada ciclo. No final de cada extração foi determinada a quantidade de galaxolide presente em cada um dos extratos, após injeção em HPLC-FL da respetiva amostra, evaporada e retomada no

solvente de análise (acetonitrilo:água, 85:15, v/v). Na Figura 31 encontra-se representada a evolução da concentração de *template* na solução ao longo de vários ciclos de extração.

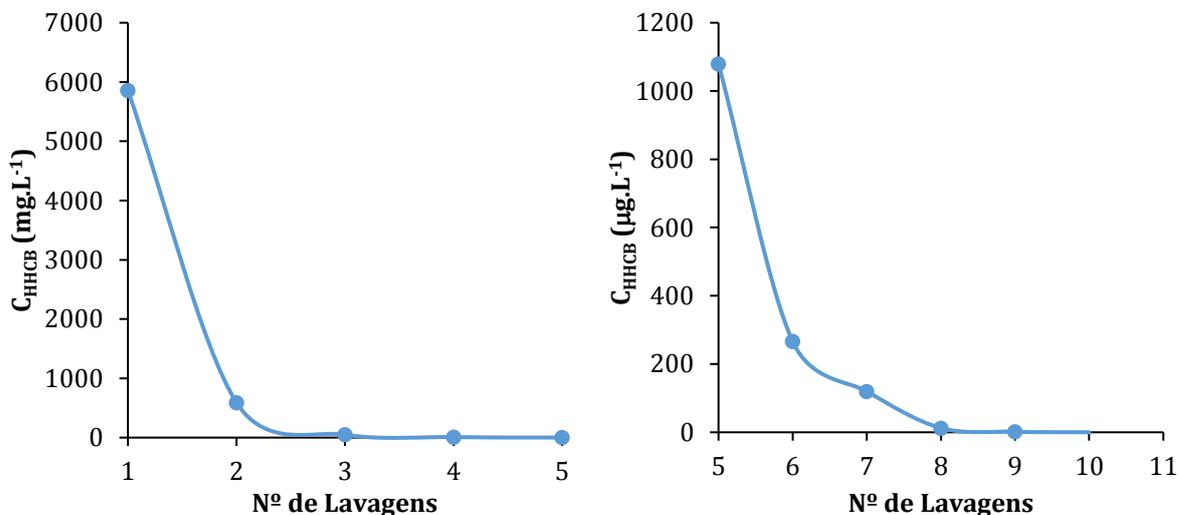


Figura 31. Concentração de *template* após sucessivas lavagens com recurso ao ultra-sons. Em ambos os gráficos, o zero representa o limite de deteção para o método de injeção direta em HPLC-FL, ou seja, 0,07 µg.L⁻¹.

Após análise destes resultados verifica-se uma remoção bastante significativa de galaxolide durante o primeiro ciclo, o qual corresponde a uma eficiência de extração de cerca de 87%. Nos ciclos subsequentes a quantidade de *template* que é removida do MIP, vai diminuindo consideravelmente, sendo que no quinto ciclo, a concentração de galaxolide no extrato atinge os µg.L⁻¹. Nesta fase, decidiu-se prolongar a extração até à décima lavagem, altura em que a concentração de *template* atingiu um valor inferior ao limite de deteção (0,07 µg.L⁻¹), determinando o final do processo de extração. Com base na quantidade total de galaxolide extraído após dez ciclos foi obtida uma eficiência de extração de 97%.

A extensão do processo de lavagem do MIP está dependente do nível de *bleeding* exibido pelo polímero e do tipo de aplicação a que este se destina. Isto é, se o objetivo do MIP for ser usado como sorbente específico para a pré-extração e análise de galaxolide em águas, deverá realizar-se uma lavagem extremamente eficiente, dado ser necessário atingir limites de deteção muito baixos. Contudo, se o objetivo do MIP for a utilização como sorbente para remoção de galaxolide em águas contaminadas, provavelmente o nível de *bleeding* não é a característica fulcral, mas sim a saturação do sorbente.

Sugere-se assim a realização de um conjunto de dez lavagens para a obtenção de uma extração eficiente do MIP em estudo. A extensão desta extração deverá, contudo, ser monitorizada, de forma a garantir uma boa *performance* do MIP.

3.2.4. Conclusão

O sucesso para a síntese de um MIP, bem como o seu desempenho final estão dependentes de um conjunto de variáveis, nomeadamente com a escolha dos principais reagentes, técnica de polimerização e eficiência da técnica de extração do *template*.

No que diz respeito às principais espécies químicas selecionou-se galaxolide, ácido metacrílico e dimetacrilato de etilenoglicol como *template*, monómero funcional e *cross-linker*, respetivamente, para a síntese de um MIP pela técnica de suspensão.

Após investigação de diferentes razões estequiométricas entre *template*, monómero e *cross-linker*, concluiu-se não existirem diferenças significativas na impressão de galaxolide na estrutura dos MIPs. De acordo com este resultado definiu-se uma formulação otimizada composta pela razão estequiométrica de 1:4:20 para *template*, monómero e *cross-linker*, respetivamente.

A otimização do processo de extração focou-se no estudo de três parâmetros: técnica, solvente e número de ciclos. Relativamente às técnicas, foram estudadas a extração em Soxhlet e em ultra-sons. Com base na maior capacidade de eluição exibida concluiu-se que a extração por ultra-sons era a técnica mais adequada para a remoção do galaxolide.

Após a investigação de quatro tipos de solvente, concluiu-se que o n-hexano apresentava maior capacidade de eluição do que a mistura de metanol:ácido acético, acetonitrilo e acetonitrilo:água, razão pela qual foi selecionado como solvente de extração.

Embora seja impossível atingir uma remoção completa do *template*, procurou-se estabelecer um compromisso entre a sustentabilidade do método (gastos de solvente e tempo de extração) e os níveis de galaxolide nos extratos. Para tal, concluiu-se serem necessários dez ciclos de lavagem, correspondendo a um tempo total de 300 min e um volume de solvente de 400 mL, para que os níveis de galaxolide no extrato fossem inferiores ao limite de deteção ($0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$) do método de análise, resultando numa eficiência de extração de 97%.

Constatou-se também ser difícil a comparação da eficiência de extração obtida neste trabalho com a de outros autores, dado não haver uma exploração deste parâmetro na grande maioria das publicações sobre MIPs.

A *performance* do MIP otimizado deve agora ser avaliada através de uma caracterização morfológica da sua estrutura, bem como da sua capacidade de sorção.

3.3. Caracterização morfológica do MIP e NIP

A caracterização de substâncias macromoleculares é usualmente mais complexa do que para moléculas de baixo peso molecular. Isto é essencialmente justificado pelo fato de os polímeros não poderem ser obtidos de modo uniforme do ponto de vista estrutural e molecular (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). Apesar de não ser possível realizar uma caracterização completa, existem hoje em dia técnicas que permitem atingir um grau de caracterização satisfatório para estes materiais. Como tal, a investigação dirigida à caracterização de MIPs assenta em três níveis: química, morfológica e das propriedades de reconhecimento molecular (Cormack e Elorza, 2004).

Neste capítulo são apresentados os principais resultados da caracterização morfológica do MIP otimizado e respetivo NIP com recurso à microscopia eletrónica de varrimento (SEM), sorção em atmosfera de azoto e análise por termogravimetria (TGA). De referir que o NIP foi produzido de modo semelhante ao MIP, ou seja, mesmo método de polimerização (suspensão) e com as mesmas espécies químicas à exceção do *template*. Após síntese, o NIP foi lavado com o mesmo solvente utilizado na extração do MIP, para remoção de espécies não reagidas e levado a secar numa estufa a 50 °C durante 24 h.

3.3.1. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica essencial para a caracterização de polímeros impressos molecularmente. Esta técnica requer que os polímeros sejam normalmente revestidos com uma camada fina de ouro, ouro/paládio ou carbono para suprimir as cargas à superfície e aumentar a emissão de eletrões (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013). A aplicação desta técnica aos polímeros MIP e NIP resultou nas imagens apresentadas na Figura 32. A análise destas imagens revela partículas poliméricas com superfície compacta e lisa. De acordo com as ampliações utilizadas não é possível encontrar diferenças na morfologia dos dois polímeros, indiciando tratar-se de superfícies pouco porosas e com baixa área superficial. De referir que nas condições de análise não foi possível obter imagens com maiores ampliações, que poderiam evidenciar a presença de sítios ativos, devido à destruição das amostras provocada por um maior fluxo de emissão de eletrões.

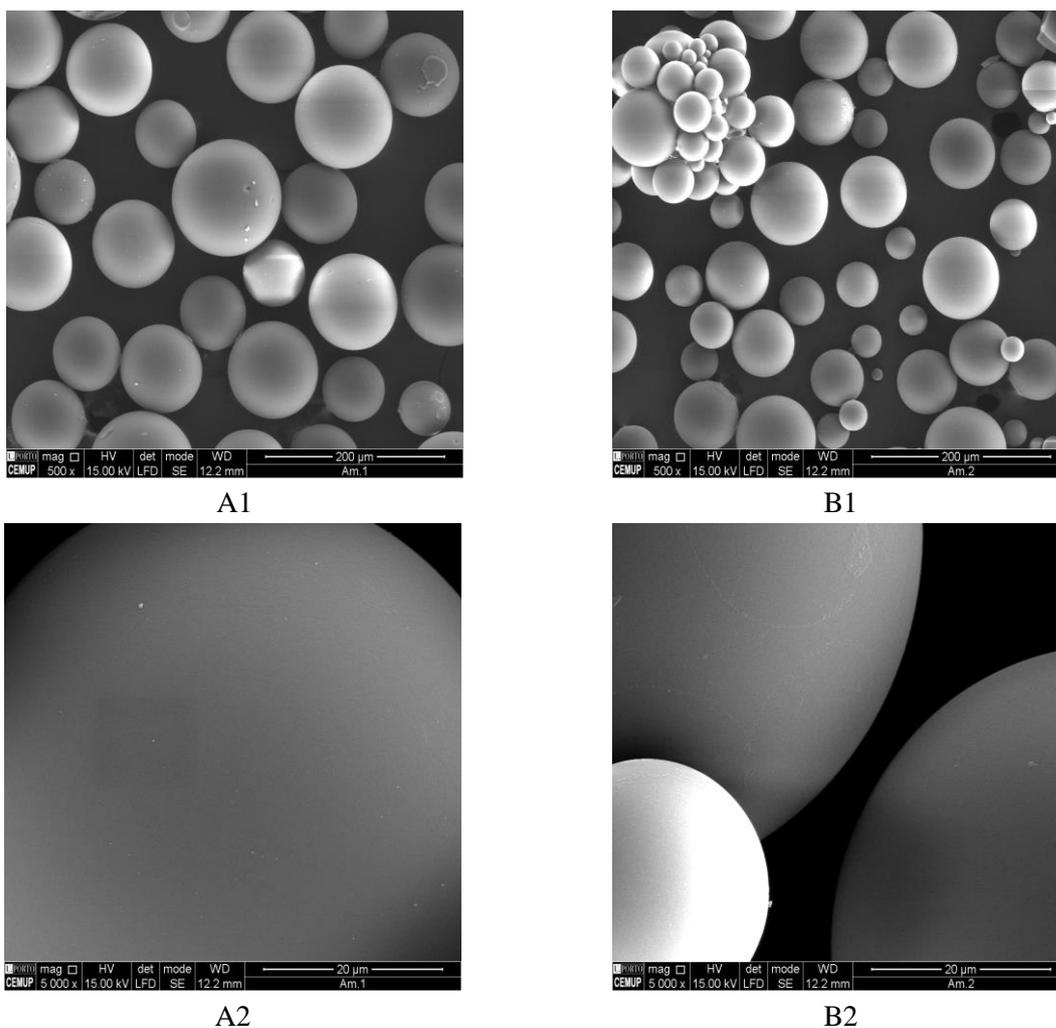


Figura 32. Imagens de microscopia eletrônica de varrimento do MIP (A1 – 500x e A2 – 5000x) e do NIP (B1 – 500x e B2 – 5000x).

3.3.2. Estimativa da área superficial através da isotérmica B.E.T

A caracterização de sólidos porosos com vista à determinação da sua porosidade e área superficial pode ser realizada com base em métodos como a porosimetria de mercúrio, adsorção em fase gasosa e cromatografia inversa por exclusão de tamanho. Entre elas, a adsorção em fase gasosa é uma técnica essencial na caracterização de polímeros impressos molecularmente, permitindo uma compreensão mais detalhada dos fatores físicos com impacto no reconhecimento molecular (Spivak, 2005). Do ponto de vista experimental é utilizada uma quantidade fixa de polímero que é normalmente arrefecida sob vácuo a temperaturas criogénicas. Em seguida, um gás, tipicamente azoto, é aplicado e difundido para o interior do polímero à medida que se vai avaliando a quantidade adsorvida. A isotérmica é obtida pela representação gráfica da quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa (P/P_0), na qual P_0 representa a pressão de saturação do vapor e P a pressão no equilíbrio.

No que diz respeito a materiais porosos, a IUPAC prevê a seguinte classificação relativamente ao tamanho de poros:

- Microporos – poros com diâmetros menores a 2 nm
- Mesoporos – poros com diâmetros compreendidos entre os 2 e os 50 nm
- Macroporos – poros com diâmetros superiores a 50 nm

As isotérmicas obtidas nos estudos de sorção de gases seguem seis tipos base, conforme pode ser visto na Figura 33.

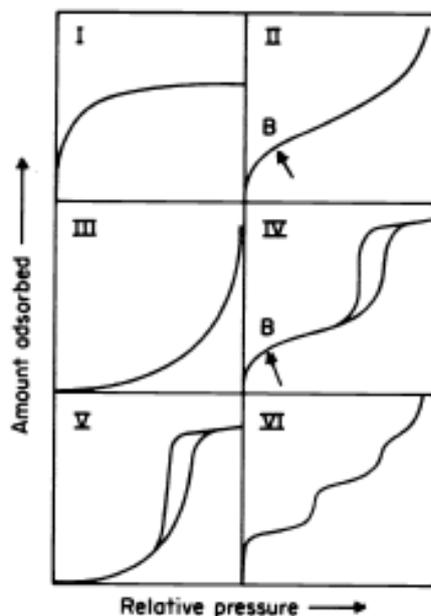


Figura 33. Tipos de isotérmicas de equilíbrio de adsorção (Sing, 1985).

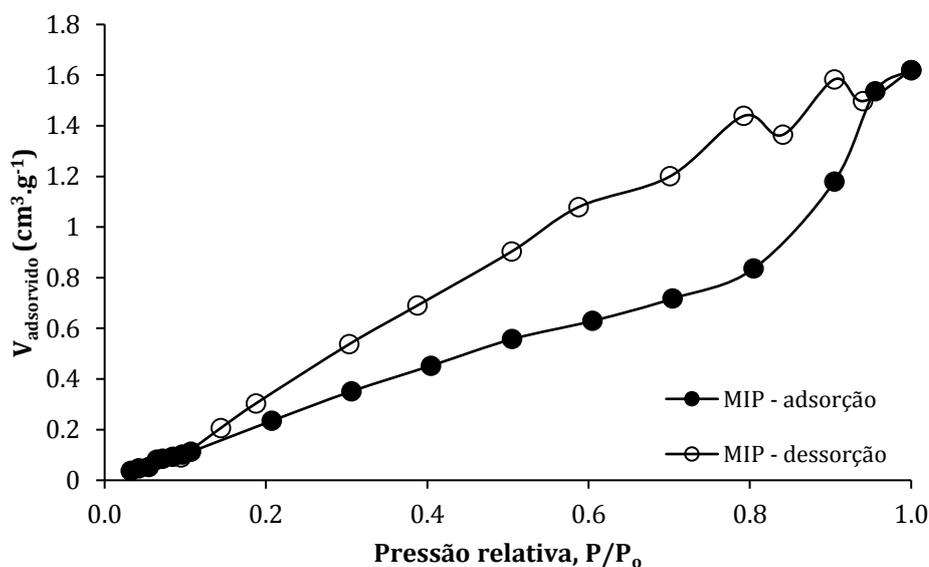
De acordo com a IUPAC as isotérmicas reversíveis podem ser definidas por:

- Tipo I – isotérmicas observadas para sólidos essencialmente microporosos e de baixa área superficial externa;
- Tipo II – isotérmicas características de sistemas não porosos ou macroporosos. O primeiro segmento representa a formação de uma monocamada à superfície, enquanto o segundo segmento representa a adsorção em multicamadas;
- Tipo III – isotérmica pouco comum que representa materiais onde as interações adsorbato-adsorbato são mais intensas do que as interações adsorbente-adsorbato;
- Tipo IV – isotérmicas caracterizadas por fenómenos de histerese devido à ocorrência de condensação capilar ao nível dos mesoporos;
- Tipo V – isotérmica pouco comum que se relaciona com a de tipo III, na qual a interação adsorbente – adsorbato é fraca;
- Tipo VI – isotérmicas representativas de adsorção multicamada passo a passo em superfícies não porosas.

Na Figura 34 é apresentado o perfil das isotérmicas de adsorção e dessorção em azoto para o MIP e para o NIP. Como se pode verificar, em ambos os polímeros, a curva de adsorção não coincide com a curva de dessorção, devido à formação de um ciclo de histerese. Este fenómeno deve-se ao facto de, no interior dos poros, a condensação e evaporação do adsorbato ocorrerem a valores de pressão diferentes (Asman *et al.*, 2015).

O perfil das isotérmicas do MIP e NIP é de difícil interpretação, contudo parecem aproximar-se das isotérmicas de tipo IV, sugerindo que estes dois polímeros possuem uma estrutura constituída por mesoporos.

a)



b)

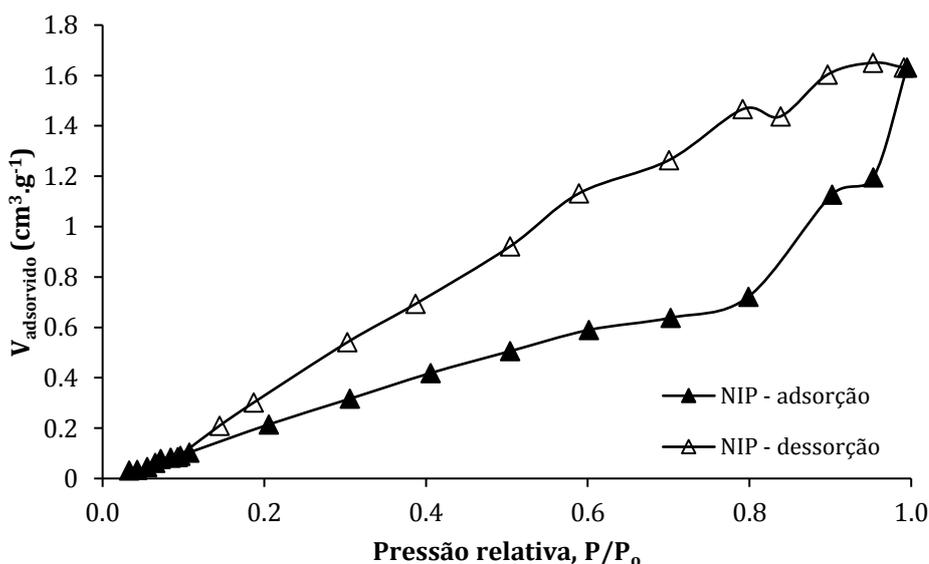


Figura 34. Perfis de adsorção/dessorção de azoto a 77 K para a) MIP e b) NIP. Nos quais os marcadores preenchidos representam o processo de adsorção e os marcadores sem preenchimento representam o processo de dessorção.

Para a determinação da área superficial dos materiais foi aplicado o modelo B.E.T, que é descrito pela seguinte equação:

$$\frac{1}{W\left(\frac{P_0}{P}-1\right)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{C W_m} \times \frac{P}{P_0} \quad (5)$$

em que W é a quantidade total de azoto adsorvida, W_m é a capacidade de adsorção da monocamada e C é uma constante do sistema (depende do sistema gás-sólido).

Esta equação foi aplicada aos dados experimentais obtidos através dos ensaios de adsorção de azoto. Assim, representando $\frac{1}{W\left(\frac{P_0}{P}-1\right)}$ em função de $\frac{P}{P_0}$ na gama $0,05 < P/P_0 < 0,30$ obtém-se

uma relação linear. O modelo é apenas válido nesta gama, uma vez que para pressões relativas inferiores a 0,05 as heterogeneidades são muito evidentes e acima de 0,30 pode ocorrer condensação capilar (fenómeno não considerado pelo modelo). Com os valores de ordenada na origem e declive torna-se possível determinar a capacidade de adsorção da monocamada. Sabendo este valor é então possível calcular a área específica total do sólido através da seguinte equação:

$$A_{BET} = \frac{N_A \times W_m \times a_m}{M_{N_2}} \quad (6)$$

em que N_A representa o número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), a_m a área ocupada por cada molécula de adsorbato, neste caso azoto ($0,162 \text{ nm}^2$) e M_{N_2} é a massa molar do azoto ($28,01 \text{ g.mol}^{-1}$) (Greeg e Sing, 1982).

A aplicação do modelo de B.E.T aos dados experimentais para os dois polímeros permitiu obter o gráfico da Figura 35.

