



**Vera Lúcia Veiga  
Granado**

**Polímeros Molecularmente Impressos para a  
Determinação da Difenilamina**



**Vera Lúcia Veiga  
Granado**

**Polímeros Molecularmente Impressos para a  
Determinação da Difenilamina**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica do Doutor João Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Alisa Rudnitskaya, Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva**

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

**Prof. Doutor João António Baptista de Oliveira**

Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Co-Orientadora

**Doutora Alisa Rudnitskaya**

Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

Arguente

**Prof. Doutora Alzira Yamazaki**

Professora Auxiliar do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas

## **agradecimentos**

Aos meus orientadores, nomeadamente ao Dr João Oliveira pelo esclarecimento de dúvidas, orientação, apoio e disponibilidade demonstrados e à Dr<sup>a</sup> Alisa Rudnitskaya, pela orientação e auxílio prestado, estando sempre disponível e presente ao longo de todo o ano.

À Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Gomes, que apesar de não ser oficialmente minha orientadora, para mim é como se fosse, pois acompanhou o meu trabalho, estando sempre presente e disponível para me ajudar, apoiar e aconselhar nos momentos positivos e negativos ao longo de todo o ano.

Ao Dr. Dimitri Evtyugin pela disponibilidade, cedência de equipamentos e esclarecimento de duvidas sempre que foram necessários.

Aos funcionários do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, especialmente ao Sr. Morais, pelo trabalho em vidro, que possibilitou a realização da síntese dos polímeros impressos, ao Sr. Cândido pela pronta ajuda na resolução de problemas práticos relacionados com a soldadura de cabos e à Dr<sup>a</sup> Teresa Caldeira pelos conselhos práticos e simpatia.

Aos meus companheiros de laboratório, pela ajuda e disponibilidade sempre que foram necessárias e pelos momentos inesquecíveis que surgiram ao longo do ano.

A toda a minha família, em especial, aos meus pais pelo carinho, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu namorado pela compreensão, apoio e força tanto a nível pessoal como profissional.

A todos os bons amigos que fiz ao longo dos anos, pelo apoio, amizade e bons momentos que me proporcionaram.

## palavras-chave

Impressão Molecular, Polímeros Molecularmente Impressos, Difenilamina, Eléctrodos Selectivos a Iões.

## resumo

Neste trabalho procedeu-se à elaboração de um sensor potenciométrico baseado em polímeros molecularmente impressos (PMI), como substâncias activas para a determinação da difenilamina (DFA) em soluções aquosas.

Primeiramente procedeu-se à síntese do polímero impresso com DFA através da polimerização por precipitação, utilizando o ácido metacrílico como monómero e o trimetacrilato de trimetilpropano como agente de reticulação. Os polímeros sintetizados foram caracterizados química e morfológicamente por: espectroscopia de infravermelho por transformadas de fourier com reflectância total atenuada, microscopia de varrimento electrónico e estudos de religação. Estudou-se o efeito das condições de síntese, nomeadamente da concentração de DFA e do tempo de polimerização, na capacidade de absorção e selectividade dos PMI aos compostos fenólicos. Foram seleccionados dois dos polímeros com maior selectividade que foram posteriormente utilizados como ionóforos. Prepararam-se para os eléctrodos selectivos a iões (ESI) dois tipos de membranas (incorporando as partículas dos PMI): plastificadas de polivinil cloreto (PVC) e de polietilenodioxitiófenos eletropolimerizado (PETF). Foram também preparadas membranas com polímeros não impressos (PNI) e sem qualquer tipo de partículas poliméricas sintetizadas (branco). Todos os eléctrodos modificados com os PMI exibiram uma resposta Nernstiana à difenilamina em soluções aquosas com pH 2 e 4. O limite de detecção situou-se entre  $2,9 \times 10^{-4}$  e  $3,5 \times 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup> para todos os eléctrodos. Os eléctrodos modificados com polímeros não impressos não apresentaram resposta à difenilamina. O fenol (0,5 molL<sup>-1</sup>) e a catequina (0,005 molL<sup>-1</sup>) não interferiram com a resposta dos eléctrodos à difenilamina. Os ESI apresentaram uma selectividade elevada, relativamente à anilina, com um logaritmo do coeficiente de selectividade (logK) de -2,12. Os eléctrodos apresentaram um tempo de resposta inferior a 5 minutos, com um bom desempenho durante pelo menos 73 dias para o ESI com membranas de PVC e 30 dias para o ESI com membranas de PETF.

**keywords**

Molecular Imprinting, Molecularly Imprinted Polymers, Diphenylamine, Ion Selective Electrodes.

**abstract**

The main purpose of this work was development of a potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymers as active substances for the determination of diphenylamine (DFA) in aqueous. Molecular imprinting is a useful technique for the preparation of functional polymeric materials with molecular recognition properties. Firstly imprinted polymers with diphenylamine were synthesized by precipitation polymerization employing methacrylic acid as a monomer and trimethylolpropane trimethacrylate as a cross-linker. The polymers were chemically and morphologically characterized by Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance, scanning electron microscopy and rebinding studies. The effect of polymerization conditions, namely concentration of DFA and reaction time, on polymer properties such as absorption capacity and selectivity to phenolic compounds was studied. Two of the polymers with higher selectivity were chosen for further application as ionophores in potentiometric electrode membranes plasticized with polyvinyl chloride (PVC) and electropolymerized polyethylenedioxythiophene (PEDOT). Blank membranes and membranes with non imprinted polymers were also prepared. All electrodes modified with the MIP particles exhibited a Nernstian response to diphenylamine in aqueous solutions at pH 2 and 4. The detection limit was between  $2,9 \times 10^{-4}$  and  $3,50 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  for all electrodes. The electrodes modified with non imprinted polymers did not display any response to diphenylamine. Phenol ( $0,5 \text{ molL}^{-1}$ ) and catechin ( $0,005 \text{ molL}^{-1}$ ) did not interfere with the electrode response to DFA. High selectivity to aniline was observed with  $\log K -2,12$ . All electrodes presented a response time less than 5 minutes, with a good performance for at least 73 days for the sensors with PVC membranes and 30 days for the sensors with PEDOT membranes.

## Índice

<b>I -Introdução.....</b>	<b>11</b>
I.1.) Difetilamina.....	11
I.2 - Sensores.....	13
I.2.1) Transdutor.....	14
I.2.2) Camada de Reconhecimento.....	14
I.2.3) Sensores Potenciométricos.....	15
I.2.3.1) Eléctrodos Selectivos a Iões.....	15
I.3 – Tecnologia de Impressão Molecular.....	29
I.4) Tipos de Impressão Molecular.....	30
I.4.1) Impressão covalente.....	30
I.4.2) Impressão não covalente.....	31
I.4.3) Variáveis Experimentais - Controlo do processo de Síntese.....	32
I.5) Tipos de Polimerização.....	40
I.5.1) Polimerização Radicalar Livre.....	40
I.5.2) Polimerização <i>in-situ</i> .....	42
I.6) Remoção da Molécula Molde.....	45
I.7) Caracterização dos Polímeros Molecularmente impressos.....	46
I.7.1) Caracterização Morfológica.....	46
I.7.2) Caracterização Química.....	47
I.7.3) Caracterização da Capacidade de Retenção/Religação ao Analito.....	48
I.8) Aplicação dos PMI em Química Analítica.....	55
I.8.1. Aplicação dos PMI nos Sensores Potenciométricos.....	56