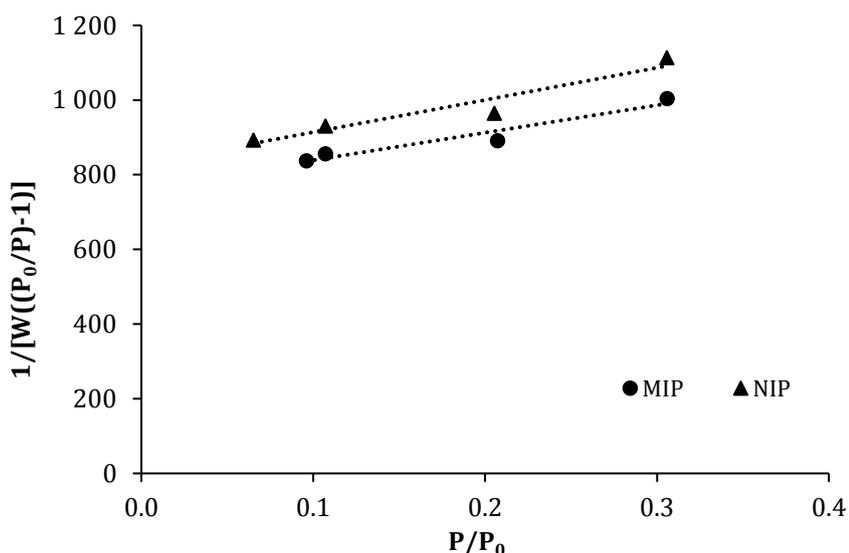


Figura 35. Representação gráfica da aplicação da equação de B.E.T para o MIP e NIP.

Na Tabela 12 são apresentados os valores das áreas específicas, diâmetro de poro e volume total de poros para os polímeros em análise.

Tabela 12. Valores de área superficial ($S_{B.E.T}$), volume de poros (V_p) e diâmetro médio de poros (d_p) do MIP e NIP.

Amostra	$S_{B.E.T}$ ($m^2.g^{-1}$)	V_p ($cm^3.g^{-1}$)	d_p (nm)
NIP	$2,1 \pm 0,4$	$(1,9 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$3,2 \pm 0,2$
MIP	$2,3 \pm 0,4$	$(2,4 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$4,7 \pm 0,3$

Numa primeira análise pode-se dizer que as áreas superficiais obtidas para o MIP e NIP estão abaixo dos valores reportados na literatura para estes materiais, os quais, segundo Spivak (2005), apresentam valores típicos entre os 100 e os 400 $m^2.g^{-1}$. Analisando o caso particular de MIPs sintetizados de acordo com a polimerização em suspensão foi possível verificar uma área superficial de 82,3 $m^2.g^{-1}$ para um MIP sintetizado com trimetoprima, MAA e EGDMA (T/M/CL) utilizando uma razão estequiométrica de 1/5/20, para as respectivas espécies químicas (Hu *et al.*, 2005). Importa mencionar que neste estudo não é feita referência à área superficial do NIP. Partindo igualmente do método em suspensão, Osmani *et al.* (2012) reportam uma área superficial de 201,4 $m^2.g^{-1}$ para um MIP baseado em ibuprofeno/4-VP/EGDMA (T/M/CL) para uma razão estequiométrica de 1/4/20. Para além disso, os autores concluíram não existirem diferenças apreciáveis entre as áreas superficiais do MIP e NIP, sendo que para este último foi registado um valor de área de 199,4 $m^2.g^{-1}$.

Relativamente ao diâmetro de poros, os resultados da Tabela 12 demonstram estruturas maioritariamente constituídas por mesoporos, visto que o diâmetro médio de poros se situa acima dos 2 nm. Por outro lado, a semelhança entre o diâmetro de poros exibido pelos polímeros impresso e de referência sugerem que o *template* não afeta de modo significativo a formação de poros no MIP. Estes resultados parecem estar acordo com os estudos realizados por Osmani *et al.* (2012) e Hu *et al.* (2005), nos quais foi confirmada a existência de mesoporos nos polímeros sintetizados de acordo com o método por suspensão.

De acordo com a literatura analisada, os baixos valores de área superficial obtidos para os polímeros em estudo podem estar relacionados com as razões estequiométricas aplicadas na formulação. A título de exemplo, Rosengren *et al.* (2013) prepararam e analisaram um conjunto de cinco formulações de MIPs e os seus correspondentes NIPs, preparados de acordo com o método *bulk*. Neste estudo, os autores fizeram variar a concentração de monómero (MAA), mantendo constantes as concentrações de *template* (varfarina) e *cross-linker* (EGDMA). Após a realização de ensaios de adsorção em azoto e determinação das respetivas áreas superficiais, os autores concluíram que as formulações com concentrações mais baixas de monómero, ou seja, com maior grau de ligações cruzadas, resultavam na formação de polímeros menos porosos e com áreas superficiais mais baixas (3,6-35,4 m².g⁻¹). Sasaki *et al.* (2010) obtiveram uma conclusão semelhante após a preparação de MIPs covalentes para a análise de bisfenol-A. Nesse estudo, os autores investigaram três razões estequiométricas entre o estireno (monómero) e o divinilbenzeno (*cross-linker*) para a preparação do MIP. Assim, a alteração da razão molar entre monómero e *cross-linker* de 1:1 para 0:3 traduziu-se na diminuição da área dos 2,0 para os 0,5 m².g⁻¹.

No sentido de confirmar o efeito da concentração de *cross-linker* na área superficial e porosidade do MIP e NIP, deveriam ter sido analisadas diferentes formulações. Contudo, decidiu-se avançar com o polímero otimizado nas condições descritas, procurando avaliar a sua eficiência na utilização para os fins previstos.

3.3.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica é uma técnica que determina a perda de massa em função da temperatura, ou seja, permite avaliar o perfil de degradação de um determinado material. Com uma gama de aplicabilidade alargada, esta técnica tem vindo a ser utilizada na investigação das propriedades dos MIPs (Abu-Surrah e Al-Degs, 2010; Cela-Pérez *et al.*, 2013; Sulitzky *et al.*, 2002). Muitos autores utilizam a TGA para estudar o comportamento térmico dos MIPs e, por comparação com o polímero de referência (NIP) inferir a presença da molécula de *template* na

estrutura polimérica e a consequente formação de cavidades (Azodi-Deilami *et al.*, 2010; Dima *et al.*, 2014; Syu *et al.*, 2006).

Na Figura 36 apresenta-se a análise TGA realizada ao MIP, após o processo de extração do *template* e ao respetivo NIP.

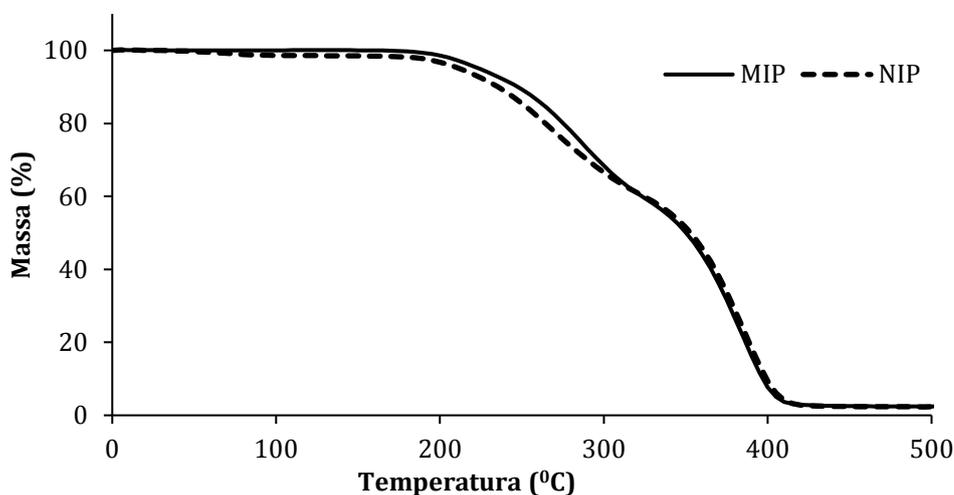


Figura 36. Análise termogravimétrica do polímero impresso molecularmente (MIP) e do polímero de referência (NIP).

Os resultados obtidos demonstram perfis de degradação semelhantes para os dois tipos de polímero, com a decomposição a ocorrer entre os 200 °C e os 400 °C. A semelhança de perfis nos dois polímeros comprova a eficiência do processo de extração do *template* e indicia que a existência de cavidades específicas não influenciam a estabilidade térmica do MIP (Li *et al.*, 2014). Em geral, pode ser afirmado que MIP e NIP devem apresentar perfis semelhantes (Cela-Pérez *et al.*, 2013; Dima *et al.*, 2014). Num estudo direcionado para a análise de bilirrubina na bilis, Syu *et al.* (2006) descrevem a síntese de um MIP com MAA e EGDMA, como monómero e *cross-linker*, respetivamente. Na análise termogravimétrica realizada ao MIP e respetivo NIP, os autores reportam curvas de degradação semelhantes para os dois polímeros, resultado que foi de encontro à expectativa dos mesmos.

3.3.4. Conclusão

Neste capítulo foi realizada uma análise à estrutura do MIP sintetizado nas condições otimizadas, com razão estequiométrica de 1:4:20 para T:M:CL e após extração com n-hexano em ultra-sons. Estes ensaios foram realizados em paralelo para o NIP, produzido nas mesmas condições, sem adição da molécula de *template* (galaxolide).

Da observação por microscopia eletrônica não foram encontradas diferenças a nível da superfície exibida pelo MIP e NIP, as quais se revelaram bastante homogêneas e compactas. Após a avaliação dos parâmetros da isotérmica de adsorção de azoto, verificou-se uma área superficial de $2,1 \pm 0,4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para o NIP e $2,3 \pm 0,4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para o MIP, as quais se encontram abaixo dos valores típicos reportados na literatura para polímeros produzidos de acordo com a abordagem não-covalente (100 a $400 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Esta diferença poderá ser justificada pela elevada concentração de *cross-linker* utilizada na formulação, o que conduziu a um material mais compacto e com menor porosidade. Apesar disso, as diferenças encontradas ao nível da área superficial entre MIP e NIP, parecem indicar a existência de um efeito de impressão no MIP, o que pode ser considerado promissor para a captação de galaxolide.

Por fim, a análise termogravimétrica destes dois polímeros permitiu confirmar a eficiência do processo de extração do *template*, comprovada pela semelhança entre os perfis de degradação do MIP e NIP.

3.4. Adsorção do galaxolide ao MIP e NIP

A capacidade de reconhecimento molecular do MIP é claramente a propriedade mais importante deste material. Nesse sentido, é expectável que os MIPs sejam capazes de reter o analito, com uma elevada seletividade e especificidade, nas cavidades específicas previamente formadas. Com o objetivo de avaliar a capacidade de reconhecimento molecular, estes materiais são submetidos a ensaios típicos de adsorção em solução e a estudos após aplicação como fase estacionária em colunas cromatográficas (Legido-Quigley *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2007; Michailof *et al.*, 2008). Os ensaios de adsorção em solução representam o método mais usual para a caracterização das propriedades de reconhecimento molecular dos MIPs. Nestes ensaios, uma determinada quantidade de analito é colocada em contacto com o MIP. Assim que o sistema atinge o equilíbrio é feita a medição da quantidade de analito livre, o que permite o cálculo da fração de analito que fica adsorvida no polímero. Este procedimento é aplicado em paralelo no NIP para comparação da capacidade de adsorção nos dois polímeros.

3.4.1. Ensaios preliminares de adsorção

Os ensaios preliminares de adsorção de galaxolide foram realizados com o MIP na presença de três solventes: água, acetonitrilo e uma mistura de acetonitrilo:água (85:15, v/v). Apesar do objetivo principal do trabalho passar pelo estudo do comportamento do MIP em água, decidiu-se avaliar o efeito de memória do polímero, normalmente expresso através de uma melhoria da capacidade em reconhecer o analito para a adsorção na presença do solvente porogénico, neste caso o acetonitrilo. Assim, nestes ensaios preliminares decidiu-se utilizar o solvente porogénico de modo isolado e em combinação com a água. Para o efeito utilizaram-se 10 mg de polímero e 5 mL de solução padrão de galaxolide com concentração $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ preparada em cada um dos solventes em análise, correspondendo a uma massa inicial de analito por massa de polímero de $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. A solução e o polímero permaneceram em contacto durante um período de 24 h, com agitação de 500 rpm, a uma temperatura de 25 °C.

Como evidenciado na Figura 37, a adsorção do galaxolide no MIP é mais significativa para o caso da água do que para os restantes solventes testados. Para a concentração de galaxolide estudada, verificou-se uma sorção de 5% para a mistura de acetonitrilo:água, ao passo que para a solução em acetonitrilo, apenas 2,5% de galaxolide foi adsorvido pelo MIP, ao fim de 24 h.

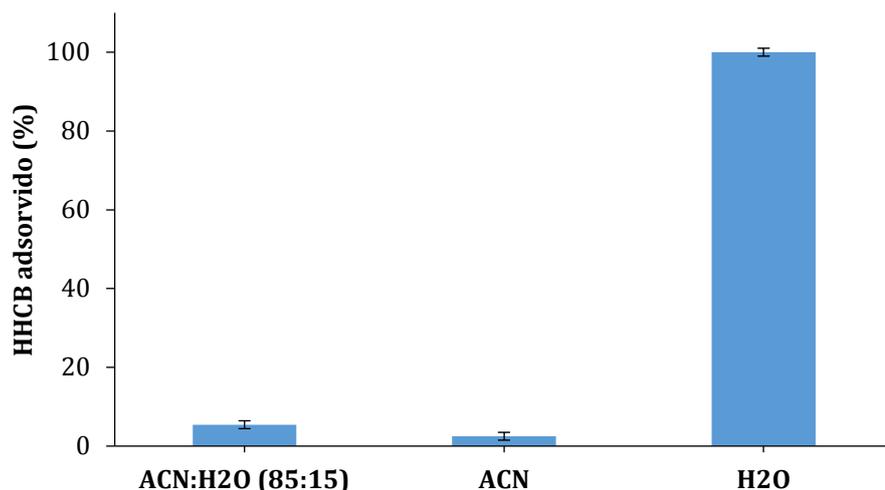


Figura 37. Capacidade de adsorção do MIP para soluções de galaxolide preparadas em diferentes solventes ($t_{\text{contacto}} = 24$ h, concentração de galaxolide = $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, $T = 25^\circ\text{C}$ e agitação de 500 rpm). As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

Como referido no capítulo de introdução, as ligações de hidrogénio são as interações mais exploradas para a formação de MIPs não-covalentes. Contudo, a síntese de MIPs em meio aquoso poderá afetar a qualidade das cavidades específicas, em resultado de uma competição das moléculas de água com as de *template* pela formação de ligações de hidrogénio com o monómero funcional. Como tal, é expectável que os MIPs produzidos nestas condições possam ver reduzida a sua capacidade de reconhecimento molecular em meios aquosos (Alvarez-Lorenzo e Concheiro, 2013; Xu *et al.*, 2007). Nesse sentido seria expectável que o reconhecimento de galaxolide em água fosse inferior ao observado para a aplicação de solventes com constante dielétrica mais baixa, como é o caso do acetonitrilo. No entanto, nas condições estudadas, tal não se verifica, o que poderá indiciar um efeito hidrofóbico, que leva a que as moléculas de galaxolide possam ficar adsorvidas ao polímero.

Por seu lado, a diminuição da polaridade do solvente que advém dos ensaios com o acetonitrilo, mostra uma redução substancial na capacidade do MIP em adsorver o galaxolide. Este resultado poderá ser justificado por uma diminuição do efeito hidrofóbico, o que implicará a passagem de um menor número de moléculas para as cavidades do MIP. Em contraste, a adição de água ao acetonitrilo parece favorecer a adsorção do analito em consequência de um aumento da polaridade do meio.

O efeito hidrofóbico havia já sido considerado no estudo realizado por Xu *et al.* (2007), aquando da síntese de um MIP seletivo à norfloxacin, obtido através da polimerização em *bulk*. Baseado na utilização de dois monómeros funcionais, um deles ciclodextrina, os autores descrevem a influência do efeito hidrofóbico para o aumento da seletividade do polímero impresso

molecularmente. Assim, para uma mistura de água:metanol, os autores verificaram que a quantidade de analito ligado ao polímero aumentava com o aumento da percentagem de água presente no solvente de adsorção, comprovando a compatibilidade do MIP com o meio aquoso.

Outra das conclusões que resulta da realização destes ensaios preliminares é o facto de não se ter confirmado o efeito de memória no MIP, suportado por uma menor percentagem de galaxolide adsorvido, para os ensaios com acetonitrilo. Contudo, este efeito de memória poderá vir a ser confirmado, no futuro, para ensaios de adsorção realizados na presença de interferentes, resultando numa maior afinidade do MIP para o analito em solução de acetonitrilo.

Nos ensaios posteriores de reconhecimento molecular, decidiu-se utilizar como solventes de estudo a água e o acetonitrilo, justificado pelo objetivo de analisar galaxolide em água e pelo comportamento extremo de adsorção observado para o acetonitrilo.

3.4.2. Estudo da cinética de adsorção

A cinética de adsorção na interface sólido/líquido é uma ferramenta que permite relacionar a capacidade de adsorção com o tempo de contacto entre o líquido e o sólido.

No sentido de investigar a cinética e o mecanismo de adsorção, foram realizados ensaios com o MIP e o respetivo NIP, para soluções de galaxolide em água e em acetonitrilo. Nestes ensaios utilizou-se uma concentração inicial de galaxolide de 10 mg.L^{-1} e 20 mg de polímero, tendo como objetivo reduzir a incerteza associada às baixas concentrações e pesagens. Como se pode verificar na Figura 38, o processo de adsorção de galaxolide em água é inicialmente bastante rápido, sendo que o equilíbrio entre as duas fases é atingido após 10 min de contacto. Por outro lado, verifica-se que a quantidade de galaxolide adsorvido é bastante semelhante para os dois polímeros. Embora o procedimento de síntese seja praticamente idêntico para os dois tipos de polímero, o NIP é caracterizado pela ausência de cavidades específicas, facto que advém da não inclusão de um *template* no processo de síntese. Como tal, o processo de adsorção no NIP não poderá ocorrer em cavidades, sendo por isso designado de adsorção não específica. O facto de não terem sido encontradas diferenças entre MIP e NIP, no que se refere à cinética de adsorção de galaxolide em água, pode indiciar que a retenção do analito se deve essencialmente ao estabelecimento de interações hidrofóbicas com os polímeros em estudo.

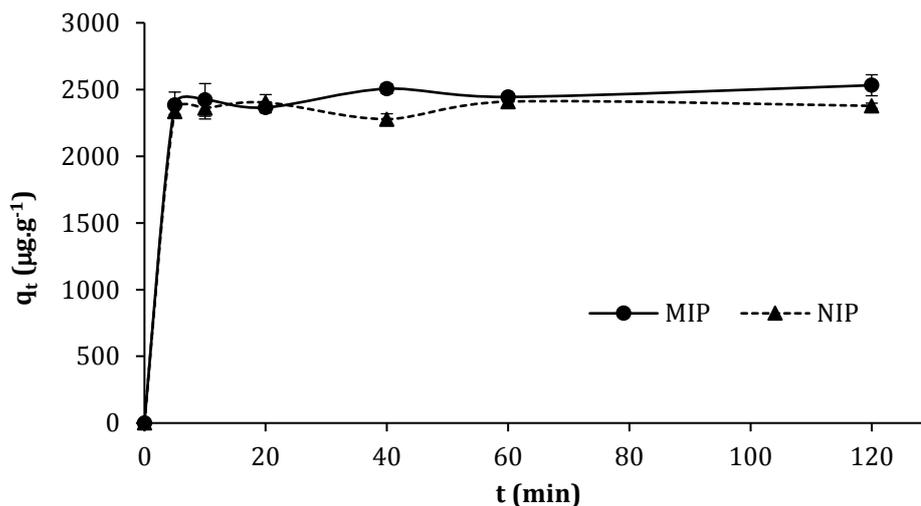


Figura 38. Curva cinética de adsorção do galaxolide no MIP e NIP para uma concentração inicial de galaxolide de 10 mg.L^{-1} em água, correspondendo a uma razão mássica galaxolide/polímero igual a $2,5 \text{ mg.g}^{-1}$. Massa de adsorvente = 20 mg , $65 < d_p < 150 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm . As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

Quando se altera o solvente, passando de água para acetonitrilo (Figura 39), verifica-se uma maior resistência à transferência de massa e uma alteração da interação entre o líquido e as partículas de MIP ou NIP, o que resulta num tempo de equilíbrio mais elevado (60 min). Por comparação direta com o ensaio cinético em água, foi observada uma diminuição da quantidade de galaxolide adsorvido nos dois polímeros. Foi ainda possível constatar uma maior afinidade entre o analito e o MIP, o que sugere que a utilização de acetonitrilo como solvente favorece a adsorção específica, que caracteriza o MIP.

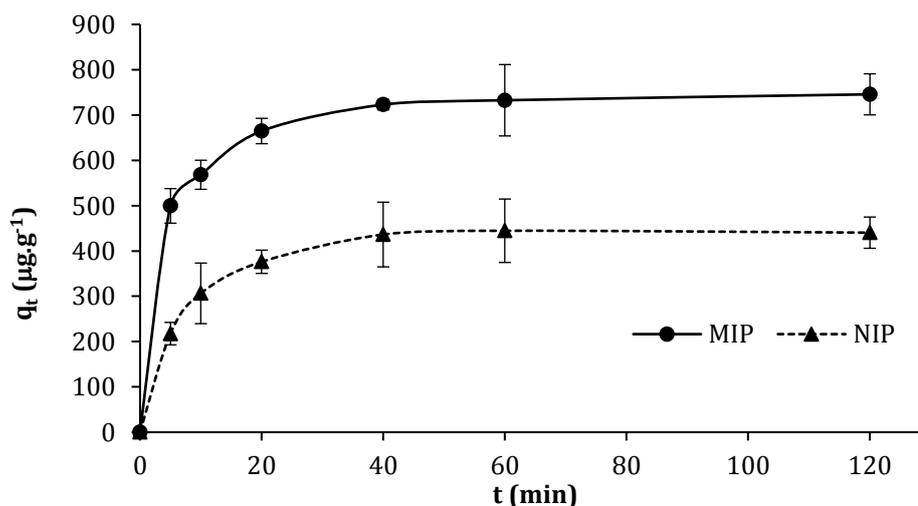


Figura 39. Curva cinética de adsorção do galaxolide ao MIP e NIP para uma concentração inicial de galaxolide de 10 mg.L^{-1} em acetonitrilo, correspondendo a uma razão mássica galaxolide/polímero igual a $2,5 \text{ mg.g}^{-1}$. Massa de adsorvente = 20 mg , $65 < d_p < 150 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm . As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

3.4.2.1. Efeito da concentração inicial de analito

Neste estudo foi avaliado o efeito da concentração inicial de analito para a adsorção de galaxolide em água. Estes ensaios foram apenas realizados para o NIP dada a semelhança do perfil cinético com o MIP para a adsorção de galaxolide em água. Assim, a quantidade adsorvida foi determinada em função do tempo de contacto para 3 concentrações iniciais de galaxolide em água (0,10; 1,00 e 1,75 mg.L⁻¹). Os resultados são apresentados na Figura 40.

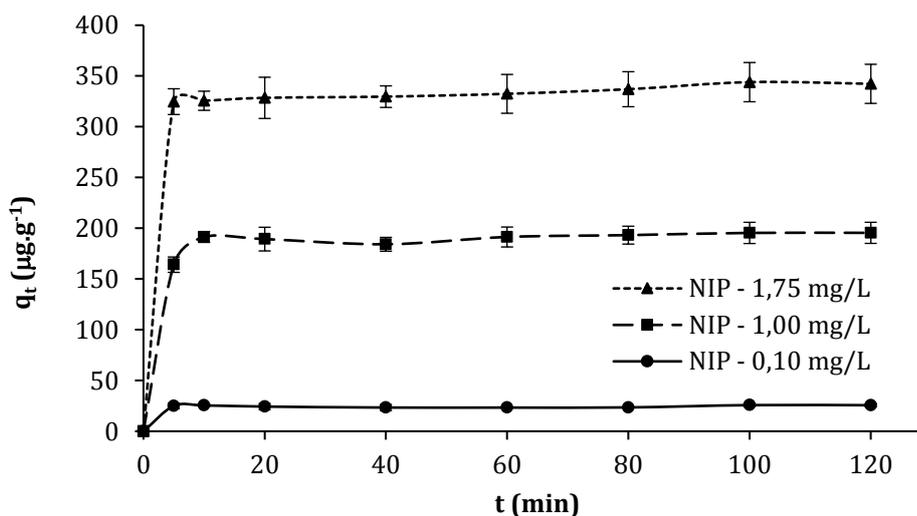


Figura 40. Curva cinética de adsorção do galaxolide ao NIP para concentrações iniciais de galaxolide de 0,10; 1,00 e 1,75 mg.L⁻¹ em água, correspondendo a razões mássicas galaxolide/polímero iguais a 0,03; 0,25 e 0,44 mg.g⁻¹, respetivamente. Massa de adsorvente = 20 mg, 65 d_p <math>< 150\ \mu\text{m}</math>, T = 25 °C, 500 rpm. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

Como se pode verificar pela análise da Figura 40, a capacidade de adsorção do NIP aumenta com a concentração inicial de galaxolide. Como consequência deste aumento pode-se afirmar que a gama testada não é suficiente para uma ocupação total dos sítios ativos existentes no NIP. Verifica-se também que, para as razões mássicas testadas, o processo de adsorção é bastante rápido e que o tempo necessário para atingir o equilíbrio não varia significativamente, sendo de apenas 10 min, o que está de acordo com os resultados obtidos para o ensaio de adsorção do NIP com 10 mg.L⁻¹ de galaxolide em água. Contudo, para assegurar o equilíbrio entre as duas fases, foi estabelecido um tempo de contacto de 120 min, o qual foi aplicado nos ensaios de equilíbrio da seção 3.4.3.

3.4.2.2. Estudo da cinética de adsorção

Para investigar a cinética de adsorção do galaxolide no MIP e no NIP foram utilizados dois modelos de ajuste dos valores experimentais: modelo de pseudo-primeira ordem e modelo de pseudo-segunda ordem.

O modelo de pseudo-primeira ordem (S. e B.K., 1898) assume que a velocidade de adsorção é controlada pela transição das moléculas de soluto do estado livre para o estado adsorvido. Este modelo é expresso através da seguinte equação:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1 (q_e - q_t) \quad (7)$$

em que q_t e q_e ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) representam as capacidades de adsorção no tempo t e no equilíbrio, respetivamente. Por sua vez k_1 (min^{-1}) representa a constante cinética para a adsorção de pseudo-primeira ordem.

Após integração e aplicação das condições, $q_t = 0$ a $t = 0$ e $q_t = q_t$ a $t = t$ à equação (7) transforma-se em:

$$q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad (8)$$

O modelo de pseudo-segunda ordem é, por sua vez, baseado na suposição de que a etapa controlante no processo de adsorção pode ser sorção química envolvendo forças de valência através da partilha ou troca de eletrões entre o adsorvente e o adsorbato (Ho e McKay, 1999). O modelo de pseudo-segunda ordem pode ser definido através da seguinte equação:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (9)$$

em que k_2 ($\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) representa a constante cinética para o modelo de pseudo-segunda ordem.

Após integração e aplicação das condições, $q_t = 0$ a $t = 0$ e $q_t = q_t$ a $t = t$ à equação (9) é transformada em:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (10)$$

Estes dois modelos foram ajustados aos dados experimentais, através de uma análise não linear (minimização dos quadrados dos resíduos utilizando a ferramenta *Solver* do *Microsoft Excel*®). Como critérios para a avaliação do modelo que melhor prevê o comportamento dos pontos experimentais foi determinado o coeficiente de determinação (R^2) e também o desvio padrão normalizado (DPN) dado pela seguinte equação:

$$DPN = 100 \times \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{n=1}^n \left[\frac{q_{t,exp\ n} - q_{t,modelo\ n}}{q_{t,exp\ n}} \right]^2} \quad (11)$$

em que $q_{t,exp\ n}$ e $q_{t,modelo\ n}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) representam as capacidades de adsorção experimentais e previstas pelo modelo, no tempo t . Por sua vez n representa o número de pontos experimentais.

A combinação do valor de coeficiente de determinação mais próximo da unidade com o valor mais baixo para o desvio padrão normalizado implica o melhor ajuste aos valores experimentais.

Após ajuste dos modelos estudados foram obtidos os parâmetros cinéticos que se encontram listados na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos do modelo de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para a adsorção de galaxolide no MIP e no NIP. Ensaios realizados com 20 mg de polímero, $65 < d_p < 150 \mu\text{m}$, 5 mL de soluções de galaxolide de 10 mg.L^{-1} , $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 500 rpm.

Polímero	Solvente	Pseudo-primeira ordem				Pseudo-segunda ordem			
		$q_e, \text{ calc } (\mu\text{g.g}^{-1})$	$k_1 (\text{min}^{-1})$	R^2	DPN (%)	$q_e, \text{ calc } (\mu\text{g.g}^{-1})$	$k_2 (\text{g.}(\mu\text{g.min})^{-1})$	R^2	DPN (%)
MIP	Água	2442 ± 33	$3,0 \pm 0,5$	0,986	2,4	2481 ± 39	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	0,997	2,0
	Acetonitrilo	716 ± 22	$0,20 \pm 0,03$	0,982	6,1	765 ± 11	$(4,5 \pm 1,0) \times 10^{-4}$	0,998	2,3
NIP	Água	2366 ± 27	$1,0 \pm 0,3$	0,998	1,9	2361 ± 35	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	0,997	1,9
	Acetonitrilo	437 ± 9	$(100,0 \pm 9,7) \times 10^{-3}$	0,995	6,8	480 ± 11	$(3,7 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	0,996	3,4

Como se pode verificar pela análise da Tabela 13, a adsorção de galaxolide pelo MIP, quer em água, quer em acetonitrilo, segue uma cinética de pseudo-segunda ordem, como consequência de valores de R^2 mais próximos da unidade e também de um menor desvio. De acordo com Castro López *et al.* (2012) este resultado sugere que a etapa limitante poderá estar associada à sorção química, envolvendo fortes ligações de hidrogénio ou forças de valência através da partilha ou transferência de eletrões. A concordância entre o modelo de pseudo-segunda ordem e os dados experimentais para a cinética de adsorção poderá também indicar que a adsorção de galaxolide no MIP ocorre em sítios ativos energeticamente heterogêneos (Wong *et al.*, 2016). Por sua vez, os dados experimentais obtidos para o NIP, em ambos os solventes, são bem ajustados pelos dois modelos, o que pode indicar uma combinação entre a adsorção física e química entre o adsorvente e adsorbato (Pan *et al.*, 2010). Estes resultados estão, de um modo geral, de acordo com outros estudos, nos quais o modelo de pseudo-segunda ordem se revela adequado para descrever o processo cinético de adsorção nos MIPs/NIPs destinados análise de diferentes tipos de compostos (Dai *et al.*, 2013; Surikumaran *et al.*, 2014a; Yusof *et al.*, 2013; Zakaria *et al.*, 2009; Zulfikar *et al.*, 2016).

Dada a inexistência de estudos sobre o desenvolvimento de MIPs específicos para galaxolide, decidiu-se realizar uma comparação entre resultados cinéticos obtidos neste trabalho e os obtidos com MIPs destinados à análise de PCPs em meio aquoso. Assim, Meng *et al.* (2012) descrevem a aplicação da metodologia sol-gel para a síntese de um MIP seletivo ao metilparabeno, que tal como o galaxolide, está presente na formulação de diversos produtos de higiene pessoal. Para a avaliação da cinética de adsorção do metilparabeno no MIP e também no NIP, os autores utilizaram como solvente de adsorção uma mistura de água e metanol. Embora nada seja dito a esse respeito, a inclusão do solvente porogénico (metanol) como solvente de incubação poderá ser justificada pela necessidade de aumentar a seletividade do MIP devido ao efeito de memória que caracteriza este tipo de polímeros. Entre os modelos cinéticos testados pelos autores foi verificado que o melhor ajuste era definido pelo modelo de pseudo-segunda ordem, tanto para o MIP, como para o NIP, o que revela concordância com os resultados obtidos para a sorção de galaxolide no MIP e no NIP apresentados neste trabalho. Relativamente aos parâmetros cinéticos, Meng *et al.* (2012) registaram constantes cinéticas no intervalo $(5,9 \text{ a } 8,5) \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para o MIP e $(8,4 \text{ a } 11,9) \times 10^{-6} \text{ g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para o NIP. Em comparação, a sorção de galaxolide no MIP e no NIP, em água, revelou uma cinética mais rápida com valores para a constante cinética de $2,0 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para o MIP e NIP. Acrescente-se que no ensaio cinético reportado por Meng *et al.* (2012) foram utilizadas concentrações de adsorbato de 100 e 300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ou seja, 10 e 30 vezes superiores à concentração estudada neste trabalho. Uma vez que o aumento na concentração inicial conduz ao aumento da força motriz da adsorção, seria expectável que as

constantes de velocidade fossem superiores às determinadas neste trabalho, o que não se verificou.

Outro exemplo é apresentado por Shi *et al.* (2014a), na preparação de MIPs magnéticos para a extração de ácidos hidroxibenzóicos. Após a realização dos ensaios cinéticos, os autores concluem que os dados experimentais para a adsorção destes compostos em meio aquoso por parte do MIP e NIP, seguem o modelo de pseudo-segunda ordem. Partindo de uma concentração de 400 mg.L⁻¹ de ácido benzóico e ácido 4-hidroxibenzóico, são obtidas constantes cinéticas nos intervalos (2,0 a 8,0)x10⁻⁶ g.µg⁻¹.min⁻¹ para o MIP e (1,0 a 1,4)x10⁻⁵ g.µg⁻¹.min⁻¹ para o NIP. Estes resultados mostram uma cinética mais lenta do que aquela que é verificada na adsorção do galaxolide no MIP e NIP em água, mesmo para uma concentração inicial de analito tão elevada relativamente à usada para o galaxolide.

Em conclusão, os resultados cinéticos obtidos para o MIP e NIP em estudo podem ser considerados promissores para a extração de galaxolide em meio aquoso.

3.4.3. Estudo da isotérmica de adsorção

As isotérmicas de adsorção contemplam informação importante sobre as energias de ligação, modos de ligação e distribuição dos sítios ativos na interação das moléculas com a superfície dos adsorventes. Estas isotérmicas são obtidas pela representação gráfica das quantidades adsorvidas versus a concentração de soluto livre no equilíbrio. Os dados experimentais da isotérmica podem ser ajustados pelo recurso a diferentes modelos com os respetivos pressupostos. Neste trabalho foram considerados três modelos de isotérmica para descrever a relação entre a quantidade de galaxolide adsorvido no MIP/NIP e a concentração na fase líquida: Langmuir (Demirbas *et al.*, 2009), Freundlich (Umpleby Li *et al.*, 2001) e Temkin (Huang e Li, 2008).

A isotérmica de Langmuir é um modelo semi-empírico baseado em três considerações: (a) a adsorção ocorre em monocamada, (b) todos os sítios ativos são equivalentes e podem acomodar, no máximo, um *template* adsorvido e (c) a capacidade do *template* ficar adsorvido em determinado sítio não está dependente da ocupação dos sítios vizinhos. Este modelo defende também que a adsorção ocorre em sítios ativos homogéneos presentes na estrutura adsorvente. Em termos matemáticos, o modelo de Langmuir é descrito pela seguinte equação:

$$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (12)$$

onde q_{\max} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) é a capacidade máxima de adsorção e K_L ($\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) a constante de equilíbrio. Esta constante de equilíbrio mede o grau de interação entre a molécula de adsorbato e a superfície do adsorvente. Teoricamente, quando o valor de K_L é elevado, a interação entre o adsorvente e o adsorbato é forte, o que favorece a ocupação da superfície com moléculas de adsorbato (García-Calzón e Díaz-García, 2007).

Vários modelos empíricos têm sido propostos no sentido de descrever a heterogeneidade da superfície e a distribuição de energia contínua no processo de adsorção. Entre eles, o mais comum é o modelo de Freundlich, aplicável a superfícies heterogêneas, com adsorção em multicamada (García-Calzón e Díaz-García, 2007). Matematicamente o modelo de Freundlich é representado pela equação 13.

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (13)$$

onde K_F ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{-1/n}$) é o coeficiente de adsorção que determina a afinidade para a ligação e n a constante de Freundlich, indicativa da intensidade de adsorção. Alguns autores consideram que o parâmetro $1/n$ representa o índice de heterogeneidade, cujo valor pode variar entre zero e um. Assim para superfícies mais heterogêneas o valor de $1/n$ aproxima-se de zero enquanto valores de $1/n$ mais próximo da unidade são representativos de uma superfície mais homogênea (Surikumaran *et al.*, 2014b). Este modelo é bastante útil para sistemas compostos por sítios ativos que possam exibir alguma heterogeneidade, como é o caso dos MIPs. Por este motivo o modelo de Freundlich é amplamente aplicado a MIPs produzidos de acordo com a abordagem não-covalente (Umpleby Ii *et al.*, 2004).

Temkin e Pyzhev estudaram os efeitos das interações indiretas, por exemplo interações eletrônicas, entre adsorvente e adsorbato nas isotérmicas de adsorção. Este modelo defende que: (a) o calor de adsorção de todas as moléculas na camada é reduzido devido às interações entre adsorvente e adsorbato e (b) a adsorção é explicada por uma distribuição uniforme das energias de ligação (García-Calzón e Díaz-García, 2007). O modelo de Temkin é representado pela equação 14.

$$q_e = \frac{RT}{b} \ln(AC_e) \quad (14)$$

onde R representa a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T (K) a temperatura absoluta, A ($\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) a constante da isotérmica de Temkin e b ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) a constante de Temkin relativa ao calor de adsorção.

Com o propósito de estudar a sorção do galaxolide nos adsorventes MIP e NIP, foram realizados ensaios para a determinação das respectivas isotérmicas de adsorção. As experiências decorreram à temperatura de 25 °C, utilizando os dois adsorventes em contacto com soluções de galaxolide preparadas em água e em acetonitrilo. As razões mássicas testadas variaram entre 7,5 e 1750 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (galaxolide/polímero) e o tempo de equilíbrio aplicado foi de 120 min. Na Figura 41 estão representadas as isotérmicas de adsorção do galaxolide, onde é visível uma capacidade de adsorção equivalente em água, para o MIP e para o NIP. Este resultado revela que a adsorção do galaxolide é independente da existência de cavidades na estrutura do adsorvente, tratando-se por isso de uma adsorção não específica. Por sua vez, em acetonitrilo, é possível encontrar diferenças na *performance* dos dois adsorventes, com o MIP a demonstrar maior de capacidade de adsorção relativamente ao NIP. Uma vez que a adsorção no NIP ocorre de modo não específico, poder-se-á dizer que em acetonitrilo o processo de adsorção de galaxolide se dá preferencialmente nas cavidades específicas que caracterizam a estrutura do MIP.

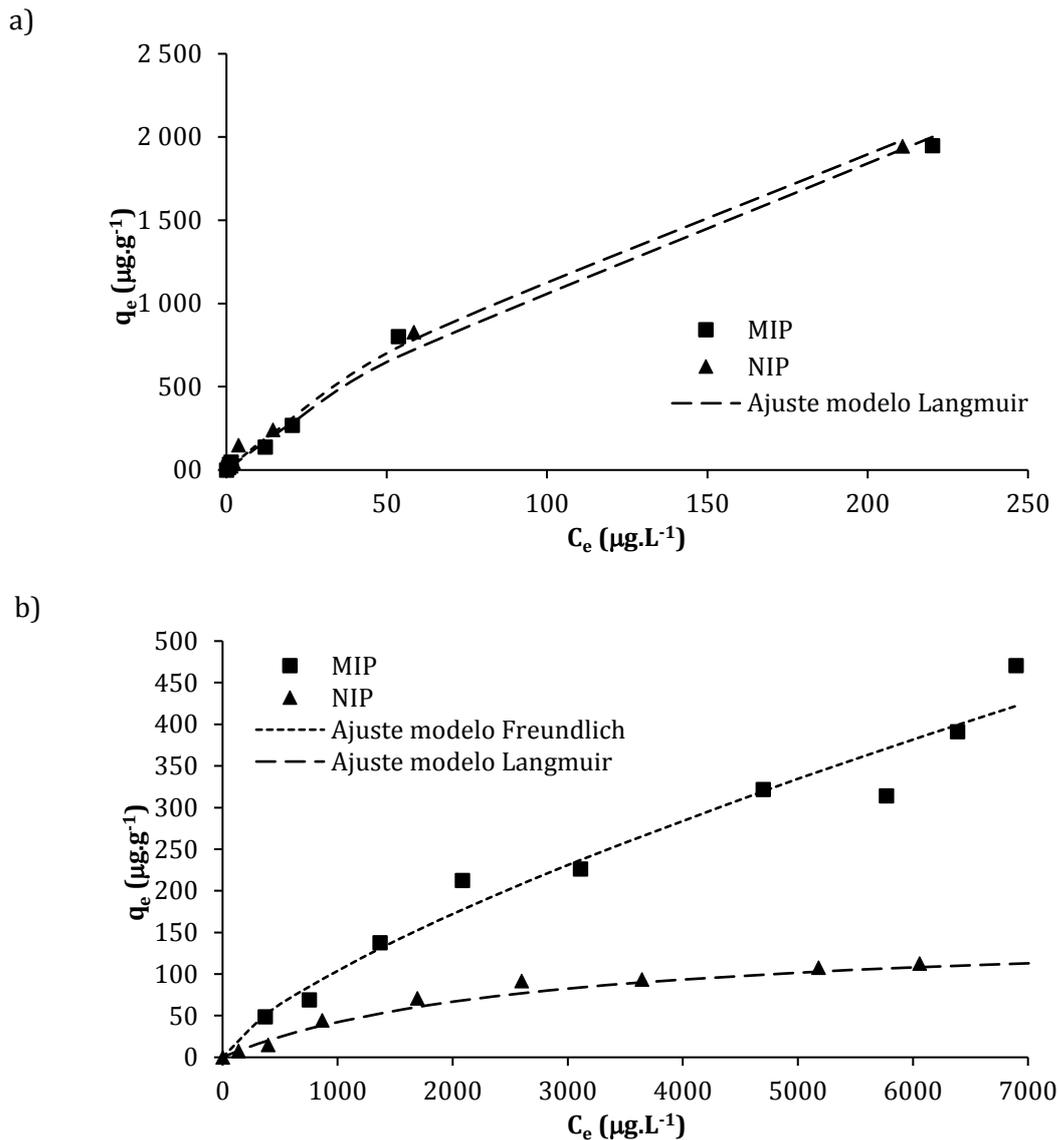


Figura 41. Isotérmicas de adsorção do galaxolide no MIP e NIP em a) água e b) acetonitrilo para concentrações de galaxolide entre 0,03 e 7 mg.L⁻¹ em acetonitrilo, correspondendo a razões mássicas galaxolide/polímero entre 7,5 e os 1750 µg.g⁻¹. Massa de adsorvente = 20 mg, 65 d_p <math><150\ \mu\text{m}</math>, T = 25 °C, 500 rpm, tempo de contacto = 120 min.