I.8.2) Métodos de Imobilização dos Polímeros Molecularmente Impressos na Membrana do Sensor Potenciométrico.....	57
I.9) Limitações do Polímeros Molecularmente Impressos.....	59
<b>II – Materiais e Métodos.....</b>	<b>61</b>
II.1) Reagentes.....	61
II.2) Preparação dos Polímeros Molecularmente Impressos.....	61
II.3) Caracterização dos Polímeros Molecularmente Impressos.....	63
II.3.1) Estudos de Religação.....	63
II.3.2) Estudos de Selectividade.....	64
II.3.3) Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier.....	64
II.3.4) Microscopia de Varrimento Electrónico.....	65
II.4) Avaliação Estatística – ANOVA.....	65
II.5) Elaboração do sensor potenciométrico.....	66
II.5.1) Preparação dos eléctrodos selectivos a iões.....	66
II.5.2) Preparação da Membrana selectiva para a Difenilamina.....	67
II.6) Caracterização do Desempenho Analítico do Eléctrodo.....	69
II.6.1) Calibração do eléctrodo.....	69
II.6.2) Efeito do pH.....	70
II.6.3) Estudo de Selectividade.....	70
<b>III) Resultados e Discussão.....</b>	<b>71</b>
III.1) Síntese dos Polímeros Molecularmente Impressos.....	71
III.2) Caracterização dos Polímeros Molecularmente impressos.....	72

III.2.1) Caracterização Química.....	72
III.2.2) Caracterização Morfológica.....	76
III.2.3) Caracterização do Reconhecimento Molecular.....	80
III.3) Estudo de Selectividade.....	87
III.5) Caracterização do Desempenho Analítico dos Sensores Elaborados.....	91
III.5.1) Calibração do sensor.....	91
III.5.2) Tempo de Resposta e Tempo de Vida dos Sensores.....	99
III.5.3) Resposta ao pH.....	101
III.5.4) Selectividade do Sensor.....	102
<b>IV) Conclusão.....</b>	<b>105</b>
<b>V) Referências Bibliográficas.....</b>	<b>107</b>

## Índice de Figuras

<b>Fig. 1</b> - Diagrama esquemático do circuito de medição num eléctrodo de membrana e montagem da célula.....	20
<b>Fig. 2</b> - Montagem típica para a medição com um ESI.....	21
<b>Fig. 3</b> – Gráfico representativo da calibração de um sensor e da determinação do limite de detecção para eléctrodos selectivos a iões.....	25
<b>Fig. 4</b> – a-b) ESI com um polímero condutor como membrana sensível. 1- condutor electrónico; 6- Disco de Platina; 7- Polímero condutor; 4-Membrana; 6- Disco de Platina; 9- Polímero condutor contendo sítios de reconhecimento iónico (ionóforo). [22] c-f)Princípio de operação de ESI de contacto sólido baseados num polímero condutor oxidado como membrana sensível. EC- Eléctrodo Condutor; CP- polímero condutor; ISM- Membrana selectiva a iões; S- solução; e- electrão; + - “cavidade/buraco” CP oxidado; L- sítio de reconhecimento iónico (móvel/fixo); Os iões primários estão rodeados por um círculo e os contra-iões por um quadrado. [22].....	28
<b>Fig. 5</b> - Princípio da técnica de Impressão molecular.....	30
<b>Fig.6</b> - Esquema ilustrativo da técnica de impressão de superfície baseada na polimerização por emulsão e precipitação .....	43
<b>Fig. 7</b> - Esquema ilustrativo do processo de impressão de superfície baseada na modificação da superfície de partículas de sílica .....	44
<b>Fig. 8</b> - Esquema representativo do estudo de religação – obtenção da isotérmica de ligação experimental.....	48
<b>Fig. 9</b> - Exemplo de um Gráfico Scatchard para um polímero molecularmente impresso, no qual é aplicado o modelo de Bi-Langmuir.....	50
<b>Fig. 10</b> - Esquema da preparação da membrana baseada em PETF e micro partículas dos PMI sintetizados.....	58

<b>Fig. 11</b> – Conjunto para montagem usado na elaboração dos eléctrodos selectivos a iões. Na caixa vermelha da figura encontram-se representados os eléctrodos já finalizados.....	66
<b>Fig. 12</b> - Esquema representativo da síntese para a análise .....	71
<b>Fig. 13</b> – Espectro de infravermelho obtido para cada um dos PMI e PNI sintetizados.....	73
<b>Fig. 14</b> – Espectros de infravermelho do monómero (AM), agente de reticulação (TRIM) e de um dos PMI sintetizados (PMI5), obtidos pela técnica de FTIR.....	75
<b>Fig. 15</b> - Espectros de infravermelho obtidos para a DFA e PMI5.....	76
<b>Fig.16</b> - Imagens obtidas pela técnica SEM: A e B) PNI sintetizados; C e D) PMI sintetizados. ....	77
<b>Fig. 17</b> - Modelo da formação da morfologia que origina a rede porosa nos PMI.....	78
<b>Fig. 18</b> - a e b) Agregação de microesferas dos PMI; c) Microesfera de PMI constituída por nanopartículas de PMI aglomeradas. ....	79
<b>Fig. 19</b> - Gráfico do estudo de religação dos polímeros sintetizados, impressos e não impressos.....	80
<b>Fig. 20</b> – Gráfico de contorno da capacidade de ligação das partículas (Q) dos PMIA sintetizados à DFA vs concentração da molécula molde e tempo de polimerização.....	82
<b>Fig. 21</b> - a-h) Representações gráficas dos dados do estudo de religação e correspondente ajuste pelas isotérmicas de Langmuir-Freundlich (IL-F), Freundlich (IF) e Langmuir (IL) para cada um dos PMI e PNI sintetizados.....	84
<b>Fig. 22</b> - Estrutura química de: a) difenilamina; b) catequina; c) ácido clorogénico; d) fenol; e) anilina.....	88
<b>Fig. 23</b> - Gráficos de contorno dos coeficientes de selectividade dos polímeros sintetizados relativamente a: a) anilina, b) catequina, c) ácido clorogénico e d) fenol vs tempo de polimerização e concentração de molécula molde.....	90

<b>Fig. 24</b> - a) Resposta potenciométrica do sensores a pH 2. a) PVC/PMI1(10% PMI1, sem AI) b) PTEF/PMI1; c) PTEF/PMI5; d) PTEF, e) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.....	92
<b>Fig. 25</b> - a) Resposta potenciométrica dos sensores a pH 4. a) PVC/PMI1 (10% polímero); sem aditivo iónico); b) PVC; c) PTEF/PMI1; d) PTEF/PMI5; e) PTEF; f) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.....	93
<b>Fig. 26</b> - a) Resposta potenciométrica do sensores a pH 6.a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) b) PTEF/PMI1; c) PTEF/PMI5; d) PTEF, e) PTEF/PNI1 Medições efectuadas à temperatura ambiente.....	94
<b>Fig. 27</b> - a) Resposta potenciométrica do sensores a pH 9. ) PVC/PMI1(10% PMI1, sem AI) b) PTEF/PMI1; c) PTEF/PMI5; d) PTEF, e) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.....	95
<b>Fig. 28</b> - Formação do anião responsável pela resposta aniónica do sensor, e respectivas estruturas de ressonância.....	98
<b>Fig 29</b> – Resposta potenciométrica do sensor com membrana de PVC (10% PMI1, sem AI). a) Membrana não hidratada previamente à medição da resposta do sensor; b) Membrana hidratada previamente à medição da resposta do sensor. Medições efectuadas a pH4 e temperatura ambiente.....	98
<b>Fig. 30</b> – Resposta dos sensores elaborados em função do pH. a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI), b)PETF/PMI1 e c)PETF/PMI5.....	101
<b>Fig 31</b> - Resposta potenciométrica do sensor com membrana de PVC (10% PMI1, sem AI) na presença do interferente: a) Fenol (0,5 M), b) Catequina ( $50 \times 10^{-4}$ M), c) Anilina ( $500 \times 10^{-4}$ M) As medições foram efectuadas a pH4 e temperatura ambiente.....	102
<b>Fig. 32</b> - Resposta potenciométrica do sensor com membrana de PTEF na presença do interferente: <b>a e b)</b> Fenol (0,5 M) <b>c e d)</b> Catequina ( $50 \times 10^{-4}$ M) <b>e e f)</b> Anilina ( $500 \times 10^{-4}$ M). Na parte superior de cada gráfico encontra-se o tipo de membrana do eléctrodo. As medições foram efectuadas a pH4 e temperatura ambiente.....	103

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Condições das polimerizações efectuadas.....	62
<b>Tabela 2</b> - ANOVA para dois factores.....	65
<b>Tabela 3</b> - Composição das membranas funcionais elaboradas baseadas em PVC .....	68
<b>Tabela 4</b> – Atribuição das frequências observadas nos espectros obtidos dos PMI e PNI.....	74
<b>Tabela 5</b> - Razão entre a capacidade de ligação (Q) de cada um dos PMI relativamente à quantidade ligada ao PNI1.....	82
<b>Tabela 6</b> - Valor do coeficiente de determinação para cada uma das isotérmicas de ligação(IL-F, L e F) aplicadas à isotérmica experimental dos PMI e PNI sintetizados.....	85
<b>Tabela 7</b> - Valores da capacidade de ligação obtidos na isotérmica experimental (Q), do índice de heterogeneidade $m$ e do parâmetro $a$ da isotérmica de Freundlich.....	86
<b>Tabela 8</b> – Quantidade de cada composto fenólico, em estudo, por cem gramas de maçã. [118].....	87
<b>Tabela 9</b> – Valores do coeficiente de selectividade para cada um dos compostos testados e PMI e PNI sintetizados. O desvio padrão encontra-se em parêntesis.....	88
<b>Tabela 10</b> - ANOVA para os factores que afectam a capacidade de ligação (Q), os parâmetros da isotérmica de Freundlich ( $a$ e $m$ ) e os coeficientes de selectividade para a anilina ( $K_{DPA/An}$ ), catequina ( $K_{DPA/Cat}$ ), ácido clorogénico ( $K_{DPA/AC}$ ) e fenol ( $K_{DPA/Fe}$ ).....	89
<b>Tabela 11</b> – Características potenciométricas do sensor baseado em PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) a pH4. MA - Material Activo; P – Plastificante; AI- Aditivo Iónico; LD- Limite de Detecção; GL- Gama Linear. A percentagem de material activo relativamente ao peso total da membrana encontra-se entre parêntesis.....	96

<b>Tabela 12</b> - Composição da membrana e características do desempenho analítico do sensor baseado em PETF, a pH4. MA - Material Activo LD- Limite de Detecção; GL- Gama Linear; $R^2$ – Coeficiente de Determinação.....	96
<b>Tabela 13</b> - Características do desempenho analítico do sensor baseado em membrana de PETF ao longo de 30 dias. LD- Limite de Detecção; GL- Gama Linear; TR – Tempo de Resposta; $R^2$ - Coeficiente de determinação.....	100
<b>Tabela 14</b> - Características do desempenho analítico do sensor baseado em membrana plastificada de PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) ao longo de 73 dias. LD- Limite de Detecção; GL- Gama Linear; TR – Tempo de Resposta; $R^2$ - Coeficiente de determinação.....	100
<b>Tabela 15</b> - Logaritmo dos coeficientes de selectividade dos sensores potenciométricos elaborados, relativamente à anilina, catequina e fenol.....	104

## Abreviaturas

AC- Corrente alternada

AI – Aditivo iónico

AM - Ácido metacrílico

ATFMA - Ácido trifluorometacrílico

CCF – Cromatografia de camada fina

CG– Cromatografia de fase gasosa

CG-DCF- Cromatografia de fase gasosa com detector de chama fotométrico

CG/EM – Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa

CLEE - Cromatografia líquida de elevada eficiência

CQP - Cristal de quartzo piezoeléctrico

DA – Distribuição de afinidade

DC- Corrente contínua

DFA - Difenilamina

DOS – Sebacato de dioctilo

E – Potencial do eléctrodo

EI - Espectroscopia de infravermelho

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

EM – Espectrometria de massa

ESI - Eléctrodo selectivo a iões

ETF - Etiltiofeno

fem – Força electromotriz

IF – Isotérmica de freundlich

IUPAQ - União internacional da química pura e aplicada

$K^{\text{pot}}$  - Coeficiente de selectividade potenciométrico

IL- Isotérmica de Langmuir

IL-F - Isotérmica de Langmuir-Freundlich

MCQ – Microbalança de cristal de quartzo

MFA - Microscopia de força atômica

MMA-DMA - Metilmetacrilato-decilmetacrilato

MSM - Método das soluções mistas

MSS - Método das soluções separadas

MVE – Microscopia de varrimento electrónico

*o*-NPOE - Éter *o*-nitrofeniloxilico

OTI - Óxido de titânio e índio

PEDOT – Poli (3,4-etilenodioxietiltiltiofeno)

TEC– Transístor de efeito de campo

PFD - Poli(*o*-fenilenediamina)

PMI – Polímeros Molecularmente Impressos

PVC - Policloreto de vinilo

PETF - Polietiltiltiofeno

TECSI – Transistor de efeito de campo selectivo de iões

TFM - “Thifensulfuron-Methyl”

TRIM – Trimetacrilato de trimetilolpropilo

THF - Tetrahidrofurano

## **I- Introdução**

### **I.1) Difenilamina**

A difenilamina (DFA), é uma diarilamina secundária que possui várias aplicações industriais. É normalmente usada como estabilizante em explosivos que contêm nitrocelulose, como composto de origem para aceleradores de vulcanização e como antioxidante na indústria de borracha e de polímeros. Para além destas aplicações, a DFA é também usada como teste para agentes oxidantes e na detecção de DNA em laboratórios, como estabilizante de produtos de perfumaria, sendo também usada para absorver os catalisadores decompostos no combustível dos propulsores de foguetes [1].

A DFA tem sido também usada para prevenir a deterioração das culturas de maçãs e pêras após a colheita, devido às suas propriedades antioxidantes, que protegem a pele da fruta, dos produtos de oxidação do alfa-farneseno (um sesquiterpeno) de modo a prolongar o seu armazenamento. A DFA é normalmente aplicada por nebulização sob a forma de emulsão ou papéis impregnados [2].

Após a sua aplicação, durante o armazenamento da fruta, a DFA possui a capacidade não só de migrar do sítio do tratamento (superfície da fruta) mas também de se transformar, originando produtos hidroxilados livres incluindo a 2-hidroxicloridifenilamina, 3-hidroxicloridifenilamina, 4 – hidroxicloridifenilamina e produtos de degradação hidroxilados [3]. Estes, produtos de degradação hidroxilados, podem originar conjugados glucosidil responsáveis pela formação de biopolímeros de carboidratos conjugados com hidroxicloridifenilamina, que são incorporados nas paredes celulares. A maior parte destes derivados hidroxilados encontram-se na polpa, ao contrário da difenilamina não metabolizada, que se encontra maioritariamente na casca das maçãs [3]. A quantidade de resíduos de DFA e seus derivados, que podem ser encontrados nas maçãs tratadas com DFA, dependem das condições de armazenamento (ex: temperatura), da acção do etileno, da concentração de DFA na emulsão de tratamento, dos aditivos, entre outros [4].