Os dados experimentais foram analisados à luz dos modelos descritos anteriormente através de uma análise não linear (minimização dos quadrados dos resíduos utilizando a ferramenta *Solver* do *Microsoft Excel*®). Como critérios para a avaliação do modelo que melhor prevê o comportamento dos pontos experimentais foi determinado o coeficiente de determinação e também o desvio padrão normalizado (DPN).

Assim, para o melhor ajuste será esperado um valor de coeficiente de correlação mais próximo da unidade e um valor de desvio mais baixo.

Os parâmetros calculados para os modelos de isotérmica estudados encontram-se compilados na Tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros das isotérmicas Langmuir, Freundlich e Temkin ($65 < d_p < 150 \mu\text{m}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm, tempo de contacto = 120 min).

Parâmetros	MIP		NIP		
	H ₂ O	ACN	H ₂ O	ACN	
Langmuir	q_{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	5317 ± 422	962 ± 32	4794 ± 346	159 ± 21
	K_L ($\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	$(2,7 \pm 0,8)\times 10^{-3}$	$(1,1 \pm 0,6)\times 10^{-4}$	$(3,3 \pm 0,7)\times 10^{-3}$	$(3,5 \pm 0,1)\times 10^{-4}$
	R^2	0,994	0,949	0,996	0,944
	DPN (%)	33,8	13,5	25,9	19,6
Freundlich	K_F ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})^{-1/n}$)	35 ± 10	$0,7 \pm 0,1$	43 ± 7	$1,3 \pm 0,1$
	n	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,3$
	R^2	0,992	0,956	0,997	0,917
	DPN (%)	33,9	12,7	57,8	41,9
Temkin	A ($\text{L}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	$0,7 \pm 0,5$	$(2,6 \pm 0,7)\times 10^{-3}$	$0,5 \pm 0,2$	$(6,2 \pm 0,2)\times 10^{-3}$
	B ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	9 ± 3	19 ± 2	7 ± 1	86 ± 10
	R^2	0,718	0,896	0,854	0,905
	DPN (%)	615,8	42,3	271,3	84,7

Com base na Tabela 14 é possível verificar que os dados experimentais relativos à adsorção de galaxolide no MIP em acetonitrilo são bem ajustados pelo modelo de Freundlich, facto confirmado estatisticamente pelo valor de R^2 mais próximo da unidade e pelo valor de desvio mais baixo. Este resultado põe em evidência a predominância de uma superfície heterogénea no MIP, que contem sítios ativos específicos (cavidades) que resultam das interações estabelecidas entre o monómero e o *template* aquando do processo de impressão molecular e sítios ativos não específicos (poros), todos eles com diferentes energias de ligação. Por sua vez, em água verifica-se uma melhor aproximação entre modelo de Langmuir e os resultados experimentais para o MIP, sugerindo uma ocupação equivalente dos sítios ativos por parte do analito.

Relativamente ao NIP, verificou-se que para acetonitrilo o modelo de Langmuir permitiu um melhor ajuste do que os modelos de Freundlich e de Temkin. No caso da água, o modelo de Freundlich apresentou um valor de R^2 mais elevado, seguido de muito próximo pelo modelo de Langmuir. No entanto, este último apresentou um valor de desvio significativamente mais baixo (26%). Deste modo considerou-se que Langmuir proporcionava um ajuste mais adequado aos valores experimentais do NIP para a adsorção de galaxolide em água. Os resultados obtidos para o NIP indicam um processo homogéneo de adsorção no polímero que se caracteriza pela presença sítios ativos não específicos.

No que diz respeito aos estudos sobre MIPs para PCPs, Meng *et al.* (2012) descreve a avaliação de 3 modelos (Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson) para estabelecer a relação entre a adsorção de metilparabeno no MIP/NIP e a correspondente concentração de equilíbrio em solução aquosa. Os ensaios de adsorção com os polímeros produzidos com técnica de sol-gel permitiram aos autores registar um coeficiente de determinação mais elevado para o modelo de Freundlich relativamente a Langmuir ou mesmo Redlich-Peterson (R-P). No entanto, com base no menor valor de desvio apresentado, considerou-se que o modelo R-P traduzia de forma mais aproximada a adsorção de metilparabeno no MIP e no NIP. Num outro estudo direcionado à análise de ácidos hidroxibenzoicos, Shi *et al.* (2014a) concluíram que o modelo de Langmuir permitia um melhor ajuste dos dados experimentais comparativamente ao modelo de Freundlich, para a adsorção dos analitos em meio aquoso no MIP e no NIP obtidos por impressão à superfície. Da análise destes dois estudos e comparação com o trabalho apresentado é possível afirmar que as diferentes estratégias seguidas para a síntese dos sorbentes poliméricos podem não só implicar diferentes morfologias, mas essencialmente determinar o tipo de interação do sorbente com o analito e conseqüentemente a sua capacidade de adsorção.

Usyskin *et al.* (2015) estudaram a adsorção em solos e biosólidos de três produtos incluídos na categoria de fármacos e produtos de higiene pessoal, dos quais fazia parte o galaxolide. As isotérmicas de adsorção do galaxolide em meio aquoso foram obtidas para uma gama de concentrações entre os 0,02 e os 5,3 mg.L⁻¹. Os dados experimentais foram ajustados com base nos modelos de Langmuir e Freundlich, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre os dois modelos, no que diz respeito à qualidade do ajuste. Devido à multiplicidade de sítios ativos presentes nos sorbentes testados, os autores consideraram como mais apropriado a aplicação do modelo de Freundlich. Com base neste modelo os autores descrevem, para a adsorção de galaxolide, valores de constantes de adsorção entre 67 e 1124 (L.kg⁻¹.mg^{1-m}) para três tipos de sorbentes: areia, argila e sedimento, utilizados isoladamente ou misturados com lamas ativadas. De forma a comparar o valor de K_F obtido neste trabalho com os valores supracitados, procedeu-se à respetiva conversão, tendo sido obtido uma constante de

adsorção igual a 6080 ($\text{L.kg}^{-1}.\text{mg}^{1-m}$) para os ensaios com o MIP e NIP. De referir que a variável m (índice de heterogeneidade) é equivalente ao parâmetro $1/n$ apresentado na Tabela 14. Em comparação, verifica-se que as capacidades adsorptivas do MIP e do NIP desenvolvidos neste trabalho são bastante superiores aos sorbentes testados por Usyskin *et al.* (2015), no que diz respeito à sorção do galaxolide. Para além disso, no estudo em análise é relatado um tempo de equilíbrio na ordem das 72 h o que com qualquer um dos sorbentes poliméricos poderia ser reduzido drasticamente para 120 min.

Analisando um dos sorbentes mais utilizados para a remoção de contaminantes, como é o caso do carvão ativado, foram encontrados valores de constante de adsorção para o modelo de Freundlich na ordem dos $15,3 \text{ mg.g}^{-1}.\text{(L.}\mu\text{g}^{-1})^{1/n}$, para uma água mili-Q, contendo fármacos e PCPs, entre eles o galaxolide, com concentrações iniciais entre 50 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Ternes e Joss, 2007). Em comparação, este valor está bastante acima do obtido para o MIP após respetiva conversão ($0,04 \text{ mg.g}^{-1}.\text{(L.}\mu\text{g}^{-1})^{1/n}$). No entanto, a utilização do MIP poderá ser considerada vantajosa, pois este sorbente permite a remoção específica de um componente, ao contrário de soluções como o carvão ativado, que apesar da excelente capacidade de adsorção implicam a remoção de vários compostos que possam estar fora do âmbito de monitorização (Murray e Örmeci, 2012).

3.4.4. Conclusão

A realização dos ensaios cinéticos demonstrou a elevada capacidade de adsorção do galaxolide por parte do MIP e NIP em soluções aquosas, indiciando uma adsorção de carácter não específico definida por interações de natureza hidrofóbica. Por sua vez, em acetonitrilo, verifica-se uma diferença significativa na capacidade de adsorção dos dois polímeros, como resultado de uma maior afinidade entre MIP e analito. Como tal, o acetonitrilo favorece o estabelecimento de interações específicas que permitem um aumento da capacidade de adsorção do MIP relativamente ao NIP. Ainda nestes ensaios verificou-se um tempo de equilíbrio de 10 min para a adsorção em água e de 60 min para o acetonitrilo, o que revela cinéticas bastante rápidas.

Da aplicação dos modelos cinéticos verificou-se que a adsorção de galaxolide no MIP em água e em acetonitrilo é descrita por um modelo de pseudo-segunda ordem que sugere que a etapa controlante seja a adsorção química. Por sua vez, os dados de adsorção para o NIP são bem descritos pelos dois modelos, em ambos os solventes, o que pode indicar a combinação de diferentes tipos de interação entre o polímero e o analito.

Relativamente às isotérmicas de adsorção foi obtida uma concordância entre os dados experimentais para a adsorção de galaxolide no MIP em acetonitrilo e o modelo de Freundlich

sugerindo um processo heterogêneo de adsorção, devido à existência de diferentes sítios ativos na estrutura do MIP. Em contraste, foi encontrada uma boa relação entre o modelo de Langmuir e adsorção de galaxolide no MIP em água, tendo sido obtida uma capacidade máxima de adsorção de 5,3 mg.g⁻¹. Por sua vez, os dados de adsorção para o NIP estão em conformidade com o modelo de Langmuir, indicando um processo homogêneo de adsorção, com capacidades máximas de adsorção de 4,8 mg.g⁻¹ para o caso da água e de 159 µg.g⁻¹ para o acetonitrilo.

3.5. Novo método de análise de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL

Neste capítulo é apresentado um método seletivo de extração para a análise de galaxolide em amostras aquosas. Como referido anteriormente, o método de injeção direta em HPLC-FL serviu o propósito de detetar e quantificar o galaxolide em matrizes aquosas com poucos interferentes orgânicos, apresentando limites de deteção bastante satisfatórios. No entanto, durante a análise de amostras reais (águas provenientes de ETARs e águas de rios) o método revelou menor fiabilidade, em especial para níveis de galaxolide mais baixos. Esta observação poderá ser explicada pela complexidade da matriz, composta por diversos interferentes que influenciam a quantificação do analito, em especial para concentrações mais baixas. No sentido de superar as limitações associadas ao método de injeção direta procurou-se desenvolver e validar um método de extração em fase sólida, com o objetivo de permitir uma pré-concentração e purificação da amostra (*clean-up*), através de uma extração seletiva do analito em estudo.

Durante os últimos anos tem sido privilegiada a aplicação dos MIPs à técnica de SPE, em que estes polímeros atuam como sorbentes seletivos para a análise de diversos compostos, em diversas matrizes (Breton *et al.*, 2006; Díaz-Bao *et al.*, 2012; Suedee *et al.*, 2006). A utilização dos MIPs na técnica de SPE é considerada atrativa pela especificidade e estabilidade, mas também pela compatibilidade com solventes aquosos e orgânicos (Andersson, 2000). Por outro lado, não é de desprezar a possibilidade de utilização do NIP, que embora seja utilizado como base de comparação para colocar em evidência a seletividade do MIP, apresenta um elevado potencial para aplicações ligadas ao tratamento de águas (Murray e Örmeci, 2012). A título de exemplo, Murray *et al.* (2011) realizaram um estudo focado na aplicação de um NIP como sorbente para o tratamento de águas residuais. No seguimento deste estudo, os autores registaram uma remoção de 98% de β -estradiol previamente adicionado à amostra. Embora não tenha sido realizada nenhuma comparação com o respetivo MIP, este estudo permitiu evidenciar a capacidade adsortiva do NIP e comprovar a sua aplicabilidade no tratamento de águas.

Com base nestes pressupostos foi investigado o desempenho do MIP e do NIP como sorbentes para um método de extração em fase sólida acoplado à técnica cromatográfica de HPLC-FL, para a análise de galaxolide em amostras aquosas reais. Foram utilizadas as designações MISPE e NISPE para o procedimento de extração por SPE utilizando como sorbente o MIP e o NIP, respetivamente, preparados de acordo com o procedimento descrito na secção 2.5.

3.5.1. Determinação do volume de breakthrough aplicado ao NISPE

Inicialmente, procedeu-se à otimização das principais condições envolvidas no procedimento de extração. Assim, começou-se por determinar o volume de *breakthrough*, ou seja, o volume de amostra percolado através do sorbente que equivale a uma percentagem de retenção do analito entre 99 e 95% (Bielicka-Daszkiwicz e Voelkel, 2009). Para a determinação do volume de *breakthrough* decidiu-se começar por utilizar o NIP, visto que a capacidade de adsorção deste polímero em água é bastante semelhante à do MIP. Por outro lado, a síntese do NIP é um processo mais rápido e menos dispendioso em comparação com o MIP, que requer a utilização de *template* e de etapas de lavagem para a remoção desse mesmo *template*.

Nesta etapa fez-se passar pela coluna contendo o NIP uma solução aquosa de galaxolide ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) a um caudal previamente otimizado de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Da realização deste ensaio resultou um volume de breakthrough de 100 mL, conforme evidenciado no gráfico da Figura 42. Este volume, por sua vez, corresponde a uma capacidade adsortiva de $125 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

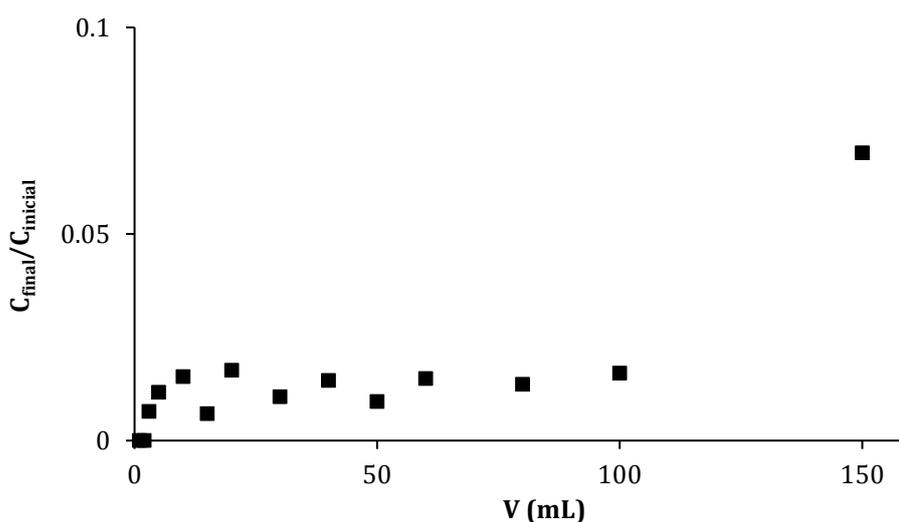


Figura 42. Resultados do ensaio de breakthrough do NIP, após passagem de uma solução aquosa de galaxolide $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a um caudal de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Para confirmar a capacidade de retenção do galaxolide no NISPE, fizeram-se passar duas soluções de galaxolide em água pura com concentrações de 25 e $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. O volume utilizado foi de 25 mL, o qual permitiu reduzir significativamente o tempo de procedimento sem ultrapassar a capacidade adsortiva, determinada no ensaio de *breakthrough*.

Na Figura 43, o NISPE revela reprodutibilidade nos resultados, apresentando uma retenção do analito muito próxima dos 100% para as soluções em análise.

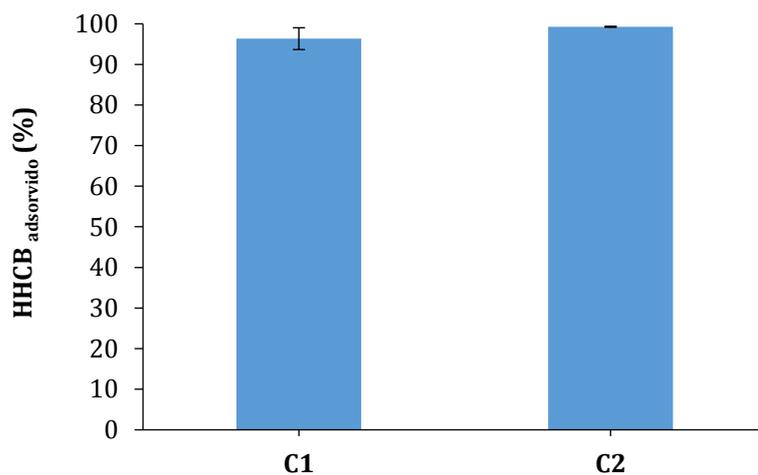


Figura 43. Efeito da concentração de analito na etapa de *load* para a adsorção de 25 (C1) e 500 (C2) $\mu\text{g.L}^{-1}$ de galaxolide ao NISPE. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

A etapa de lavagem é um procedimento crucial para maximizar as interações específicas entre o analito e os sítios ativos e, simultaneamente, diminuir as interações não específicas entre as espécies interferentes e o polímero (He *et al.*, 2007). Baseado no estudo de Sang *et al.* (2009) foi testada uma solução de lavagem de carácter polar, constituída por uma mistura de metanol:água (35:65, v/v). Assim, após o *load* de 25 mL de uma solução aquosa de galaxolide 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ao MISPE e ao NISPE, fez-se passar 5 mL de uma mistura de metanol:água (35:65, v/v) e avaliou-se a quantidade de galaxolide recuperada. Os resultados demonstraram que após a aplicação do solvente de lavagem, as perdas de analito não foram além de 7% no NISPE e de 1% no MISPE. Confirma-se assim que o solvente em estudo não afeta de modo significativo as interações que se estabelecem entre o analito e os dois sorbentes analisados. Com base na boa retenção de analito por parte do MISPE e do NISPE considerou-se apropriada a utilização da mistura de metanol:água (35:65, v/v) como solvente de lavagem.

Considerando a natureza da molécula de galaxolide e a forte retenção no MIP e no NIP devem utilizar-se solventes ou misturas de solventes com carácter hidrofóbico e polaridade reduzida para a eluição do analito. Nesse sentido foi investigado o perfil de eluição dos seguintes solventes: n-hexano, diclorometano, n-hexano:diclorometano (67:33 e 50:50, v/v) e acetonitrilo:diclorometano (70:30, v/v). Para este estudo foram avaliadas as recuperações no MISPE e NISPE, após condicionamento com 5 mL de n-hexano e 5 mL de água, seguido da passagem de 25 mL de água pura contaminada com 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de galaxolide. As colunas foram posteriormente lavadas com 5 mL de uma solução metanol:água (35:65, v/v) antes da secagem sob vácuo durante 10 min, com o objetivo de maximizar a interação do solvente de eluição com as

moléculas de galaxolide adsorvido. Em seguida, o analito foi eluído com 5 mL de cada um dos solventes em estudo, que foram levados à secura e retomados em 500 µL de acetonitrilo:água (85:15, v/v). Após reconstituição, os extratos foram injetados em HPLC-FL para avaliar a respetiva recuperação, dos ensaios realizados em duplicado.

Pela análise da Figura 44, constata-se que as recuperações no MISPE são superiores às do NISPE, para os solventes investigados. Analisando o efeito da polaridade, é possível verificar que, de um modo geral, as recuperações do analito diminuem com o aumento da polaridade do solvente, atingindo os valores mais baixos para a mistura acetonitrilo:diclorometano (70:30, v/v). Embora o aumento da polaridade possa favorecer a disrupção das ligações de hidrogénio entre analito e polímero, tal não se verificou neste caso, dado que a maioria das interações entre o galaxolide e os polímeros em estudo deverão ser de natureza hidrofóbica. Por outro lado, no outro extremo, a utilização de um solvente apolar, como é o caso do n-hexano, não se traduz em valores de recuperação mais elevados. Assim, entre os solventes investigados, a mistura de n-hexano:diclorometano (67:33, v/v) foi a que permitiu obter melhores recuperações (81% para o MISPE e 56 % para o NISPE). Este resultado poderá ser justificado pela combinação propriedades hidrofóbicas e polares adequadas para a recuperação do galaxolide.

Embora as recuperações mais elevadas de galaxolide tenham sido obtidas para a mistura de n-hexano:diclorometano (67:33, v/v), selecionou-se o n-hexano como solvente de eluição devido ao potencial carcinogénico associado ao diclorometano (Cayot *et al.*, 2016).

No que diz respeito ao volume de eluição, foi testada, em duplicado, a aplicação de 2 x 5 mL de n-hexano e avaliada a influência nos valores finais de recuperação. Este aumento de volume traduziu-se num acréscimo de 5% no valor da recuperação com o NISPE e 9% para o caso do MISPE (Figura 45). Dado que, para evaporar um volume superior de eluente será necessário um aumento do tempo de secagem e, conseqüente aumento dos custos de operação, considerou-se pouco significativa a contribuição para a recuperação após a eluição com 2 x 5 mL de n-hexano. Como tal, definiu-se como volume ótimo a aplicação de 5 mL de n-hexano para a eluição do analito.

Em resumo, as condições ótimas definidas para o processo de extração foram: volume de *loading* de 50 mL (inferior ao volume de *breakthrough*), 5 mL de metanol:água (35:65, v/v) como solvente de lavagem, secagem sob vácuo durante 10 min e 5 mL de n-hexano.