A DFA é muito reactiva devido ao seu átomo de hidrogénio amínico, o qual pode ser facilmente substituído electrofilicamente, dando origem a vários derivados da DFA. O

átomo de hidrogénio imino pode ser substituído por, metais alquil, grupos aril ou acil, entre outros [2].

A DFA faz parte da terceira lista de poluentes prioritários da União Europeia e no entanto até à data, pouco se sabe sobre a toxicologia desta e dos seus derivados [1]. No entanto, podem ser encontrados alguns estudos ecotoxicológicos que demonstram o potencial perigo de várias difenilaminas no ambiente aquático, bactérias e animais. Sabendo-se que os compostos nitroaromáticos podem causar intoxicações nos seres humanos, relacionadas com alterações hemato e hepatotóxicas, tendo os resíduos de difenilnitrosamina sido classificados como potencialmente carcinogénicos [5]. A DFA demonstrou também alguns efeitos inibidores em bactérias fototrópicas. Goodwin verificou a inibição da síntese do caroteno de algumas bactérias fotossintéticas, devido à presença de DFA [6].

A utilização da DFA para tratamento do escaldão nas pêras e maçãs não é problemático, caso a DFA seja totalmente removida aquando do processamento dos alimentos (anteriormente ao seu consumo) através da lavagem, descasque e, nalguns casos, tratamento térmico. Pereira I, efectuou a análise de alguns pesticidas, incluindo a DFA, na polpa e casca das maçãs verificando uma redução de 85% do pesticida DFA em maçãs descascadas. Constatou também que uma única maçã por descascar continha, aproximadamente, o mesmo teor deste pesticida que se consome em cinco peças de fruta (quantidade difenilamina na maçã inteira: 0,0120 mg; quantidade difenilamina na polpa de maçã: 0,00178mg; quantidade na casca da maçã: 0,0102 mg) [7]. Contudo, a limpeza dos frutos desloca a ameaça ambiental da DFA e seus derivados para as águas residuais, havendo assim a necessidade de investigação da sua toxicidade, uma vez que estes compostos já foram detectados no solo e águas subterrâneas. Tolerâncias ou limites máximos de resíduos de DFA, foram estabelecidos para a aplicação pós-colheita em maçãs, tendo sido estabelecido o limite de 10 ppm. Para resíduos no leite e carne de bovinos, caprinos, cavalos e ovelhas, o limite foi de 0,01 ppm [5].

A determinação de resíduos de DFA em frutas é uma tarefa difícil devido, em grande parte, à complexidade da matriz que requer tratamentos da amostra com vários estágios de extracção [2]. A determinação da DFA nas culturas tem sido efectuada maioritariamente por métodos cromatográficos como a cromatografia de fase gasosa, a

cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com derivatização, a qual foi também usada para a determinação de DFA em maçãs e pêras. A cromatografia líquida de elevada eficiência com detecção electroquímica, fluorescente e espectrometria de massa foram também aplicadas [2]. Estas técnicas oferecem uma excelente sensibilidade e limites de detecção, contudo não são indicadas para o processamento rápido de amostras múltiplas e detecção em tempo real. Requerem técnicos com conhecimentos específicos, são morosas e dispendiosas, não sendo também adequadas para a detecção *in-situ* [5]. Assim, atendendo às limitações destas técnicas analíticas, existe a necessidade do desenvolvimento de novos métodos, mais rápidos, sensíveis e selectivos. Uma possível alternativa poderá ser o desenvolvimento de um sensor potenciométrico para a DFA, uma vez que não se encontra, até agora, na literatura. Assim, neste trabalho pretende-se desenvolver um sensor potenciométrico, baseado num polímero molecularmente impresso (PMI), específico para o reconhecimento e determinação da difenilamina.

## **I.2) Sensores**

Na literatura podem ser encontradas diferentes definições de sensor. Segundo a IUPAQ (União Internacional da Química Pura e Aplicada) um sensor químico pode ser definido com um dispositivo que transforma a informação química, desde a concentração de um componente específico da amostra até à análise da composição total da mesma, num sinal analítico mensurável [8].

Um sensor químico possui normalmente dois componentes básicos: uma camada de reconhecimento (quimicamente selectiva que interage com o analito) e um transdutor, o qual transforma esta interacção num sinal analítico mensurável.

A detecção química baseia-se na interacção de uma espécie química particular, o analito, com a camada sensível ou de reconhecimento.

O bom desempenho de um sensor está dependente de factores como o mecanismo de resposta, selectividade, limite de detecção, gama de sensibilidade, tempo de resposta, reutilização e tempo de vida.

### **I.2.1) Transdutor**

O transdutor corresponde ao dispositivo que converte a mudança física ou química, na camada de reconhecimento, num sinal físico mensurável.

Os transdutores podem ser subdivididos em quatro grupos principais, de acordo com o princípio de funcionamento: electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos e térmicos.

### **I.2.2) Camada de Reconhecimento**

A camada de reconhecimento é o componente chave de qualquer tipo de sensor. Permite obter a selectividade do sensor a um analito particular, num grupo de analitos, evitando assim a interferência de outras substâncias.

Inúmeros materiais sensíveis têm sido usados como camadas de reconhecimento, desde elementos biológicos, como enzimas e anticorpos (no caso dos biossensores) e elementos sintéticos (materiais orgânicos, inorgânicos, cristalinos, amorfos, ionóforos, etc.) no caso de sensores químicos.

Nos sensores químicos o reconhecimento baseia-se normalmente no estabelecimento de interacções (ligações de hidrogénio, covalentes, não covalentes, complexação, troca iónica, redução / oxidação) entre os elementos de reconhecimento e o analito, de modo a originar uma mudança física detectável e quantificável.

### **I.2.3) Sensores Potenciométricos**

Os sensores potenciométricos são um sub-grupo importante dos sensores electroquímicos.

Um sensor potenciométrico opera sob condições em que o fluxo de corrente numa célula galvânica constituída pelos eléctrodos de trabalho, de referência e a solução analisada é próximo de zero, medindo a diferença de potencial entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência [9].

Existem três categorias dos eléctrodos potenciométricos: os eléctrodos de primeira, segunda e terceira espécie. Os eléctrodos de primeira espécie são constituídos por um metal em contacto com a solução que contém os seus iões. Os eléctrodos de segunda espécie consistem num metal em contacto com a solução que contém os aniões capazes de formar um sal pouco solúvel deste metal (ex: eléctrodos de referência calomelanos e de prata/cloreto de prata). Os eléctrodos de terceira ordem consistem num metal em contacto com dois sais pouco solúveis (um contendo o catião do metal e o outro contendo o catião a ser determinado, possuindo ambos os sais um anião em comum) imerso numa solução contendo um sal do segundo metal (por exemplo, zinco| oxalato de zinco| oxalato de cálcio|| solução de cálcio). Para além dos eléctrodos de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> ordem, existem ainda os chamados eléctrodos de membrana ou eléctrodos selectivos a iões (ESI).