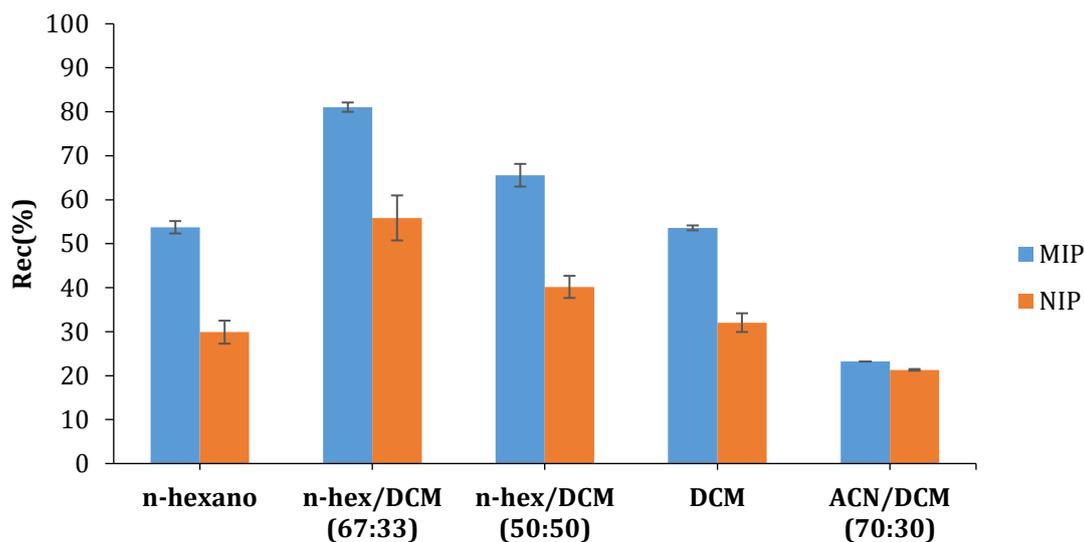


Figura 44. Estudo da influência da natureza do solvente na recuperação do galaxolide adsorvido no MISPE e NISPE. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

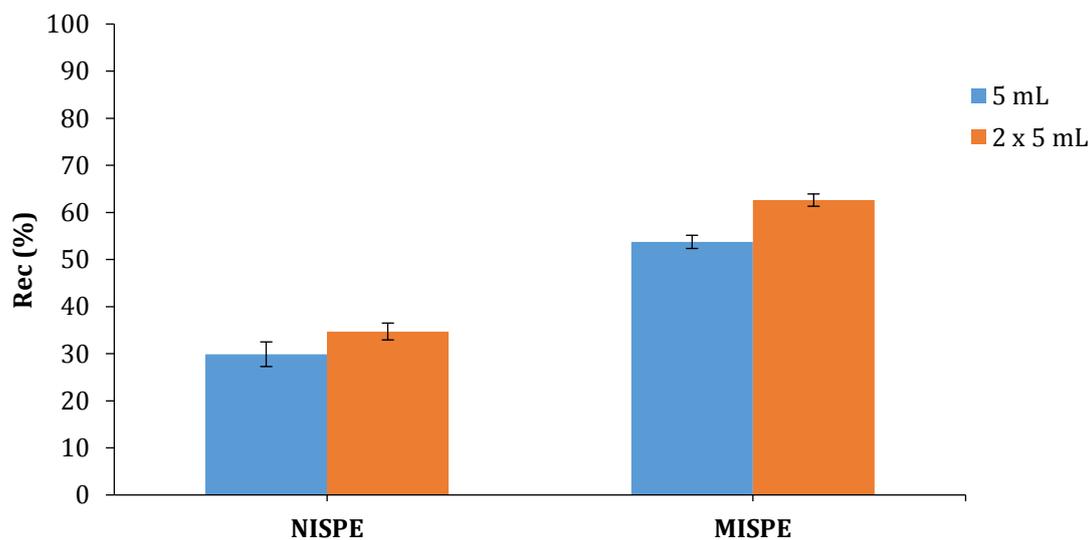


Figura 45. Estudo da influência do volume de n-hexano na recuperação do galaxolide adsorvido no MISPE e NISPE. As barras de erro representam o desvio padrão de três medições.

3.5.2. Validação do método MISPE-HPLC-FL

As diferenças observadas ao nível das recuperações obtidas para o MISPE e NISPE permitem evidenciar o potencial do MIP para a análise de galaxolide em matrizes aquosas. Nesse sentido, o método de MISPE-HPLC-FL foi alvo de um estudo de validação para avaliar a gama de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão (ensaios de recuperação) e incerteza global.

Dadas as recuperações médias do MISPE foi necessário realizar uma calibração com padrões extraídos. Para esta calibração foram utilizados seis padrões de galaxolide preparados em água pura, numa gama de concentrações entre 0,1 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em seguida, estas amostras foram extraídas de acordo com o protocolo otimizado para o MISPE e analisadas por HPLC-FL. Foi também analisado um branco laboratorial, o qual consistiu na extração de água pura.

A representação da resposta analítica dos extratos em função da concentração inicial deu origem ao gráfico da Figura 46, no qual podemos observar um comportamento linear na gama de concentrações estudada. A determinação dos limites de deteção e quantificação foi obtida com base na razão de sinal ruído (S/N) igual a 3 e a 10, respetivamente, tendo sido obtido um limite de deteção de 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e um limite de quantificação de 0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

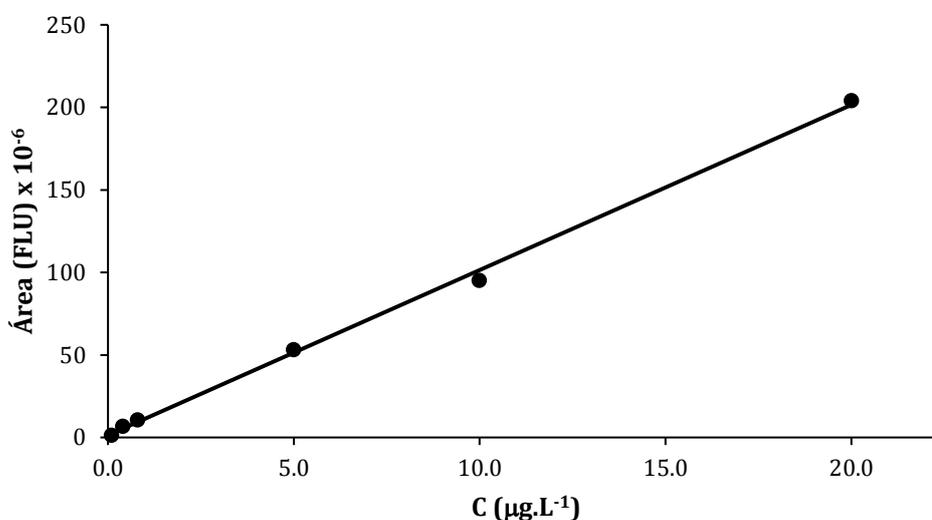


Figura 46. Reta de calibração para a injeção de padrões de galaxolide em água pura extraídos por MISPE.

Para a determinação da precisão do método proposto foram utilizados padrões de galaxolide em água pura a 3 níveis de concentração – 0,1; 5 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, os quais foram extraídos por MISPE em três dias consecutivos. Os resultados obtidos revelaram coeficientes de variação entre 4,4 e 6,9% para os três níveis de contaminação. Normalmente, são considerados aceitáveis valores até 10%, tendo em conta a gama de concentrações de trabalho ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Como tal, os resultados indicam que o método proposto é preciso. Na Tabela 15 encontram-se registados os parâmetros de validação para a análise de galaxolide pelo método MISPE-HPLC-FL.

Tabela 15. Parâmetros de validação para a determinação de galaxolide por MISPE-HPLC-FL.

Parâmetros de validação	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Galaxolide
Gama de linearidade ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	0,1 – 20
R^2	-	0,998
LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	0,01
LOD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	-	0,03
Precisão Intermédia (%CV)	0,1	6,9
	5	5,7
	20	4,4

Para a determinação da exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação em amostras reais. Para o efeito, decidiu-se utilizar água de aflente de ETAR, que após filtração foi fortificada com 0,4; 5 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de galaxolide. As extrações foram realizadas em replicados de 6, com o respetivo branco laboratorial (água de aflente sem fortificação). Após a extração para cada um dos níveis de contaminação, as colunas de MISPE foram regeneradas com 10 mL de n-hexano para assegurar a libertação completa das moléculas de analito retidas no sorbente. Este procedimento permitiu também avaliar a capacidade de reutilização das colunas de MISPE ao longo dos ensaios.

As recuperações (expressas em percentagem) foram calculadas com base na curva de calibração do MISPE. Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 16 pode-se verificar que as recuperações médias variaram entre 103,6 e 108,2% com os coeficientes de variação entre 2,6 e 4,1%. As boas recuperações ao longo dos três ciclos de adsorção/dessorção, evidenciam a capacidade de regeneração do MISPE, sem que ocorra perda de eficiência. Este resultado confirma a possibilidade de reutilização o que torna a utilização do MIP bastante vantajosa.

Tabela 16. Estudo de exatidão do método MISPE-HPLC-FL.

Amostra	Fortificação ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Rec (%)						Média	CV (%)
		1	2	3	4	5	6		
Água de Afluente	0,4	-	107,3	104,6	102,4	97,6	106,9	103,8	3,8
	5	100,8	107,2	109,1	101,6	97,9	104,9	103,6	4,1
	20	108,3	108,8	111,2	110,0	103,1	108,1	108,2	2,6

Na Figura 47 estão representados os cromatogramas de uma amostra de água de afluente de ETAR injetada em (A) HPLC-FL após filtração e injetada em (B) HPLC-FL após extração com o MISPE. Como se pode verificar, a amostra em estudo é caracterizada por um acentuado nível de complexidade, que impede a identificação e separação adequadas do pico de galaxolide pelo método de injeção direta. No entanto, após extração com o MIP, a complexidade exibida pela matriz diminui, comprovando a eficácia da etapa de pré-tratamento da amostra. A utilização do MIP permite a purificação da amostra, através da eliminação de interferentes que possam estar presentes na matriz. Apesar disso e, de acordo com o cromatograma (B) da Figura 47, a análise dos extratos por HPLC-FL, após o processo de extração com o MISPE, revelou a presença de outros compostos. Contudo, os picos observados não provocaram qualquer interferência na identificação e separação do pico de galaxolide.

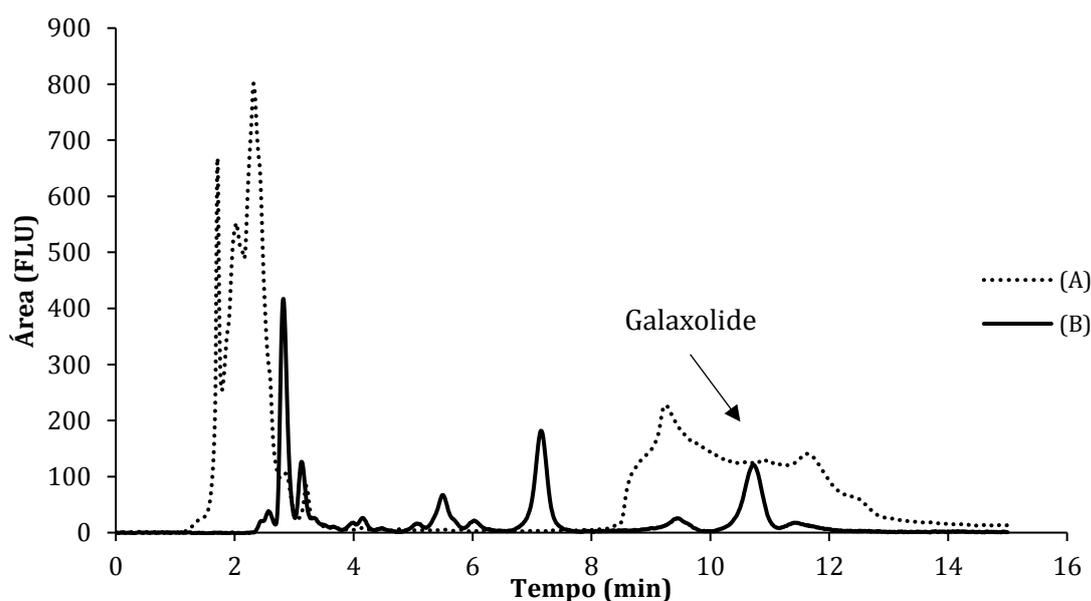


Figura 47. Cromatogramas obtidos após a injeção em HPLC-FL de uma amostra de água de afluente (A) sem tratamento e (B) após tratamento com MISPE.

A incerteza global associada à quantificação de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL foi estimada pelo método descrito pela EURACHEM (2000) (Group et al., 2000). O procedimento de cálculo, bem como as expressões utilizadas para estimar a incerteza global do método encontram-se descritas no Anexo I. Pela análise da Figura 48 conclui-se que a incerteza associada à reta de calibração (U_2) representa a principal fonte de incerteza, particularmente para concentrações de galaxolide menores ou iguais a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Para concentrações superiores, o peso da incerteza associada à precisão (U_3) sobrepõe-se à associada à reta de calibração (U_2), passando a ser a fonte com maior impacto no valor de incerteza global. Relativamente às incertezas associadas à preparação dos padrões (U_1) e exatidão (U_4) é possível denotar um aumento destas com as concentrações de galaxolide, sendo, no entanto, a contribuição individual destas fontes pouco significativa para o valor final de incerteza.

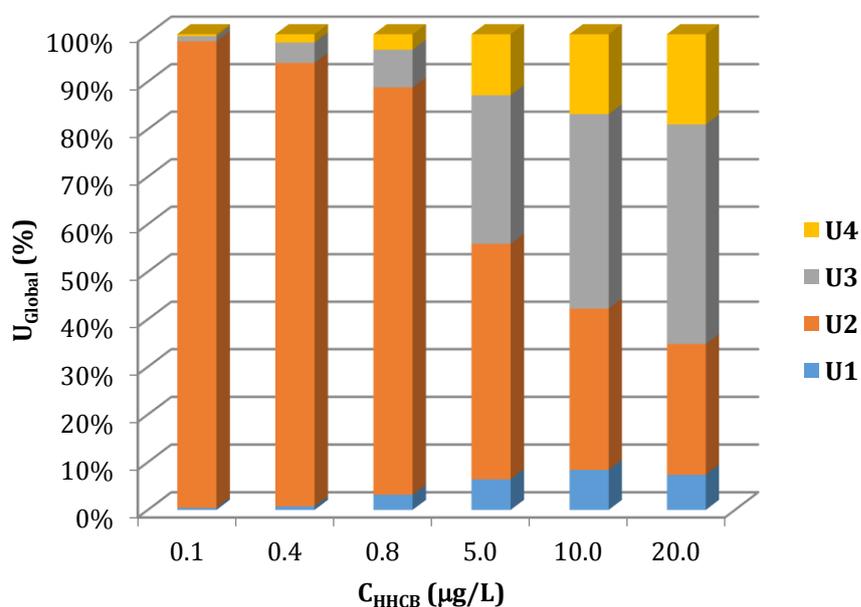


Figura 48. Contribuição das incertezas individuais no resultado da incerteza global para a quantificação de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL. U_1 - incerteza associada à preparação de padrões; U_2 - incerteza associada à reta de calibração; U_3 - incerteza associada à precisão; U_4 - incerteza associada à exatidão.

Na Figura 49 encontra-se representada a incerteza global em função da concentração de analito. Assim, para concentrações superiores a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ a incerteza global apresenta valores abaixo de 6,3%. No entanto, para concentrações mais baixas, o valor da incerteza aumenta significativamente. Em termos práticos, qualquer resultado nesta zona de trabalho pode ser afetado de uma incerteza considerável, sendo que para concentrações inferiores a $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$, a incerteza do método pode fazer a diferença entre o resultado situar-se acima ou abaixo do limite de deteção.

Em comparação com os métodos de injeção direta apresentados no capítulo 3.1, verifica-se que o processo de extração com o MISPE não faz aumentar a incerteza do resultado final. No caso do método de injeção direta de padrões em água, para a gama de concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi verificada uma incerteza entre 4 e 47%. Por sua vez, com o método MISPE-HPLC-FL, foram obtidos valores ligeiramente mais satisfatórios, com uma incerteza entre 4 e 35% em padrões na mesma gama de concentrações.

Deve ter-se presente que os resultados experimentais serão sempre caracterizados por uma incerteza, independentemente do método aplicado. Nesse sentido, o método baseado na extração com MISPE, destaca-se por permitir uma remoção considerável dos interferentes presentes na amostra real, resultando, como comprovado anteriormente em cromatogramas com melhor definição (Figura 47) que permitem atingir níveis satisfatórios para a quantificação do analito em estudo.

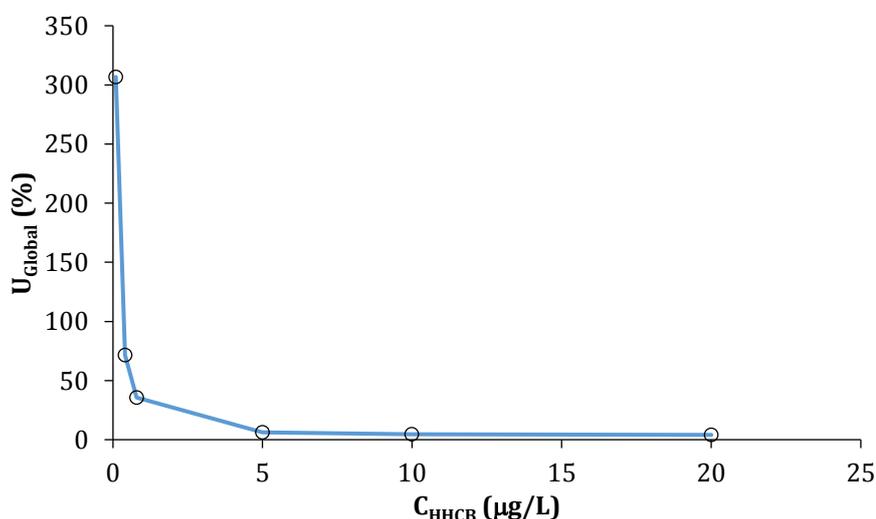


Figura 49. Incerteza global da metodologia analítica para a quantificação de galaxolide em águas por MISPE-HPLC-FL.

O desempenho do método desenvolvido neste estudo foi alvo de comparação com alguns métodos anteriormente reportados baseados em SPE, para a análise de galaxolide em amostras aquosas. As principais características dos métodos analisados encontram-se sumarizadas na Tabela 17. Como pode ser visto, o MISPE permite obter recuperações ao nível dos sorbentes comerciais, chegando mesmo a apresentar coeficientes de variação inferiores aos restantes métodos. Por outro lado, apesar dos limites para os métodos analisados serem mais baixos, poderá ser realizado um *scale-up* do MISPE, com o aumento do volume de amostra, o que permitirá baixar os limites de deteção desta metodologia. Convém também referir que os limites descritos na literatura advêm da aplicação de métodos de deteção mais dispendiosos, como é o caso do

GC-MS. Nesse sentido, a utilização do MISPE acoplado a um método de detecção mais acessível e simples de operar como o HPLC-FL poderá representar uma metodologia mais conveniente para a análise de galaxolide em amostras aquosas.

Tabela 17. Comparação do método desenvolvido com os métodos reportados anteriormente baseados em extração em fase sólida para a determinação de galaxolide em amostras aquosas.

Amostra	Técnica de Extração	Método de detecção	LOD/LOQ (ng.L ⁻¹)	Rec (%)	CV (%)	Ref.
Afluente ETAR	SPE – C18	GC-MS	3	88,2-91,6	8,8-14,1	(Simonich <i>et al.</i> , 2000)
Efluente ETAR			2	123-144	4,4-8,6	
Água	SPE-C18	GC-MS	-	78,4	5,9	(Sang <i>et al.</i> , 2009)
Afluente ETAR	SPE – Oasis HLB	GC-MS	1	90-100	-	(Vallecillos <i>et al.</i> , 2014)
Efluente ETAR			2			
Afluente ETAR	MISPE	HPLC-FL	10	103,8-108,2	2,6-3,8	Presente trabalho

3.5.3. Conclusão

Neste capítulo foi estudada a aplicabilidade do MIP e do NIP como sorbentes para a extração em fase sólida de amostras aquosas contendo galaxolide. Após a realização de ensaios de otimização foi possível definir as condições ótimas para o procedimento de extração de galaxolide. Nas condições ótimas foi possível verificar diferenças significativas nas recuperações obtidas com os dois polímeros em estudo. Assim, a aplicação do MISPE conduziu a recuperações de 54% enquanto o uso do NISPE resultou em recuperações de 30%. Pode-se por isso concluir que a *performance* do MIP é superior na aplicação da técnica de extração em fase sólida.

O método proposto para a análise de galaxolide em amostras aquosas foi posteriormente validado. Dadas as baixas recuperações do MISPE foi aplicado uma calibração externa que conduziu a um limite de detecção de 0,01 µg.L⁻¹. Ao nível da precisão foram obtidos coeficientes de

variação entre 4,4 e 6,9%, valores esses que atestam a precisão da metodologia proposta. Perante a utilização de amostras reais, o método de MISPE-HPLC-FL provou ser exato, com recuperações entre os 103,8 e os 108,2% para concentrações de galaxolide entre 0,4 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Em comparação com outros métodos baseados em SPE para a análise de galaxolide, é possível concluir que o MISPE permite obter excelentes recuperações do analito. Apesar de os limites de detecção obtidos serem superiores aos reportados na literatura, esta metodologia destaca-se por combinar um sorbente (MIP) mais específico e com potencial para sucessivas utilizações, com um método de detecção menos dispendioso e mais simples de operar como é o caso do HPLC-FL.

Capítulo 4

4. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um polímero impresso molecularmente com potencial para ser aplicado numa nova metodologia, de extração e análise de galaxolide em matrizes aquosas.