#### **I.2.3.1) Eléctrodos Selectivos a iões**

Os eléctrodos selectivos a iões (ESI) são eléctrodos de membrana que respondem selectivamente a iões específicos na presença de outros iões. Na sua configuração clássica, estes eléctrodos baseiam-se maioritariamente em membranas que separam a amostra do interior do eléctrodo [10].

A membrana selectiva a iões é a parte mais importante no desenvolvimento dos ESI. De acordo com a natureza dos sítios de ligação, as membranas podem ser divididas

em membranas que contêm sítios iónicos fixos, membranas de troca iónica móvel ou membranas que contêm ionóforos neutros. Os sítios de ligação estão incorporados na matriz da membrana, a qual controla a constante dieléctrica interna, a lipofilicidade, o transporte e outras propriedades mecânicas e físicas da membrana [10].

Existem três principais tipos de membranas selectivas:

- Membranas de vidro – Baseiam-se em membranas finas de vidro, sensível a iões. No caso do vidro baseado em silicato, a superfície do vidro hidratado sofre uma troca iónica com os iões  $H^+$  da solução. Desenvolve-se uma diferença de potencial entre ambos os lados da membrana, cuja magnitude depende da actividade do ião [10].

Existem ainda os eléctrodos com membranas de vidro calcogeneto, que respondem aos iões dos metais de transição.

- Membranas de estado sólido - Neste tipo de eléctrodos selectivos, a membrana consiste num sólido iónico, o qual deve possuir um produto de solubilidade pequeno de modo a evitar a dissolução da membrana e a assegurar uma resposta estável com o tempo. A condução ao longo da membrana é principalmente iónica e deve-se a defeitos na rede cristalina. Um exemplo deste tipo é o eléctrodo de fluoreto de lantânio.

- Membranas líquidas ou poliméricas - Nestes, a membrana polimérica é usada para separar a solução teste do compartimento interior que contém a solução do ião alvo. O reconhecimento do ião pela membrana pode ser feito por troca iónica ou através de complexação com um composto macrocíclico neutro, que possui uma cavidade com as dimensões adequadas aos iões de interesse [10]. Os componentes chave da membrana são o ionóforo e o sal lipofílico, no entanto a matriz polimérica e o plastificante são também componentes importantes.

## **Ionóforo**

O ionóforo é o componente mais importante da membrana selectiva. Este liga-se selectivamente ao ião primário discriminando-o dos iões interferentes. Esta selectividade provém da capacidade de complexação com o ião primário e da deficiente ou mínima complexação com o ião interferente [10].

O ionóforo utilizado no desenvolvimento da membrana polimérica pode ser neutro ou carregado. Os ESI para catiões geralmente usam ionóforos neutros e, normalmente contêm anéis macrocíclicos de heteroátomos ou grupos funcionais que são capazes de complexar o ião primário, onde a cavidade do anel serve para excluir os iões interferentes, baseado nos diferentes raios iónicos. Por exemplo, a valinomicina foi conhecida como um dos primeiros ionóforos na construção do ESI para o ião potássio, a qual exhibe efeitos quelantes e macrocíclicos [11].

Embora exista actualmente um grande número de ligantes descritos para catiões, a quantidade existente para aniões é menor, sendo os mais comuns os compostos organometálicos que se ligam com o anião de interesse através de uma ligação de coordenação. Outros compostos também usados são os permutadores de iões como sais de tetrafenilborato e sais de amónio quaternários, para catiões e aniões respectivamente. A selectividade destes compostos é geralmente governada pela série de Hoffmeister, sendo maior para iões mais lipofílicos o que limita o seu uso como ionóforos. Estes compostos são aplicados como aditivos iónicos.

Em geral, há vários factores que determinam a possibilidade de se poder utilizar um composto como ionóforo, encontrando-se entre os mais importantes a força de interacção ionóforo-ião e a lipofilicidade. A força de interacção é determinada pela constante de formação do complexo. A lipofilicidade pode ser determinada pela medida da distribuição do equilíbrio por cromatografia de camada fina [11].

A lixiviação do ionóforo da matriz polimérica é determinada pela sua lipofilicidade e pode influenciar substancialmente o tempo de vida da membrana selectiva. Geralmente, quando o ionóforo é mais lipofílico, o tempo de vida do ESI é mais prolongado [10].

## **Sais Lipofílicos**

O pré-requisito para a obtenção de uma resposta teórica com as membranas dos ESI é a sua permeabilidade selectiva, o que significa que não pode entrar na membrana qualquer quantidade de contra-íões. Para atingir esta condição, também designada de exclusão de Donnan, para transportadores electricamente neutros devem estar presentes contra-íões na membrana [11]. Embora as membranas baseadas em transportadores neutros possam funcionar bem, mesmo quando contêm apenas uma pequena quantidade de sítios iónicos, a adição de um sal iónico lipofílico é aconselhável e benéfico. Por outro lado, as membranas com transportadores carregados não requerem a adição de sais lipofílicos para a obtenção de uma resposta Nernstiana, pois o próprio transportador induz a exclusão de Donnan, no entanto a sua presença continua a ser benéfica pois a sua adição, normalmente, leva a uma redução quer da interferência iónica quer da resistência eléctrica da membrana [12]. Neste caso (transportadores carregados) os sítios iónicos adicionados devem possuir a mesma carga do ião analito [10].

É de salientar, que os aditivos iónicos podem, eles próprios, induzir uma resposta caso exista uma quantidade insuficiente de ionóforo e, conseqüentemente, a sua concentração deve ser ajustada cuidadosamente [12].

## **Plastificante**

Os plastificantes são importantes para as membranas de PVC porque reduzem a viscosidade, proporcionam homogeneidade à membrana e asseguram uma mobilidade relativa dos íões na membrana, pelo que também o plastificante deve ser compatível com todos os componentes da amostra [10].

Os plastificantes normalmente usados nos sensores iónicos baseiam-se numa matriz contendo cerca de 33% (m/m) de PVC e 66% de plastificante. Membranas com esta elevada quantidade de plastificante possuem propriedades físicas óptimas e asseguram as

elevadas mobilidades relativas dos seus constituintes [12]. Os plastificantes mais usados até à data têm sido o Sebacato de dioctilo (DOS), apolar, e o éter *o*-nitrofeniloctílico (*o*-NPOE), polar. Dependendo da sua polaridade e lipofilicidade, os plastificantes podem influenciar a selectividade e resposta dos ESI [13]. Por exemplo, foi demonstrado que ESI para catiões alcalinos que contêm *o*-NPOE apresentam um aumento na selectividade e diminuição no limite de detecção, devido a uma pequena capacidade de coordenação existente, o que não foi observado quando o DOS foi usado [14].

### **Matriz Polimérica**

A matriz polimérica fornece estabilidade mecânica à membrana. Esta deve ser inerte e não interagir quimicamente com o ião primário [11]. Geralmente, a substância usada como matriz polimérica tem sido o PVC, no entanto este não é o único polímero aconselhável para as membranas do sensor. Polímeros como o metilmetacrilato-decilmetacrilato (MMA-DMA), poliuretano e polietileno co-acetato de vinilo têm também sido usados [11].