O desenvolvimento do polímero impresso molecularmente implicava a análise e quantificação de galaxolide no processo de síntese (polimerização e extração) e também em ensaios de caracterização do MIP. Baseado na técnica analítica de HPLC com detetor de fluorescência, foram desenvolvidos dois métodos analíticos de injeção direta para a análise de galaxolide, consoante o solvente utilizado na preparação da solução de galaxolide. Numa gama de concentrações entre os 0,2 e os 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foram obtidos limites de deteção de 0,07 e 0,31 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o galaxolide em acetonitrilo:água (85:15, v/v) e em água, respetivamente. Estes dois métodos revelaram-se precisos, apresentando coeficientes de variação inferiores a 10%. No que diz respeito à exatidão, o método em acetonitrilo:água (85:15,v/v), avaliado para soluções padrão, apresentou recuperações na ordem dos 98%. Já para o método em água, foi avaliada a exatidão em amostras reais (água de rio, ETAR e torneira), o que resultou em recuperações entre 45,5 e 55,5% para contaminações na ordem de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados pouco exatos poderão estar relacionados com a complexidade das amostras reais, que sem extração prévia, poderão conter diversos interferentes com influência na quantificação do galaxolide. Ao nível da incerteza global, verificaram-se valores abaixo dos 13% em ambos os métodos, para concentrações superiores a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. No entanto, à medida que as concentrações se aproximam de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a incerteza aumenta drasticamente para valores entre 47 e 63%. Concluiu-se que os métodos de injeção direta, em particular o método para galaxolide em água, poderão não ser suficientemente robustos para permitir uma análise adequada de amostras aquosas reais.

Para o processo de *design* do MIP seletivo a galaxolide foram considerados dezanove estudos com referência à síntese deste tipo de polímeros para análise de compostos pertencentes à classe dos PCPs. Desta análise resultou a seleção dos principais componentes, bem como da técnica a seguir para a síntese do MIP. Seguindo uma técnica de polimerização em suspensão, utilizou-se o

ácido metacrílico como monómero funcional, o galaxolide como *template* e o acetonitrilo como solvente porogénico. Como *cross-linker* e iniciador, selecionou-se o dimetacrilato de etilenoglicol e o 2,2'-azo-bis-iso-butironitrilo, respetivamente. Para além disso, como meio de dispersão utilizou-se uma solução de álcool polivinílico em água. Com base nestes componentes e técnica, procedeu-se à otimização do MIP através da avaliação da taxa de impressão em nove formulações, nas quais foram variadas as razões estequiométricas entre *template*, monómero e *cross-linker*. Dessa avaliação resultaram taxas de impressão próximas de 99%, demonstrando uma excelente retenção do galaxolide em qualquer uma das formulações testadas. De acordo com as razões estequiométricas mais utilizadas para a síntese de MIPs, foi definida uma razão ótima de 1:4:20 para o *template*, monómero e *cross-linker*, respetivamente.

No que diz respeito à extração do *template* e sua otimização, foram analisadas três variáveis: tipo de técnica, solvente e número de ciclos. Baseando a análise na avaliação da capacidade de eluição, fez-se a comparação entre a extração em Soxhlet e a extração por ultra-sons com uma mistura de metanol:ácido acético (90:10, v/v). Os resultados revelaram uma capacidade de eluição de $254 \mu\text{g}_{\text{HHCb}} \cdot \text{g}_{\text{MIP}}^{-1}$ em 30 minutos para o ultra-sons, ao passo que a extração em Soxhlet apenas permitiu extrair $66 \mu\text{g}_{\text{HHCb}} \cdot \text{g}_{\text{MIP}}^{-1}$ em 24 h. Com nestes resultados, concluiu-se que a técnica de ultra-sons correspondia à técnica mais adequada para a extração do galaxolide. Relativamente à natureza do solvente, foram comparadas as capacidades de eluição em ultra-sons, com quatro solventes: metanol:ácido acético (90:10, v/v), acetonitrilo, acetonitrilo:água (85:15, v/v) e n-hexano. Desta análise concluiu-se que o n-hexano era responsável pela libertação de uma maior quantidade de galaxolide da matriz polimérica, revelando uma capacidade de eluição de $316 \mu\text{g}_{\text{HHCb}} \cdot \text{g}_{\text{MIP}}^{-1}$ em 30 minutos. A aplicação da técnica de ultra-sons com n-hexano demonstrou a necessidade de dez ciclos de lavagem (no mínimo) para que se atingisse uma extração satisfatória no MIP, ou seja, para que os níveis de galaxolide no extrato fossem inferiores ao limite de deteção do método de análise.

Neste estudo, o MIP otimizado e o respetivo polímero de referência (NIP), foram alvo de ensaios de caracterização. Pela observação em microscópio eletrónico concluiu-se não existirem diferenças morfológicas entre os dois polímeros, não sendo possível identificar a presença de cavidades específicas na estrutura do MIP. Por sua vez, os ensaios de degradação térmica resultaram em perfis semelhantes para os dois polímeros, o que poderá indiciar uma remoção eficaz do galaxolide da matriz do MIP. Verificou-se também que a decomposição do MIP e NIP decorre entre 200 e 400 °C. A partir de ensaios de adsorção em atmosfera de azoto foi possível obter uma área superficial de $2,3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para o MIP e $2,1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para o NIP. Esta diferença poderá ser atribuída ao efeito de impressão causado pela utilização de *template* no processo de síntese do MIP, o que poderá implicar maior seletividade face ao NIP. Por comparação, verifica-se que as

áreas obtidas são significativamente inferiores aos valores de literatura para estes materiais, tipicamente entre os 100 e os 400 m².g⁻¹ (Singh *et al.*, 2014). Esta situação poderá estar relacionada com a elevada concentração de *cross-linker* utilizada na formulação do MIP que pode resultar em polímeros menos porosos e com menor área superficial.

Neste estudo foram realizados ensaios cinéticos para a adsorção de galaxolide no MIP e no NIP, para dois solventes: água e acetonitrilo. Os resultados experimentais revelaram em primeira instância um tempo de equilíbrio de 10 min para água e de 60 min para o acetonitrilo. Para além disso, nos ensaios em água foi registada uma afinidade equivalente do galaxolide para o MIP e para o NIP, o que é indicativo de uma adsorção não específica, que poderá resultar de uma forte contribuição de interações hidrofóbicas entre o analito e os polímeros em estudo. No caso do acetonitrilo, foi possível verificar uma diminuição da quantidade máxima adsorvida em cada um dos polímeros relativamente ao ensaio em água. Por outro lado, a utilização deste solvente permitiu evidenciar as diferenças entre os dois polímeros, com o registo de uma maior afinidade entre o galaxolide e o MIP. Esta diferença poderá ser justificada pela contribuição da adsorção específica que resulta da presença de cavidades específicas na estrutura do MIP.

Da realização dos ensaios de equilíbrio, verificou-se que a isotérmica de Langmuir representava adequadamente o processo de adsorção no NIP, que registou uma capacidade máxima de adsorção de galaxolide de 4,8 mg.g⁻¹ para o caso da água e de 159 µg.g⁻¹ para o acetonitrilo. O modelo de Langmuir revelou-se igualmente adequado para descrever o processo de adsorção de galaxolide em água por parte do MIP, com uma capacidade máxima de adsorção de 5,3 mg.g⁻¹. Por sua vez, em acetonitrilo, os dados experimentais da adsorção de galaxolide no MIP são bem ajustados pelo modelo de Freundlich que conduziu a uma constante de equilíbrio igual a 0,70 µg.g⁻¹ (µg.L⁻¹)^{-1/n}. Em comparação com outro tipo de sorbentes, o MIP desenvolvido neste estudo apresenta uma capacidade adsorptiva bastante satisfatória, contudo inferior à registada para um dos sorbentes mais comuns na remoção de contaminantes, como é o caso do carvão ativado.

Finalmente foi avaliada a aplicabilidade do MIP e do NIP como sorbentes para o processo de extração em fase sólida. Após estudos preliminares para definição das condições ótimas de extração determinaram-se as recuperações de padrões de galaxolide em água pura para o MISPE e para o NISPE. Os resultados demonstraram recuperações mais altas para o MISPE (54%), enquanto o uso do NISPE resultou em recuperações de 30%. Com estes resultados foi possível concluir que existem diferenças significativas na aplicação do MIP e do NIP na técnica de SPE.

Após estes ensaios foi aplicada uma calibração externa para validação do método MISPE-HPLC-FL. Desta calibração resultou um limite de deteção de 0,01 µg.L⁻¹ e uma precisão

expressa pelo coeficiente de variação, entre 4,4 e 6,9%. No entanto o resultado mais atrativo foi obtido para a aplicação de amostras de águas de ETAR, para as quais o MISPE revelou recuperações entre 103,8 e 108,2%, para níveis de fortificação entre 0,4 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$. No que diz respeito à avaliação da incerteza global, concluiu-se que o método MISPE-HPLC-FL não faz aumentar a incerteza do resultado final em comparação com os métodos de injeção direta. Assim, para a gama de concentrações entre 1 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi verificada uma incerteza entre 4 e 35% para o MISPE-HPLC-FL. Numa comparação com outros métodos SPE para análise de galaxolide é possível destacar as excelentes recuperações obtidas pelo MISPE. No entanto, e tal como esperado, os limites de deteção deste método são superiores aos obtidos para métodos analíticos mais complexos e dispendiosos como o GC-MS.

Desta forma pode-se afirmar que a aplicação do MISPE acoplado a um equipamento de cromatografia líquida com detetor de fluorescência, constitui uma metodologia simples, menos dispendiosa e com grande potencial para a análise de galaxolide em amostras aquosas.

Capítulo 5

5. Sugestões para trabalho Futuro

Neste trabalho foi estudada a aplicabilidade de um sorbente altamente específico, designado por polímero impresso molecularmente (MIP), para a extração e análise de galaxolide em amostras aquosas. No decurso do trabalho e consoante as alternativas adotadas, de várias possíveis, verificou-se a necessidade de realização de trabalho complementar que a seguir se sugere.

Em primeiro lugar sugere-se uma caracterização aprofundada de todas as formulações de MIP testadas no decorrer dos ensaios de otimização. A avaliação de propriedades como a área superficial, bem como a realização de ensaios de adsorção com todas as formulações permitirá tirar conclusões mais fiáveis para a obtenção de um MIP otimizado.

Outro aspeto importante é a realização de estudos de seletividade cruzada. Uma das características que melhor permite destacar o MIP de outro tipo de sorbentes é a sua seletividade para com o analito alvo. Nesse sentido sugere-se um estudo de adsorção mais detalhado com a inclusão de outro tipo de *musks* ou mesmo contaminantes tipicamente detetados em águas. Este estudo para além de permitir avaliar a especificidade do MIP poderá também servir de indicação para aplicabilidade deste sorbente na remediação de águas contaminadas.

A aplicação do MIP à técnica de SPE (MISPE) e o seu acoplamento com a técnica de HPLC-FL revelou resultados satisfatórios, do ponto de vista de recuperação do analito e sobretudo por uma purificação da amostra que permitiu a quantificação de galaxolide em amostras reais. Apesar disso, os limites de deteção do método proposto estão ainda afastados dos obtidos para técnicas baseadas em técnicas analíticas mais complexas como por exemplo o GC-MS. Assim com base na capacidade adsortiva do MIP, sugere-se a realização de ensaios com MISPE envolvendo volumes superiores de amostra. Esta alteração poderá conduzir a um aumento do fator de concentração, permitindo por isso baixar os limites de deteção do método proposto.

Com base nas recentes contribuições para o desenvolvimento da técnica de impressão molecular deverá ser considerado a aplicação de diferentes estratégias para a síntese de um MIP seletivo ao galaxolide. Como ponto de partida sugere-se o estudo de metodologias baseadas na impressão à superfície e a inclusão de partículas magnéticas cuja combinação poderia resultar numa melhoria do processo de extração do *template*, numa maior capacidade de adsorção e facilidade na separação dos MIPs da fase líquida.

Finalmente, numa perspetiva de aplicação do MIP a nível industrial como método adequado ao tratamento de águas, considera-se útil o estudo do comportamento deste sorbente em sistemas em contínuo para uma aproximação dos processos verificados em instalações de tratamentos de efluentes. A par deste estudo sugere-se uma análise económica que possa sustentar a aplicabilidade do MIP no tratamento de águas.

Capítulo 6

6. Referências Bibliográficas

- Abdul Raof, S. F., Mohamad, S., and Abas, M. R. (2013). Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Silica Gel for 2-Hydroxybenzoic Acid in Aqueous Solution. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 5952-5965.
- Abramsson-Zetterberg, L., and Slanina, P. (2002). Macrocyclic musk compounds—an absence of genotoxicity in the Ames test and the in vivo Micronucleus assay. *Toxicology Letters* **135**, 155-163.
- Abu-Surrah, A. S., and Al-Degs, Y. S. (2010). A molecularly imprinted polymer via a salicylaldiminato-based cobalt(III) complex: A highly selective solid-phase extractant for anionic reactive dyes. *Journal of Applied Polymer Science* **117**, 2316-2323.
- Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J., and Whitcombe, M. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition* **19**, 106-180.
- Alvarez-Lorenzo, C., and Concheiro, A. (2013). "Handbook of molecularly imprinted polymers," UK: Smithers Rapra Publishing.
- Andersson, H. S., and Nicholls, I. A. (1997). Spectroscopic Evaluation of Molecular Imprinting Polymerization Systems. *Bioorganic Chemistry* **25**, 203-211.
- Andersson, L. I. (2000). Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **739**, 163-173.
- Andersson, L. I., Paprica, A., and Arvidsson, T. (1997). A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting. *Chromatographia* **46**, 57-62.
- Arshady, R., and Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Die Makromolekulare Chemie* **182**, 687-692.
- Artola-Garicano, E., Borkent, I., Hermens, J. L. M., and Vaes, W. H. J. (2003). Removal of Two Polycyclic Musks in Sewage Treatment Plants: Freely Dissolved and Total Concentrations. *Environmental Science & Technology* **37**, 3111-3116.
- Asman, S., Mohamad, S., and Sarih, N. (2015). Effects of RAFT Agent on the Selective Approach of Molecularly Imprinted Polymers. *Polymers* **7**, 484.
- Azodi-Deilami, S., Abdouss, M., and Seyedi, S. R. (2010). Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer for controlled release of tramadol. *Central European Journal of Chemistry* **8**, 687-695.
- Balk, F., and Ford, R. A. (1999). Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters* **111**, 57-79.

- Beltran, A., Marcé, R. M., Cormack, P. A. G., and Borruel, F. (2010). Synthetic approaches to parabens molecularly imprinted polymers and their applications to the solid-phase extraction of river water samples. *Analytica Chimica Acta* **677**, 72-78.
- Benijts, T., Dams, R., Lambert, W., and De Leenheer, A. (2004). Countering matrix effects in environmental liquid chromatography- electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *Journal of Chromatography A* **1029**, 153-159.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., and Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. *Environmental Science & Technology* **43**, 597-603.
- Bester, K. (2005). Polycyclic musks in the Ruhr catchment area-transport, discharges of waste water, and transformations of HHCb, AHTN and HHCb-lactone. *Journal of Environmental Monitoring* **7**, 43-51.
- Bester, K. (2009). Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A* **1216**, 470-480.
- Bester, K., Hüffmeyer, N., Schaub, E., and Klasmeier, J. (2008). Surface water concentrations of the fragrance compound OTNE in Germany – A comparison between data from measurements and models. *Chemosphere* **73**, 1366-1372.
- Bielicka-Daszkiwicz, K., and Voelkel, A. (2009). Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. *Talanta* **80**, 614-621.
- Brausch, J. M., and Rand, G. M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* **82**, 1518-1532.
- Breton, F., Euzet, P., Piletsky, S. A., Giardi, M. T., and Rouillon, R. (2006). Integration of photosynthetic biosensor with molecularly imprinted polymer-based solid phase extraction cartridge. *Analytica Chimica Acta* **569**, 50-57.
- Byun, H.-S., Youn, Y.-N., Yun, Y.-H., and Yoon, S.-D. (2010). Selective separation of aspirin using molecularly imprinted polymers. *Separation and Purification Technology* **74**, 144-153.
- Cabeza, Y., Candela, L., Ronen, D., and Teijon, G. (2012). Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). *Journal of Hazardous Materials* **239-240**, 32-39.
- Cacho, C., Turiel, E., Martín-Esteban, A., Ayala, D., and Pérez-Conde, C. (2006). Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. *Journal of Chromatography A* **1114**, 255-262.
- Castro López, M. d. M., Cela Pérez, M. C., Dopico García, M. S., López Vilariño, J. M., González Rodríguez, M. V., and Barral Losada, L. F. (2012). Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins. *Analytica Chimica Acta* **721**, 68-78.
- Cayot, N., Lafarge, C., Bou-Maroun, E., and Cayot, P. (2016). Substitution of carcinogenic solvent dichloromethane for the extraction of volatile compounds in a fat-free model food system. *Journal of Chromatography A* **1456**, 77-88.
- Cela-Pérez, M. C., Lasagabáster-Latorre, A., Abad-López, M. J., López-Vilariño, J. M., and González-Rodríguez, M. V. (2013). A study of competitive molecular interaction effects on imprinting of molecularly imprinted polymers. *Vibrational Spectroscopy* **65**, 74-83.
- Chalew, T. E. A., and Halden, R. U. (2009). Environmental Exposure of Aquatic and Terrestrial Biota to Triclosan and Triclocarban. *Journal of the American Water Resources Association* **45**, 4-13.

- Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., Lu, Z., and Mazzeo, J. R. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **852**, 22-34.
- Chapuis, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, B., and Hennion, M. C. (2004). Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers: Application to the extraction of triazines from complex matrices. *Journal of Chromatography B* **804**, 93-101.
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., and Li, J. (2016). Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews* **45**, 2137-2211.
- Chen, L., Xu, S., and Li, J. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews* **40**, 2922-2942.
- Cheong, W. J., Ali, F., Choi, J. H., Lee, J. O., and Yune Sung, K. (2013). Recent applications of molecular imprinted polymers for enantio-selective recognition. *Talanta* **106**, 45-59.
- Cormack, P. A. G., and Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B* **804**, 173-182.
- Dai, C.-M., Zhang, J., Zhang, Y.-L., Zhou, X.-F., Duan, Y.-P., and Liu, S.-G. (2012). Selective removal of acidic pharmaceuticals from contaminated lake water using multi-templates molecularly imprinted polymer. *Chemical Engineering Journal* **211-212**, 302-309.
- Dai, C., Zhang, J., Zhang, Y., Zhou, X., and Liu, S. (2013). Application of Molecularly Imprinted Polymers to Selective Removal of Clofibrilic Acid from Water. *PLOS ONE* **8**, e78167.
- Demirbas, E., Dizge, N., Sulak, M. T., and Kobya, M. (2009). Adsorption kinetics and equilibrium of copper from aqueous solutions using hazelnut shell activated carbon. *Chemical Engineering Journal* **148**, 480-487.
- Díaz-Bao, M., Barreiro, R., Regal, P., Cepeda, A., and Fente, C. (2012). Evaluation of Molecularly Imprinted Polymers for the Simultaneous SPE of Six Corticosteroids in Milk. *Chromatographia* **75**, 223-231.
- Díaz-Cruz, M. S., and Barceló, D. (2009). Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 708-717.
- Díaz-García, M. E., and Laíño, R. B. (2005). Molecular Imprinting in Sol-Gel Materials: Recent Developments and Applications. *Microchimica Acta* **149**, 19-36.
- Dickey, F. H. (1949). The Preparation of Specific Adsorbents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **35**, 227-229.
- Dima, S.-O., Dobre, T., Chetaru, O., Nicolae, C.-A., Spataru, C.-I., and Sarbu, A. (2014). Molecularly imprinted poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) matrix with sclareol. *Polymer Engineering & Science* **54**, 1484-1494.
- Dsikowitzky, L., Schwarzbauer, J., Kronimus, A., and Littke, R. (2004). The anthropogenic contribution to the organic load of the Lippe River (Germany). Part I: qualitative characterisation of low-molecular weight organic compounds. *Chemosphere* **57**, 1275-1288.
- Dsikowitzky, L., Schwarzbauer, J., and Littke, R. (2002). Distribution of polycyclic musks in water and particulate matter of the Lippe River (Germany). *Organic Geochemistry* **33**, 1747-1758.
- ECHA (2008). "European Union Risk Assessment Report(1,3,4,6,7,8-HEXAHYDRO-4,6,6,7,8,8-HEXAMETHYLIN-DENO[5,6-C] PYRAN-HHCB)," Luxembourg.
- Eh, M. (2004). New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musk Odorants. *Chemistry & Biodiversity* **1**, 1975-1984.