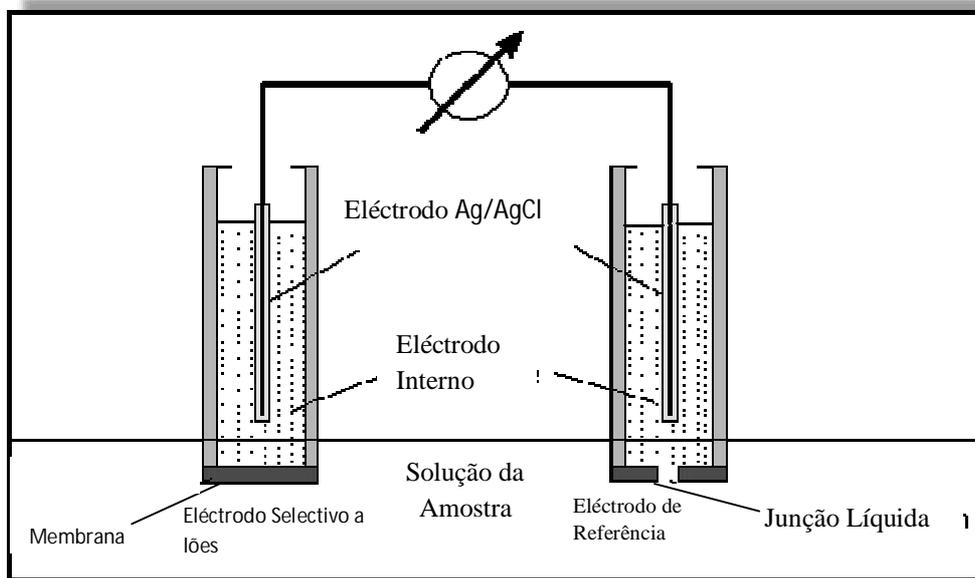
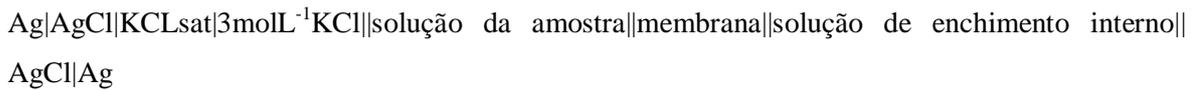
Além da sua solubilidade, para um polímero poder servir como matriz de um sensor, o mais importante é que a sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) seja inferior à temperatura ambiente. Polímeros com elevada  $T_g$  (ex: PVC  $T_g = 80^\circ\text{C}$ ) requerem o uso de plastificantes, enquanto polímeros com baixa  $T_g$  (ex: borracha de silicone, polisiloxanos) podem ser usados sem plastificante, evitando assim a possível lixiviação do plastificante e ao mesmo tempo evitando a modificação dos eléctrodos selectivos através da variação do plastificante [10,11].

### **Configuração de uma Célula Potenciométrica**

A configuração de uma célula potenciométrica encontra-se representada na figura 1. Nesta célula, uma membrana sensível a iões é colocada entre duas soluções aquosas (ex:

amostra e solução de enchimento interna). Um eléctrodo de referência (Ag/AgCl) é colocado na solução de enchimento interna, a qual contém íões deste eléctrodo aos quais responde. O eléctrodo de referência externo é colocado na amostra e normalmente possui uma ponte salina de forma a prevenir a contaminação da amostra.

As medições potenciométricas são normalmente realizadas sob condições de corrente zero numa célula galvânica do tipo:



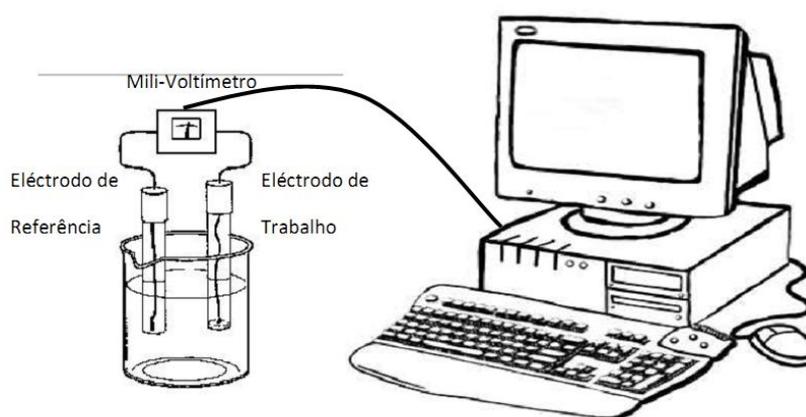
**Fig. 1** - Diagrama esquemático do circuito de medição num eléctrodo de membrana e montagem da célula.

A força electromotriz (fem) na célula corresponde ao somatório de vários potenciais sendo muitos deles independentes da amostra:

$$fem = E_{const} + E_M + E_j \quad (1)$$

onde o  $E_M$  corresponde ao potencial da membrana,  $E_j$  ao potencial de junção líquida, formado na interface amostra-ponte salina e  $E_{const}$  ao potencial independente da amostra. O último é normalmente considerado constante e negligível, ou então pode ser estimado de acordo com o formalismo de Henderson [15].

Na prática, o ESI é imerso numa solução aquosa que contém os iões a serem medidos, em conjunto com um eléctrodo de referência externo (Nota: este eléctrodo de referência externo pode ser completamente separado ou incorporado no corpo do ESI para formar um eléctrodo combinado). O circuito electroquímico é finalizado através da conexão dos eléctrodos a um mili-voltímetro sensível (figura 2). A diferença de potencial é então desenvolvida através da membrana do ESI quando os iões analito se difundem do lado de concentração mais elevada para o de mais baixa.



**Fig. 2** - Montagem típica para a medição com um ESI.

### **I.2.3.3) Princípio de Operação dos Eléctrodos Selectivos a Iões**

A resposta dos sensores potenciométricos, como os ESI e/ou sensores sensíveis a iões (ex: sensores com um contacto sólido, ou filme polimérico condutor), é um fenómeno complexo, dependente do: tempo; material electroactivo (membrana/filme); solução da amostra; interface membrana/solução; composição da membrana; propriedades termodinâmicas e cinéticas da membrana [16]. Todas estas características têm sido objecto de estudo dos modelos teóricos da resposta dos ESI.

Os modelos clássicos são mais fáceis de compreender e de ser apresentados, sendo alvo de estudo de vários artigos. Assim, em seguida encontra-se resumido o modelo clássico de limite de fase.

## Modelo de Limite de Fase

O modelo do limite de fase, considera o potencial da membrana como o somatório dos potenciais formados na interface membrana - solução, e geralmente negligencia qualquer potencial de difusão no interior da membrana, o que significa que os parâmetros cinéticos de todas as espécies carregadas envolvidas (ex: mobilidades iónicas) são iguais:

$$E_M = E_{\text{cons}} + E_{\text{PB}} \quad (2)$$

Onde o  $E_{\text{PB}}$  é o potencial de limite de fase na interface membrana-amostra, o qual pode ser derivado a partir das seguintes considerações termodinâmicas:

$$E_M = E_0 + (RT/zF) \ln a_{1(\text{aq})}/a_{1(\text{org})} \quad (3)$$

Onde o R, T e F são respectivamente, a constante de gases universal, temperatura absoluta e constante de Faraday, z é a carga do ião e  $a_{1(\text{aq})}$  e  $a_{1(\text{org})}$  são as actividades do ião na fase aquosa e orgânica da membrana. O potencial padrão  $E_0$ , é uma função dos potenciais químicos padrão nas respectivas fases:

$$E^0 = u_{(\text{aq})}^0 - u_{(\text{org})}^0 / z F \quad (4)$$

Se  $a_{(\text{org})}$  não depender da  $a_{(\text{aq})}$  é constante e a equação 3 reduz-se à equação de Nernst:

$$E = E^0 + RT/zF \ln a_{1(\text{aq})} \quad (5)$$

o ESI demonstra, então, uma resposta linear para com o logaritmo da actividade do ião, apresentando um declive Nernstiano de 59,2 mV/ década para  $z = 1$  a 25°C. Para a equação 5 ser válida, a actividade do ião na membrana deve ser constante, o que normalmente é assegurado pelo permutador iónico lipofílico presente na membrana [17].

Nas condições ideais, a função da resposta do eléctrodo segue a equação de Nernst, no entanto devido ao facto das membranas não serem perfeitamente selectivas, existem interferências de outras espécies no funcionamento dos ESI, as quais podem ser tomadas em conta pela equação de Nikolsky-Eisenman (6), caso seja considerado um gradiente de concentração linear no interior da membrana.

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} a_j^{z_i/z_j}) \quad (6)$$

onde  $a_j$  são as actividades das espécies interferentes e  $K_{i,j}^{pot}$  os coeficientes de selectividade respectivos [18]. O  $K_{i,j}$  ou mais exactamente o produto  $K_{i,j} a_j^{z_i/z_j}$  deverá ser um valor negligenciável, comparativamente com  $a_i$  para que a determinação selectiva dos iões  $i$  seja possível.

A selectividade de um eléctrodo selectivo a iões é geralmente governada por aspectos electrostáticos e estereoespecíficos que envolvem as interacções entre ionóforo/permutador iónico e o analito na interface membrana/solução. É definida como a capacidade de um ESI em distinguir o analito entre diferentes iões na mesma solução.

A selectividade das membranas dos ESI é avaliada pelo coeficiente de selectividade potenciométrico ( $K^{pot}$ ). Os valores de  $K^{pot}$  quantificam a interferência de um determinado composto: quanto menor for o seu valor, menor interferência o composto causa [19].

Os coeficientes de selectividade podem ser determinados por diferentes métodos, que fazem parte de dois grupos maioritários: o método das soluções mistas (MSM) e o método das soluções separadas (MSS) [19].

O método das soluções separadas envolve a medição de duas soluções separadas, uma contendo apenas o ião primário  $A$  com a actividade  $a_A$ , e a outra contendo o ião interferente,  $B$ , à mesma actividade  $a_A=a_B$ . O coeficiente de selectividade é então calculado a partir dos dois valores de fem observados,  $E_A$  e  $E_B$ :

$$K_{A,B}^{pot} = a_A^{(1-Z_A/Z_B)} e^{(E_B - E_A)Z_A F / (RT)} \quad (7)$$

O método das soluções mistas incorpora vários métodos como o método das duas soluções, o método do ião primário fixo, o método do potencial “matched” e ainda o método do interferente fixo [19].

O método das duas soluções envolve a medição dos potenciais de uma solução pura do íon primário,  $E_A$ , e de uma solução mista que contém o íon primário e o íon interferente,  $E_{A+B}$ . O coeficiente de selectividade é calculado através da inserção do valor da diferença de potencial,  $\Delta E = E_{A+B} - E_A$ , na seguinte equação:

$$K_{A,B}^{pot} = a_A \left( e^{\frac{\Delta E Z_A F}{RT}} - 1 \right) / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (8)$$

O método do interferente fixo consiste na medição da fem de um ESI em soluções com actividade constante do íon interferente,  $a_B$ , fazendo-se então variar a actividade do íon primário,  $a_A$ . A intersecção das porções lineares extrapoladas, da representação gráfica, indicam o valor de  $a_A$ , que é posteriormente usado para calcular o  $K_{A,B}^{pot}$ , a partir da seguinte equação:

$$K_{A,B}^{pot} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (9)$$

Onde  $Z_A$  e  $Z_B$  (carga do analito e do interferente) possuem o mesmo sinal, positivo ou negativo [19].

Quando a fem de uma célula de um ESI é medida para soluções de actividade constante do íon primário,  $a_i$ , variando-se a actividade do íon interferente,  $a_j$ , o método denomina-se método do íon primário fixo.

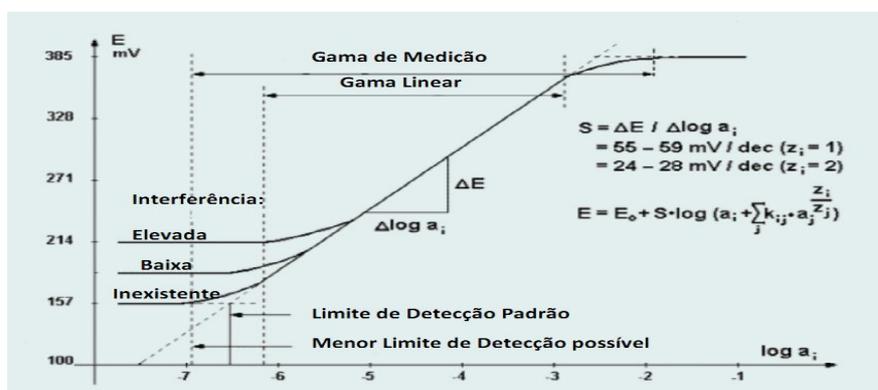
Por último, o método do potencial coincidente. Este não depende, de todo, da equação de Nicolsky-Eisenman. Neste método o coeficiente de selectividade é definido como a razão entre a actividade do íon primário e dos íons interferentes que apresentam a mesma mudança de potencial sob as mesmas condições. Primeiramente, é registado a diferença de potencial ( $\Delta E$ ) numa solução de referência contendo a actividade do íon primário fixa. Em seguida, é adicionada uma solução contendo o íon interferente à solução anterior, com o íon primário, até que se verifique a mesma diferença de potencial. Sendo então o coeficiente de selectividade calculado:

$$K_{A,B}^{pot} = (a'_A - a_A) / a_B \quad (10)$$

## Limite de Detecção

Um dos parâmetros mais importantes na caracterização do desempenho analítico de um ESI é o limite de detecção (figura 3).

De acordo com as recomendações da IUPAQ, o limite de detecção é definido como o ponto onde o potencial do eléctrodo se desvia 18/z mV da resposta teórica. Na prática, limites de detecção na ordem de  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  molL<sup>-1</sup> são comuns para a maior parte dos ESI [19]. O limite de detecção observado é muitas vezes imposto por espécies interferentes ou impurezas [17].



**Fig. 3** – Gráfico representativo da calibração de um sensor e da determinação do limite de detecção para eléctrodos selectivos a iões.

## Tempo de Resposta

Outro dos parâmetros usados para caracterizar o desempenho analítico dos ESI é o tempo de resposta.

De acordo com as recomendações da IUPAQ, o tempo de resposta foi definido como o tempo decorrido entre o instante no qual o ESI e o eléctrodo de referência eram mergulhados na solução da amostra e o primeiro instante ao qual o potencial da célula se tornava igual ao seu valor no estado de equilíbrio variando apenas 1 mV [20]. Resumindo,

na prática o tempo de resposta corresponde ao tempo necessário para a obtenção de um potencial estável quando se remove o eléctrodo de uma solução para outra com concentração diferente. O tempo de resposta é afectado pelo tipo de eléctrodo, magnitude e direcção da mudança de concentração, histerese, temperatura e presença de iões interferentes. Na prática, normalmente é necessário esperar vários minutos para completar 10% da estabilização de forma a obter os resultados mais precisos [17].