- Ellwanger, A., Berggren, C., Bayouduh, S., Crecenzi, C., Karlsson, L., Owens, P. K., Ensing, K., Cormack, P., Sherrington, D., and Selligren, B. (2001). Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers. *Analyst* **126**, 784-792.
- Figueiredo, L., Santos, L., and Alves, A. (2015). Synthesis of a Molecularly Imprinted Polymer for Melamine Analysis in Milk by HPLC with Diode Array Detection. *Advances in Polymer Technology* **34**, n/a-n/a.
- Flores, A., Cunliffe, D., Whitcombe, M. J., and Vulfson, E. N. (2000). Imprinted polymers prepared by aqueous suspension polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **77**, 1841-1850.
- Folch-Cano, C., Yazdani-Pedram, M., and Olea-Azar, C. (2014). Inclusion and Functionalization of Polymers with Cyclodextrins: Current Applications and Future Prospects. *Molecules* **19**, 14066.
- Fooker, C. (2004). Synthetic Musks in Suspended Particulate Matter (SPM), Sediment, and Sewage Sludge. In "Series Anthropogenic Compounds: Synthetic Musk Fragrances in the Environment" (G. G. Rimkus, ed.), pp. 29-47. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Foran, C. M., Bennett, E. R., and Benson, W. H. (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research* **50**, 153-156.
- Ford, R. A., Hawkins, D. R., Schwarzenbach, R., and Api, A. M. (1999). The systemic exposure to the polycyclic musks, AHTN and HHCb, under conditions of use as fragrance ingredients: evidence of lack of complete absorption from a skin reservoir. *Toxicology Letters* **111**, 133-142.
- Fromme, H., Lahrz, T., Piloty, M., Gebhart, H., Oddoy, A., and Rüdén, H. (2004). Occurrence of phthalates and musk fragrances in indoor air and dust from apartments and kindergartens in Berlin (Germany). *Indoor Air* **14**, 188-195.
- Fromme, H., Otto, T., and Pilz, K. (2001). Polycyclic musk fragrances in fish samples from Berlin waterways, Germany. *Food Additives and Contaminants* **18**, 937-944.
- Gao, D., Zhang, Z., Wu, M., Xie, C., Guan, G., and Wang, D. (2007). A Surface Functional Monomer-Directing Strategy for Highly Dense Imprinting of TNT at Surface of Silica Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 7859-7866.
- Gao, R., Kong, X., Su, F., He, X., Chen, L., and Zhang, Y. (2010). Synthesis and evaluation of molecularly imprinted core-shell carbon nanotubes for the determination of triclosan in environmental water samples. *Journal of Chromatography A* **1217**, 8095-8102.
- García-Calzón, J. A., and Díaz-García, M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **123**, 1180-1194.
- García-Jares, C., Llompert, M. a., Polo, M. a., Salgado, C., Macías, S., and Cela, R. (2002). Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water. *Journal of Chromatography A* **963**, 277-285.
- Gatermann, R., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Rimkus, G. G., Hecker, M., and Karbe, L. (2002). Synthetic musks in the environment. Part 1: Species-dependent bioaccumulation of polycyclic and nitro musk fragrances in freshwater fish and mussels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **42**, 437-446.
- Gatermann, R., Hellou, J., Hühnerfuss, H., Rimkus, G., and Zitko, V. (1999). Polycyclic and nitro musks in the environment: A comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere* **38**, 3431-3441.
- Ge, Y., and Turner, A. P. F. (2008). Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting. *Trends in Biotechnology* **26**, 218-224.

- Gholivand, M. B., Shamsipur, M., Dehdashtian, S., and Rajabi, H. R. (2014). Development of a selective and sensitive voltammetric sensor for propylparaben based on a nanosized molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Materials Science and Engineering: C* **36**, 102-107.
- Golden, R., Gandy, J., and Vollmer, G. (2005). A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Critical Reviews In Toxicology* **35**, 435-458.
- Gómez, M. J., Gómez-Ramos, M. M., Agüera, A., Mezcua, M., Herrera, S., and Fernández-Alba, A. R. (2009). A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4071-4082.
- Greig, S. J., and Sing, K. S. W. (1982). "Adsorption, Surface Area and Porosity," 2nd /Ed.
- Group, E. C. W., Ellison, S. L. R., Williams, A., Eurachem, and Chemistry, C.-o. o. I. T. i. A. (2000). "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement," LGC (Teddington) Limited.
- Gu, X., He, H., Wang, C.-Z., Gao, Y., Zhang, H., Hong, J., Du, S., Chen, L., and Yuan, C.-S. (2015). Synthesis of surface nano-molecularly imprinted polymers for sensitive baicalin detection from biological samples. *RSC advances* **5**, 41377-41384.
- Guiochon, G. (2007). Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1168**, 101-168.
- Hart, B. R., and Shea, K. J. (2001). Synthetic Peptide Receptors: Molecularly Imprinted Polymers for the Recognition of Peptides Using Peptide-Metal Interactions. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 2072-2073.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., and Liu, F. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 133-150.
- He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., and Liu, F. (2008). Molecularly imprinted silica prepared with immiscible ionic liquid as solvent and porogen for selective recognition of testosterone. *Talanta* **74**, 1126-1131.
- He, J., Chen, S., Jiang, Y., Shen, Y., Zhu, J., Wei, H., Zhang, H., and Lu, K. (2012). Preparation and selective recognition of a novel solid-phase microextraction fiber combined with molecularly imprinted polymers for the extraction of parabens in soy sample. *Journal of Separation Science* **35**, 308-314.
- He, J., Shen, Y., Chen, S., Wei, H., Zhu, J., You, L., and Lu, K. (2011). Preparation and evaluation of molecularly imprinted microspheres for solid-phase extraction of 1,4-hydroxybenzoic acid esters in soy. *Journal of Separation Science* **34**, 2739-2744.
- Heberer, T., Gramer, S., and Stan, H. J. (1999). Occurrence and Distribution of Organic Contaminants in the Aquatic System in Berlin. Part III: Determination of Synthetic Musks in Berlin Surface Water Applying Solid-phase Microextraction (SPME) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **27**, 150-156.
- Ho, Y. S., and McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry* **34**, 451-465.
- Homem, V., Silva, J. A., Ratola, N., Santos, L., and Alves, A. (2015). Long lasting perfume – A review of synthetic musks in WWTPs. *Journal of Environmental Management* **149**, 168-192.
- Horii, Y., and Kannan, K. (2008). Survey of organosilicone compounds, including cyclic and linear siloxanes, in personal-care and household products. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **55**, 701-710.
- Hu, L. Y., and Orwoll, R. A. (2010). Molecular Imprinting by 4-Hydroxybenzoic Acid: A Two-Site Model. *Separation Science and Technology* **45**, 2337-2344.

- Hu, S.-G., Li, L., and He, X.-W. (2005). Comparison of trimethoprim molecularly imprinted polymers in bulk and in sphere as the sorbent for solid-phase extraction and extraction of trimethoprim from human urine and pharmaceutical tablet and their determination by high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **537**, 215-222.
- Huang, X., and Li, S. (2008). Rationally Designing Molecularly Imprinted Polymers Toward a Highly Specific Recognition by Using a Stoichiometric Molecular Self-assembly. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **18**, 277-283.
- Huang, Y.-P., Liu, Z.-S., Zheng, C., and Gao, R.-Y. (2009). Recent developments of molecularly imprinted polymer in CEC. *ELECTROPHORESIS* **30**, 155-162.
- Hulanicki, A., Glab, S., and Ingman, F. (1991). Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **63**, 1247-1250.
- Hutter, H. P., Wallner, P., Moshhammer, H., Hartl, W., Sattelberger, R., Lorbeer, G., and Kundi, M. (2009). Synthetic musks in blood of healthy young adults: Relationship to cosmetics use. *Science of the Total Environment* **407**, 4821-4825.
- Jiménez-Díaz, I., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., and Navalón, A. (2014). Analytical methods for the determination of personal care products in human samples: An overview. *Talanta* **129**, 448-458.
- Kandimalla, V., and Ju, H. (2004a). Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **380**, 587-605.
- Kandimalla, V. B., and Ju, H. (2004b). Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **380**, 587-605.
- Kang, C. S., Lee, J.-H., Kim, S.-K., Lee, K.-T., Lee, J. S., Park, P. S., Yun, S. H., Kannan, K., Yoo, Y. W., Ha, J. Y., and Lee, S. W. (2010). Polybrominated diphenyl ethers and synthetic musks in umbilical cord Serum, maternal serum, and breast milk from Seoul, South Korea. *Chemosphere* **80**, 116-122.
- Kannan, K., Reiner, J. L., Se, H. Y., Perrotta, E. E., Tao, L., Johnson-Restrepo, B., and Rodan, B. D. (2005). Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere* **61**, 693-700.
- Karasová, G., Lehotay, J., Sádecká, J., Skačáni, I., and Lachová, M. (2005). Selective extraction of derivates of p-hydroxy-benzoic acid from plant material by using a molecularly imprinted polymer. *Journal of Separation Science* **28**, 2468-2476.
- Kawaguchi, M., Hayatsu, Y., Nakata, H., Ishii, Y., Ito, R., Saito, K., and Nakazawa, H. (2005). Molecularly imprinted solid phase extraction using stable isotope labeled compounds as template and liquid chromatography-mass spectrometry for trace analysis of bisphenol A in water sample. *Analytica Chimica Acta* **539**, 83-89.
- Kempe, H., and Kempe, M. (2004). Novel Method for the Synthesis of Molecularly Imprinted Polymer Bead Libraries. *Macromolecular Rapid Communications* **25**, 315-320.
- Kmellár, B., Fodor, P., Pareja, L., Ferrer, C., Martínez-Uroz, M. A., Valverde, A., and Fernandez-Alba, A. R. (2008). Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1215**, 37-50.
- Koster, E. H. M., Crescenzi, C., den Hoedt, W., Ensing, K., and de Jong, G. J. (2001). Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry* **73**, 3140-3145.
- Krueve, A., Leito, I., and Herodes, K. (2009). Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica Acta* **651**, 75-80.

- Kueseng, P., Noir, M. L., Mattiasson, B., Thavarungkul, P., and Kanatharana, P. (2009). Molecularly imprinted polymer for analysis of trace atrazine herbicide in water. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **44**, 772-780.
- Kunz, P. Y., and Fent, K. (2006). Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* **79**, 305-324.
- Kwon, J.-W., and Rodriguez, J. M. (2014). Occurrence and Removal of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products in Three Wastewater-Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **66**, 538-548.
- Lai, J.-P., Cao, X.-F., Wang, X.-L., and He, X.-W. (2002). Chromatographic characterization of molecularly imprinted microspheres for the separation and determination of trimethoprim in aqueous buffers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **372**, 391-396.
- Lai, J.-P., Lu, X.-Y., Lu, C.-Y., Ju, H.-F., and He, X.-W. (2001). Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymeric microspheres by aqueous suspension polymerization for use as a high-performance liquid chromatography stationary phase. *Analytica Chimica Acta* **442**, 105-111.
- Lai, J.-P., Niessner, R., and Knopp, D. (2004). Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples. *Analytica Chimica Acta* **522**, 137-144.
- Lee, I., Gopalan, A.-I., and Lee, K.-P. (2016). Enantioselective Determination of Polycyclic Musks in River and Wastewater by GC/MS/MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **13**, 349.
- Lee, I. S., Lee, S. H., and Oh, J. E. (2010). Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Research* **44**, 214-222.
- Legido-Quigley, C., Oxelbark, J., De Lorenzi, E., Zurutuza-Elorza, A., and Cormack, P. A. G. (2007). Chromatographic characterisation, under highly aqueous conditions, of a molecularly imprinted polymer binding the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Analytica Chimica Acta* **591**, 22-28.
- Li, H., Guan, H., Dai, H., Tong, Y., Zhao, X., Qi, W., Majeed, S., and Xu, G. (2012). An amperometric sensor for the determination of benzophenone in food packaging materials based on the electropolymerized molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine film. *Talanta* **99**, 811-815.
- Li, P., Wang, T., Lei, F., Tang, P., Tan, X., Liu, Z., and Shen, L. (2014). Rosin-based molecularly imprinted polymers as the stationary phase in high-performance liquid chromatography for selective separation of berberine hydrochloride. *Polymer International* **63**, 1699-1706.
- Li, Y., Yin, X.-F., Chen, F.-R., Yang, H.-H., Zhuang, Z.-X., and Wang, X.-R. (2006). Synthesis of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanowires Using a Nanoporous Alumina Template. *Macromolecules* **39**, 4497-4499.
- Liang, R., Kou, L., Chen, Z., and Qin, W. (2013). Molecularly imprinted nanoparticles based potentiometric sensor with a nanomolar detection limit. *Sensors and Actuators B: Chemical* **188**, 972-977.
- Liu, H., Huang, L., Chen, Y., Guo, L., Li, L., Zhou, H., and Luan, T. (2015). Simultaneous determination of polycyclic musks in blood and urine by solid supported liquid-liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **992**, 96-102.
- Liu, H., Liu, C., Yang, X., Zeng, S., Xiong, Y., and Xu, W. (2008). Uniformly sized β -cyclodextrin molecularly imprinted microspheres prepared by a novel surface imprinting technique for ursolic acid. *Analytica Chimica Acta* **628**, 87-94.

- Liu, X., and Lei, J. (2012). Combinatorial synthesis and screening of uniform molecularly imprinted microspheres for chloramphenicol using microfluidic device. *Polymer Engineering & Science* **52**, 2099-2105.
- Liu, Y., Song, Q.-J., and Wang, L. (2009). Development and characterization of an amperometric sensor for triclosan detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. *Microchemical Journal* **91**, 222-226.
- Lofgreen, J. E., and Ozin, G. A. (2014). Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol-gel silica. *Chemical Society Reviews* **43**, 911-933.
- Lopez-Nogueroles, M., Lordel-Madeleine, S., Chisvert, A., Salvador, A., and Pichon, V. (2013a). Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent. *Talanta* **110**, 128-34.
- Lopez-Nogueroles, M., Lordel-Madeleine, S., Chisvert, A., Salvador, A., and Pichon, V. (2013b). Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent. *Talanta* **110**, 128-134.
- Lorenzo, M. Á., Sánchez Arribas, A., Moreno, M., Bermejo, E., Chicharro, M., and Zapardiel, A. (2013). Determination of butylparaben by adsorptive stripping voltammetry at glassy carbon electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes. *Microchemical Journal* **110**, 510-516.
- Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Alvarez-Lorenzo, C., and Concheiro, A. (2011). To Remove or Not to Remove? The Challenge of Extracting the Template to Make the Cavities Available in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 4327-4347.
- Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A., and Thommes, M. (2004). "Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density," 1/Ed. Springer Netherlands.
- Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M., and Torrents, A. (2010). Fate of triclosan in agricultural soils after biosolid applications. *Chemosphere* **78**, 760-766.
- Lu, Y., Yuan, T., Wang, W., and Kannan, K. (2011). Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China. *Environmental Pollution* **159**, 3522-3528.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., and Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* **473-474**, 619-641.
- Lv, Y., Lin, Z., Feng, W., Zhou, X., and Tan, T. (2007). Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers. *Biochemical Engineering Journal* **36**, 221-229.
- Lv, Y., Yuan, T., Hu, J., and Wang, W. (2009). Simultaneous Determination of Trace Polycyclic and Nitro Musks in Water Samples Using Optimized Solid-Phase Extraction by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* **25**, 1125-1130.
- Macherius, A., Eggen, T., Lorenz, W. G., Reemtsma, T., Winkler, U., and Moeder, M. (2012). Uptake of Galaxolide, Tonalide, and Triclosan by Carrot, Barley, and Meadow Fescue Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 7785-7791.
- Manesiotis, P., Borrelli, C., Aureliano, C. S. A., Svensson, C., and Sellergren, B. (2009). Water-compatible imprinted polymers for selective depletion of riboflavine from beverages. *Journal of Materials Chemistry* **19**, 6185-6193.
- Matamoros, V., Jover, E., and Bayona, J. M. (2010). Part-per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by Solid-Phase Extraction Followed

- by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **82**, 699-706.
- Matsui, J., Fujiwara, K., Ugata, S., and Takeuchi, T. (2000). Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent. *Journal of Chromatography A* **889**, 25-31.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., and Chavez-Eng, C. M. (1998). Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations. *Analytical Chemistry* **70**, 882-889.
- Mayes, A. G., and Mosbach, K. (1996). Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. *Analytical Chemistry* **68**, 3769-3774.
- Meng, M., Wang, Z., Ma, L., Zhang, M., Wang, J., Dai, X., and Yan, Y. (2012). Selective Adsorption of Methylparaben by Submicrosized Molecularly Imprinted Polymer: Batch and Dynamic Flow Mode Studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **51**, 14915-14924.
- Michailof, C., Manesiotis, P., and Panayiotou, C. (2008). Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters. *Journal of Chromatography A* **1182**, 25-33.
- Miller, J. N., and Miller, J. C. (2000). "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry."
- Müller, S., Schmid, P., and Schlatter, C. (1996). Occurrence of nitro and non-nitro benzenoid musk compounds in human adipose tissue. *Chemosphere* **33**, 17-28.
- Murray, A., and Örmeci, B. (2012). Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review. *Environmental Science and Pollution Research* **19**, 3820-3830.
- Murray, A., Örmeci, B., and Lai, E. P. C. (2011). Removal of 17 β -estradiol (E2) and its chlorination by-products from water and wastewater using non-imprinted polymer (NIP) particles. *Water Science and Technology* **64**, 1291-1297.
- Nakamura, Y., Matsunaga, H., and Haginaka, J. (2016). Preparation of molecularly imprinted polymers for strychnine by precipitation polymerization and multistep swelling and polymerization and their application for the selective extraction of strychnine from nux-vomica extract powder. *Journal of Separation Science* **39**, 1542-1550.
- Nakata, H., Shinohara, R.-I., Nakazawa, Y., Isobe, T., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Tanabe, S., Zakaria, M. P., Zheng, G. J., Lam, P. K. S., Kim, E. Y., Min, B.-Y., We, S.-U., Viet, P. H., Tana, T. S., Prudente, M., Frank, D., Lauenstein, G., and Kannan, K. (2012). Asia-Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 2211-2218.
- Nicholls, I. A., Adbo, K., Andersson, H. S., Andersson, P. O., Ankarloo, J., Hedin-Dahlström, J., Jokela, P., Karlsson, J. G., Olofsson, L., Rosengren, J., Shoravi, S., Svenson, J., and Wikman, S. (2001). Can we rationally design molecularly imprinted polymers? *Analytica Chimica Acta* **435**, 9-18.
- Núñez, L., Turiel, E., Martín-Esteban, A., and Tadeo, J. L. (2010). Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Talanta* **80**, 1782-1788.
- Omidi, F., Behbahani, M., Sadeghi Abandansari, H., Sedighi, A., and Shahtaheri, S. J. (2014). Application of molecular imprinted polymer nanoparticles as a selective solid phase extraction for preconcentration and trace determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the human urine and different water samples. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* **12**, 137.

- Osemwengie, L. I., and Gerstenberger, S. L. (2004). Levels of synthetic musk compounds in municipal wastewater for potential estimation of biota exposure in receiving waters. *Journal of Environmental Monitoring* **6**, 533-539.
- Osmani, Q., Hughes, H., and McLoughlin, P. (2012). Probing the recognition of molecularly imprinted polymer beads. *Journal of Materials Science* **47**, 2218-2227.
- Ousalem, M., Zhu, X. X., and Hradil, J. (2000). Evaluation of the porous structures of new polymer packing materials by inverse size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* **903**, 13-19.
- Pan, J., Zou, X., Wang, X., Guan, W., Yan, Y., and Han, J. (2010). Selective recognition of 2,4-dichlorophenol from aqueous solution by uniformly sized molecularly imprinted microspheres with β -cyclodextrin/attapulgite composites as support. *Chemical Engineering Journal* **162**, 910-918.
- Panagiotou, A. N., Sakkas, V. A., and Albanis, T. A. (2009). Application of chemometric assisted dispersive liquid-liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters. *Analytica Chimica Acta* **649**, 135-140.
- Park, H. R., Yoon, S. D., Bang, E. Y., Rogers, K. R., and Chough, S. H. (2005). Molecular imprinting polymers for the separation of toluic acid isomers. *Journal of Applied Polymer Science* **96**, 650-654.
- Pastorelli, S., Sanches-Silva, A., Cruz, J. M., Simoneau, C., and Losada, P. P. (2008). Study of the migration of benzophenone from printed paperboard packages to cakes through different plastic films. *European Food Research and Technology* **227**, 1585-1590.
- Peck, A. M., and Hornbuckle, K. C. (2004). Synthetic Musk Fragrances in Lake Michigan. *Environmental Science & Technology* **38**, 367-372.
- Peck, A. M., and Hornbuckle, K. C. (2006). Synthetic musk fragrances in urban and rural air of Iowa and the Great Lakes. *Atmospheric Environment* **40**, 6101-6111.
- Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R. M., and Pocurull, E. (2011). Analytical methods for personal-care products in environmental waters. *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 749-760.
- Peng-Ju, W., Jun, Y., Qing-De, S., Yun, G., Xiao-Lan, Z., and Ji-Bao, C. (2007). Rapid Removal of Template from Molecularly Imprinted Polymers by Accelerated Solvent Extraction. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **35**, 484-488.
- Pérez-Moral, N., and Mayes, A. G. (2004). Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Analytica Chimica Acta* **504**, 15-21.
- Pernites, R., Ponnappati, R., Felipe, M. J., and Advincula, R. (2011). Electropolymerization molecularly imprinted polymer (E-MIP) SPR sensing of drug molecules: Pre-polymerization complexed terthiophene and carbazole electroactive monomers. *Biosensors and Bioelectronics* **26**, 2766-2771.
- Pichon, V., and Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. *Analytica Chimica Acta* **622**, 48-61.
- Pichon, V., and Haupt, K. (2006). Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **29**, 989-1023.
- Pickthall, J. (1960). The Musk Odour. *Journal of the Society of Cosmetic Chemist*, 423-436.
- Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., and Namieśnik, J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trends in Analytical Chemistry* **73**, 19-38.
- Polyakov, M. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhurnal Fizieskoj Khimii* **2**, 799-805.

- Posada-Ureta, O., Olivares, M., Navarro, P., Vallejo, A., Zuloaga, O., and Etxebarria, N. (2012). Membrane assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of synthetic musks in environmental water samples. *Journal of Chromatography A* **1227**, 38-47.
- Prieto, A., Schrader, S., Bauer, C., and Möder, M. (2011). Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. *Analytica Chimica Acta* **685**, 146-152.
- Puoci, F., Iemma, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O. I., Spizzirri, U. G., and Picci, N. (2009). New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. *European Polymer Journal* **45**, 1634-1640.
- Ramírez, N., Marcé, R. M., and Borrull, F. (2011). Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry method for determining synthetic musks in water samples. *Journal of Chromatography A* **1218**, 156-161.
- Ramström, O., Ye, L., and Mosbach, K. (1996). Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting. *Chemistry & Biology* **3**, 471-477.
- Raof, S., Mohamad, S., and Abas, M. (2013). Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinted Silica Gel for 2-Hydroxybenzoic Acid in Aqueous Solution. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 5952.
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J. C., and Cela, R. (2008). Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A* **1190**, 27-38.
- Regueiro, J., Llompart, M., Psillakis, E., Garcia-Monteagudo, J. C., and Garcia-Jares, C. (2009). Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of phenolic preservatives in water. *Talanta* **79**, 1387-1397.
- Reiner, J. L., Wong, C. M., Arcaro, K. F., and Kannan, K. (2007). Synthetic Musk Fragrances in Human Milk from the United States. *Environmental Science & Technology* **41**, 3815-3820.
- Ricking, M., Schwarzbauer, J., Hellou, J., Svenson, A., and Zitko, V. (2003). Polycyclic aromatic musk compounds in sewage treatment plant effluents of Canada and Sweden--first results. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 410-417.
- Rimkus, G. G. (1999). Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters* **111**, 37-56.
- Rimkus, G. G. (2004). "Synthetic Musk Fragrances in the Environment," Springer Berlin Heidelberg.
- Roche, P. J. R., Ng, S. M., Narayanaswamy, R., Goddard, N., and Page, K. M. (2009). Multiple surface plasmon resonance quantification of dextromethorphan using a molecularly imprinted β -cyclodextrin polymer: A potential probe for drug-drug interactions. *Sensors and Actuators B: Chemical* **139**, 22-29.
- Rodil, R., Quintana, J. B., López-Manía, P., Muniategui-Lorenzo, S., and Prada-Rodríguez, D. (2008). Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**, 1307-1315.
- Roosens, L., Covaci, A., and Neels, H. (2007). Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application. *Chemosphere* **69**, 1540-1547.
- Rosengren, A., Karlsson, B., and Nicholls, I. (2013). Consequences of Morphology on Molecularly Imprinted Polymer-Ligand Recognition. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 1207.
- S., L., and B.K., S. (1898). About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* **24**, 1-39.

- Sang, W. J., Zhou, X., and Zhang, Y. (2009). Optimization of Solid Phase Extraction (SPE) for the Determination of Synthetic Musks in Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). In "2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering", pp. 1-4.
- Sasaki, S., Ooya, T., and Takeuchi, T. (2010). Highly selective bisphenol A-imprinted polymers prepared by atom transfer radical polymerization. *Polymer Chemistry* **1**, 1684-1688.
- Sawyer, L., Grubb, D., and Meyers, G. F. (2008). "Polymer Microscopy," 3/Ed. Springer-Verlag New York.
- Schiavone, A., Kannan, K., Horii, Y., Focardi, S., and Corsolini, S. (2010). Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated naphthalenes and polycyclic musks in human fat from Italy: Comparison to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. *Environmental Pollution* **158**, 599-606.
- Schreurs, R. H. M. M., Quaedackers, M. E., Seinen, W., and van der Burg, B. (2002). Transcriptional Activation of Estrogen Receptor ER α and ER β by Polycyclic Musks Is Cell Type Dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology* **183**, 1-9.
- Schreurs, R. H. M. M., Sonneveld, E., Jansen, J. H. J., Seinen, W., and van der Burg, B. (2005). Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences* **83**, 264-272.
- Schüssler, W., and Nitschke, L. (1998). Determination of trace amounts of Galaxolide® (HHCB) by HPLC. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **361**, 220-221.
- Seaton, N. A., Walton, J. P. R. B., and Quirk, N. (1989). A new analysis method for the determination of the pore size distribution of porous carbons from nitrogen adsorption measurements. *Carbon* **27**, 853-861.
- Sellergren, B. (2000). "Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry," Elsevier Science.
- Shi, S., Guo, J., You, Q., Chen, X., and Zhang, Y. (2014a). Selective and simultaneous extraction and determination of hydroxybenzoic acids in aqueous solution by magnetic molecularly imprinted polymers. *Chemical Engineering Journal* **243**, 485-493.
- Shi, S., Guo, J., You, Q., Chen, X., and Zhang, Y. (2014b). Selective and simultaneous extraction and determination of hydroxybenzoic acids in aqueous solution by magnetic molecularly imprinted polymers. *Chemical Engineering Journal* **243**, 485-493.
- Simonich, S. L. (2005). Fragrance Materials in Wastewater Treatment. In "Water Pollution: Emerging Organic Pollution in Waste Waters and Sludge, Vol. 2" (D. Barceló, ed.), pp. 79-118. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Simonich, S. L., Begley, W. M., Debaere, G., and Eckhoff, W. S. (2000). Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater. *Environmental Science & Technology* **34**, 959-965.
- Sing, K. S. W. (1985). Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). In "Pure and Applied Chemistry", Vol. 57, pp. 603.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., and Pillonel, L. (2002). Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environmental Science & Technology* **36**, 4998-5004.
- Singh, M., Tarannum, N., and Kumar, A. (2014). Selective recognition of fenbufen by surface-imprinted silica with iniferter technique. *Journal of Porous Materials* **21**, 677-684.

- Slanina, P. (2004). Risk Evaluation of Dietary and Dermal Exposure to Musk Fragrances. In "Series Anthropogenic Compounds: Synthetic Musk Fragrances in the Environment" (G. G. Rimkus, ed.), pp. 281-310. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Smeraglia, J., Baldrey, S. F., and Watson, D. (2002). Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia* **55**, S95-S99.
- Soares, C. M. F., Zanin, G. M., de Moraes, F. F., Santos, O. A. A. d., and de Castro, H. F. (2007). Molecular imprinting of β -cyclodextrin/cholesterol template into a silica polymer for cholesterol separation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **57**, 79-82.
- Sommer, C. (2004). The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry. In "Series Anthropogenic Compounds" (G. Rimkus, ed.), Vol. 3X, pp. 1-16. Springer Berlin Heidelberg.
- Song, X., Li, J., Wang, J., and Chen, L. (2009a). Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction. *Talanta* **80**, 694-702.
- Song, X., Wang, J., and Zhu, J. (2009b). Effect of porogenic solvent on selective performance of molecularly imprinted polymer for quercetin. *Materials Research* **12**, 299-304.
- Sparham, C., Van Egmond, R., O'Connor, S., Hastie, C., Whelan, M., Kanda, R., and Franklin, O. (2008). Determination of decamethylcyclopentasiloxane in river water and final effluent by headspace gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1212**, 124-129.
- Spivak, D., Gilmore, M. A., and Shea, K. J. (1997). Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 4388-4393.
- Spivak, D. A. (2005). Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, 1779-1794.
- Standley, L. J., Kaplan, L. A., and Smith, D. (2000). Molecular Tracers of Organic Matter Sources to Surface Water Resources. *Environmental Science & Technology* **34**, 3124-3130.
- Suedee, R., Seechamnaturakit, V., Canyuk, B., Ovatlarnporn, C., and Martin, G. P. (2006). Temperature sensitive dopamine-imprinted (N,N-methylene-bis-acrylamide cross-linked) polymer and its potential application to the selective extraction of adrenergic drugs from urine. *Journal of Chromatography A* **1114**, 239-249.
- Sulitzky, C., Rückert, B., Hall, A. J., Lanza, F., Unger, K., and Sellergren, B. (2002). Grafting of Molecularly Imprinted Polymer Films on Silica Supports Containing Surface-Bound Free Radical Initiators. *Macromolecules* **35**, 79-91.
- Sun, B. W., Li, Y. Z., and Chang, W. B. (2001). Molecularly imprinted polymer using-p-hydroxybenzoic acid, p-hydroxyphenylacetic acid and p-hydroxyphenylpropionic acid as templates. *Journal of Molecular Recognition* **14**, 388-392.
- Sun, P., Casteel, K., Dai, H., Wehmeyer, K. R., Kiel, B., and Federle, T. (2014). Distributions of polycyclic musk fragrance in wastewater treatment plant (WWTP) effluents and sludges in the United States. *Science of The Total Environment* **493**, 1073-1078.
- Surikumar, H., Mohamad, S., and Sari, N. (2014a). Molecular Imprinted Polymer of Methacrylic Acid Functionalised β -Cyclodextrin for Selective Removal of 2,4-Dichlorophenol. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 6111.
- Surikumar, H., Mohamad, S., and Sari, N. M. (2014b). Molecular imprinted polymer of methacrylic acid functionalised beta-cyclodextrin for selective removal of 2,4-dichlorophenol. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 6111-36.

- Suryanarayanan, V., Wu, C.-T., and Ho, K.-C. (2010). Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors. *Electroanalysis* **22**, 1795-1811.
- Syu, M.-J., Nian, Y.-M., Chang, Y.-S., Lin, X.-Z., Shiesh, S.-C., and Chou, T.-C. (2006). Ionic effect on the binding of bilirubin to the imprinted poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethylacrylate). *Journal of Chromatography A* **1122**, 54-62.
- Tamayo, F. G., Turiel, E., and Martín-Esteban, A. (2007). Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A* **1152**, 32-40.
- Tan, C. J., Chua, H. G., Ker, K. H., and Tong, Y. W. (2008). Preparation of Bovine Serum Albumin Surface-Imprinted Submicrometer Particles with Magnetic Susceptibility through Core-Shell Miniemulsion Polymerization. *Analytical Chemistry* **80**, 683-692.
- Tan, C. J., and Tong, Y. W. (2007). Preparation of Superparamagnetic Ribonuclease A Surface-Imprinted Submicrometer Particles for Protein Recognition in Aqueous Media. *Analytical Chemistry* **79**, 299-306.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D., Metcalf, and Eddy, I. (2003). "Wastewater Engineering: Treatment and Reuse," McGraw-Hill Education.
- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Díaz, A., and Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment* **408**, 3584-3595.
- Ternes, T., and Joss, A. (2007). "Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances," IWA Publishing.
- Titirici, M.-M., and Sellergren, B. (2006). Thin Molecularly Imprinted Polymer Films via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization. *Chemistry of Materials* **18**, 1773-1779.
- Trabalón, L., Cano-Sancho, G., Pocurull, E., Nadal, M., Domingo, J. L., and Borrull, F. (2015). Exposure of the population of Catalonia (Spain) to musk fragrances through seafood consumption: Risk assessment. *Environmental Research* **143, Part B**, 116-122.
- Turiel, E., and Martín-Esteban, A. (2004). Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**, 1876-1886.
- Umpleby Ii, R. J., Baxter, S. C., Bode, M., Berch Jr, J. K., Shah, R. N., and Shimizu, K. D. (2001). Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* **435**, 35-42.
- Umpleby Ii, R. J., Baxter, S. C., Rampey, A. M., Rushton, G. T., Chen, Y., and Shimizu, K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B* **804**, 141-149.
- Umpleby Ii, R. J., Bode, M., and Shimizu, K. D. (2000). Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Analyst* **125**, 1261-1265.
- Usyskin, A., Bukhanovsky, N., and Borisover, M. (2015). Interactions of triclosan, gemfibrozil and galaxolide with biosolid-amended soils: Effects of the level and nature of soil organic matter. *Chemosphere* **138**, 272-280.
- Vallecillos, L., Borrull, F., and Pocurull, E. (2014). On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography-mass spectrometry to determine musk fragrances in wastewater. *Journal of Chromatography A* **1364**, 1-11.

- Vallecillos, L., Pocurull, E., and Borrull, F. (2012). Fully automated ionic liquid-based headspace single drop microextraction coupled to GC-MS/MS to determine musk fragrances in environmental water samples. *Talanta* **99**, 824-832.
- Vas, G., and Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **39**, 233-254.
- Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., and Mele, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 5908-5945.
- Venkatesh, A., Chopra, N., and Krupadam, R. J. (2014). Removal of acutely hazardous pharmaceuticals from water using multi-template imprinted polymer adsorbent. *Environmental Science and Pollution Research* **21**, 6603-6611.
- Verma, K. S., and Xia, K. (2010). Analysis of Triclosan and Triclocarban in Soil and Biosolids Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Coupled with HPLC-UV. *Journal of AOAC International* **93**, 1313-1321.
- Vidal, L., Chisvert, A., Canals, A., and Salvador, A. (2010). Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta* **81**, 549-555.
- Wang, H., He, Y., He, X., Li, W., Chen, L., and Zhang, Y. (2009). BSA-imprinted synthetic receptor for reversible template recognition. *Journal of Separation Science* **32**, 1981-1986.
- Wang, L., McDonald, J. A., and Khan, S. J. (2013). Enantiomeric analysis of polycyclic musks in water by chiral gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1303**, 66-75.
- Wang, X., Ding, X., Zheng, Z., Hu, X., Cheng, X., and Peng, Y. (2006). Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Particles Synthesized by Suspension Polymerization in Silicone Oil. *Macromolecular Rapid Communications* **27**, 1180-1184.
- Wang, X., Fang, Q., Liu, S., and Chen, L. (2012). Preparation of a magnetic molecularly imprinted polymer with pseudo template for rapid simultaneous determination of cyromazine and melamine in bio-matrix samples. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **404**, 1555-1564.
- Wang, Y.-C., and Ding, W.-H. (2009). Determination of synthetic polycyclic musks in water by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 6858-6863.
- Wang, Y., Cao, Y., Fang, C., and Gong, Q. (2010). Electrochemical sensor for parabens based on molecular imprinting polymers with dual-templates. *Analytica Chimica Acta* **673**, 145-150.
- Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P., and Vulfson, E. N. (1995). A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 7105-7111.
- Winkler, M., Headley, J. V., and Peru, K. M. (2000). Optimization of solid-phase microextraction for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic musk fragrances in water samples. *Journal of Chromatography A* **903**, 203-210.
- Wojnarowska, F., and Calnan, C. D. (1986). Contact and photocontact allergy to musk ambrette. *British Journal of Dermatology* **114**, 667-675.
- Wollenberger, L., Breitholtz, M., Ole Kusk, K., and Bengtsson, B.-E. (2003). Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *Science of The Total Environment* **305**, 53-64.

- Wombacher, W. D., and Hornbuckle, K. C. (2009). Synthetic Musk Fragrances in a Conventional Drinking Water Treatment Plant with Lime Softening. *Journal of environmental engineering (New York, N.Y.)* **135**, 1192.
- Wong, A., de Oliveira, F. M., Tarley, C. R. T., and Del Pilar Taboada Sotomayor, M. (2016). Study on the cross-linked molecularly imprinted poly(methacrylic acid) and poly(acrylic acid) towards selective adsorption of diuron. *Reactive and Functional Polymers* **100**, 26-36.
- Wu, J., Qian, X., Yang, Z., and Zhang, L. (2010a). Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 1471-1475.
- Wu, J., Zhang, L., and Yang, Z. (2010b). A Review on the Analysis of Emerging Contaminants in Aquatic Environment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **40**, 234-245.
- Wu, L., and Li, Y. (2004). Metal ion-mediated molecular-imprinting polymer for indirect recognition of formate, acetate and propionate. *Analytica Chimica Acta* **517**, 145-151.
- Wulff, G., and Sarhan, A. (1972). Macromolecular Colloquium. *Angewandte Chemie International Edition in English* **11**, 334-342.
- Xu, C., Uddin, K. M. A., Shen, X., Jayawardena, S., Yan, M., and Ye, L. (2013). Photoconjugation of molecularly imprinted polymer with magnetic nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces* **5**, 5208-5213.
- Xu, Z., Fang, G., and Wang, S. (2010). Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. *Food Chemistry* **119**, 845-850.
- Xu, Z., Kuang, D., Liu, L., and Deng, Q. (2007). Selective adsorption of norfloxacin in aqueous media by an imprinted polymer based on hydrophobic and electrostatic interactions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **45**, 54-61.
- Yan, H., and Row, K. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences* **7**, 155.
- Yan, M., and Ramström, O. (2005). "Molecularly imprinted materials : science and technology," Marcel Dekker, New York.
- Yang, J.-J., and Metcalfe, C. D. (2006). Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. *Science of The Total Environment* **363**, 149-165.
- Yang, T., Li, Y.-H., Wei, S., Li, Y., and Deng, A. (2008a). Development of a selective molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction for indomethacin from water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 2905-2914.
- Yang, Y., Long, Y., Cao, Q., Li, K., and Liu, F. (2008b). Molecularly imprinted polymer using β -cyclodextrin as functional monomer for the efficient recognition of bilirubin. *Analytica Chimica Acta* **606**, 92-97.
- Ye, L. (2016). "Molecular Imprinting: Principles and Applications of Micro- and Nanostructure Polymers," Pan Stanford Publishing.
- Ying, G.-G., and Kookana, R. S. (2007). Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environment International* **33**, 199-205.
- Younos, T., and Grady, C. A. (2014). "Potable Water: Emerging Global Problems and Solutions," Springer International Publishing.

- Yu, J. y., Hu, X. l., Li, D. p., and Wang, H. l. (2010). Molecularly Imprinted Polymer Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization for the Binding and Recognition of Roxithromycin. In "2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering", pp. 1-4.
- Yusof, N. A., Zakaria, N. D., Maamor, N. A. M., Abdullah, A. H., and Haron, M. J. (2013). Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymer Membrane for the Removal of 2,4-Dinitrophenol. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 3993-4004.
- Zakaria, N. D., Yusof, N. A., Haron, J., and Abdullah, A. H. (2009). Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for 2,4-Dinitrophenol. *International Journal of Molecular Sciences* **10**, 354-365.
- Zeng, X., Sheng, G., Xiong, Y., and Fu, J. (2005). Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC-EI-MS. *Chemosphere* **60**, 817-823.
- Zhang, L., Cheng, G., Fu, C., and Liu, X. (2003). Tyrosine imprinted polymer beads with different functional monomers via seed swelling and suspension polymerization. *Polymer Engineering & Science* **43**, 965-974.
- Zhang, M., Zeng, J., Wang, Y., and Chen, X. (2013). Developments and Trends of Molecularly Imprinted Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science* **51**, 577-586.
- Zhang, X., Liang, G., Zeng, X., Zhou, J., Sheng, G., and Fu, J. (2011). Levels of synthetic musk fragrances in human milk from three cities in the Yangtze River Delta in Eastern China. *Journal of Environmental Sciences* **23**, 983-990.
- Zhang, X., Yao, Y., Zeng, X., Qian, G., Guo, Y., Wu, M., Sheng, G., and Fu, J. (2008). Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China. *Chemosphere* **72**, 1553-1558.
- Zhang, Y., Liu, R., Hu, Y., and Li, G. (2009). Microwave Heating in Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Beads for Trace Triazines Analysis in Complicated Samples. *Analytical Chemistry* **81**, 967-976.
- Zhang, Z. B., and Hu, J. Y. (2012). A quantitative method evaluating the selective adsorption of molecularly imprinted polymer. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **47**, 837-842.
- Zhu, H., Wang, Y., Yuan, Y., and Zeng, H. (2011). Development and characterization of molecularly imprinted polymer microspheres for the selective detection of kaempferol in traditional Chinese medicines. *Analytical Methods* **3**, 348-355.
- Zulfikar, M. A., Wahyuningrum, D., Mukti, R. R., and Setiyanto, H. (2016). Molecularly imprinted polymers (MIPs): a functional material for removal of humic acid from peat water. *Desalination and Water Treatment* **57**, 15164-15175.

Anexos

7. Anexo I. Determinação da incerteza global

A incerteza global (U) é expressa da seguinte forma:

$$U = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2} \quad (\text{AI.1})$$

Na qual $U1$ representa a incerteza associada à preparação dos padrões e pode ser estimada a partir da seguinte expressão:

$$U1 = u_{st} = \sqrt{\sum \left(\frac{\Delta m_i}{m_i}\right)^2} \quad (\text{AI.2})$$

em que Δm_i corresponde ao erro associado a um equipamento de medida e m_i o valor medido por este equipamento.

Por sua vez $U2$ é designado pela incerteza associada à curva de calibração. Esta incerteza é calculada para cada uma das concentrações dos padrões através da seguinte equação:

$$U2 = \frac{S_{x0}}{x_0} = \frac{1}{x_0} \frac{S_{y/x}}{a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - y_{av})^2}{a^2 \sum (x_i - x_{av})^2}} \quad (\text{AI.3})$$

em que S_{x0} é o desvio padrão para uma dada concentração, x_0 a respetiva concentração, $S_{y/x}$ o desvio padrão residual, a o declive da regressão linear, m o número de replicados, n o número de padrões utilizados para a construção da reta, y_{av} a média dos valores de y_i experimentais, x_i a concentração do padrão, x_{av} a média dos valores de x_i .

$U3$ é a incerteza associada à precisão da extração e pode ser obtida a partir de:

$$U3 = \frac{s}{y_{med}\sqrt{n}} \quad (A1.4)$$

em que s é o desvio padrão dos ensaios de precisão, y_{med} o valor da área média dos ensaios para uma determinada concentração e n o número de ensaios.

A incerteza associada á exatidão $U4$ é determinada de um modo bastante semelhante à incerteza associada à precisão, ou seja:

$$U4 = \frac{s(\eta)}{\sqrt{n}} \quad (A1.5)$$

em que $s(\eta)$ é o desvio padrão relativo da percentagem média de recuperação e n o número de ensaios.