### **Processo de Transdução ião-a-electrão de ESI em Geral**

Todos os tipos de ESI, são sistemas assimétricos, pois os iões não entram no equipamento electrónico usado para medir o potencial. A um determinado ponto ocorre a transdução do sinal iónico em sinal electrónico via uma reacção redox reversível. No caso do eléctrodo convencional Ag/AgCl em contacto com os iões cloreto, a reacção redox reversível envolve a dupla redox Ag/Ag<sup>+</sup>:



Como o eléctrodo contém um número finito de material redox activo, o eléctrodo tem uma capacitância redox finita (C) [16]. Para uma dada corrente constante (i), irá ocorrer uma mudança no potencial do eléctrodo (E) com o tempo (t):

$$\frac{\Delta E_C}{\Delta t} = \frac{i}{C} \quad (12)$$

Além disso, a resistência do eléctrodo (R), incluindo todas as resistências do eléctrodo independentes do tempo, irão fornecer um deslocamento constante do potencial:

$$\Delta E_R = iR \quad (13)$$

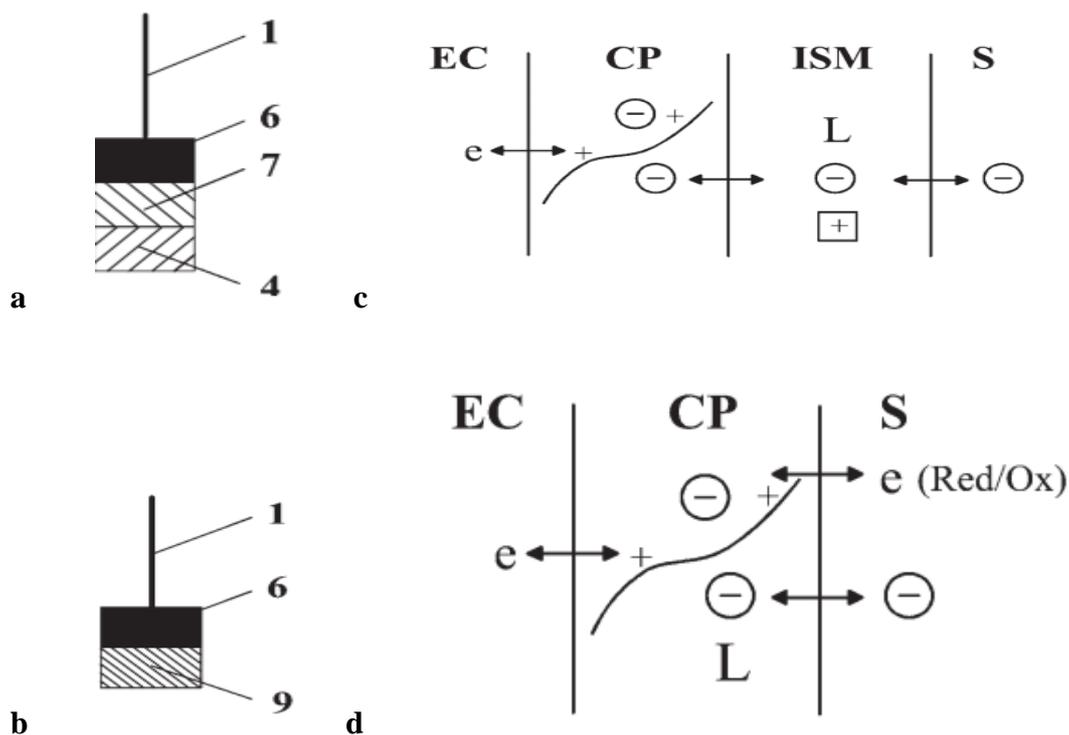
As duas últimas equações representam o caso possível mais simples que negligencia o processo de difusão/migração na membrana selectiva e o transdutor ião-a-electrão. No entanto, este simples modelo RC foi verificado experimentalmente e é usado maioritariamente para conceptualizar o processo de transdução ião-a-electrão nos ESI [16].

### **Eléctrodos Selectivos a Iões de Contacto Sólido**

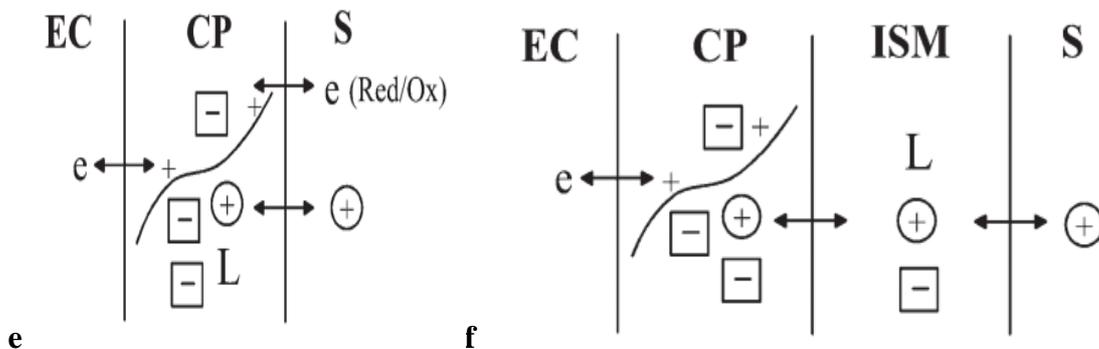
Para além dos convencionais ESI com uma solução de enchimento interno e eléctrodo de referência Ag/AgCl interno para assegurar o contacto eléctrico, existem ESI que não possuem essa solução de enchimento, sendo esta substituída por um contacto eléctrico sólido (ex: fio de cobre). Este tipo de ESI denomina-se ESI de contacto sólido. Nesta configuração surge o problema de transferência de carga do condutor iónico para o condutor electrónico – fio metálico. Pelo que várias abordagens têm sido sugeridas para facilitar a transferência de carga na interface membrana/contacto sólido, sendo uma delas a utilização de polímeros condutores.

O princípio de operação do polímero condutor pode depender do modo como o polímero é usado para introduzir selectividade. A selectividade iónica pode ser introduzida usando o polímero condutor apenas como transdutor ião-a-electrão, funcionando como contacto sólido. Nestes ESI de contacto sólido, a selectividade iónica é determinada maioritariamente pela membrana selectiva a iões [21]. Uma outra possibilidade para induzir a selectividade é a incorporação dos sítios de ligação directamente na matriz do polímero condutor (ex: através da realização da impressão molecular na superfície do eléctrodo via electropolimerização do polímero condutor, ou através do estabelecimento de ligações covalentes/aprisionamento dos sítios de ligação na rede polimérica) [22]. Na figura 4 encontra-se representado um esquema ilustrativo da constituição e processo de transdução dos ESI de contacto sólido que incorporam polímeros condutores.

### Eléctrodo Selectivo a Aniões - Contacto Sólido



### Eléctrodo Selectivo a Catiões - Contacto Sólido



**Fig. 4** – a-b) ESI com um polímero condutor como membrana sensível. 1- condutor electrónico; 6- Disco de Platina; 7- Polímero condutor; 4-Membrana; 6- Disco de Platina; 9- Polímero condutor contendo sítios de reconhecimento iónico (ionóforo). [22] c-f) Princípio de operação de ESI de contacto sólido baseados num polímero condutor oxidado como membrana sensível. EC- Eléctrodo Condutor; CP- polímero condutor; ISM- Membrana selectiva a iões; S- solução; e- electrão; + - “cavidade/buraco” CP oxidado; L- sítio de

reconhecimento iónico (móvel/fixo); Os iões primários estão rodeados por um círculo e os contra-íões por um quadrado [22].

### **I.3) Tecnologia de Impressão molecular**

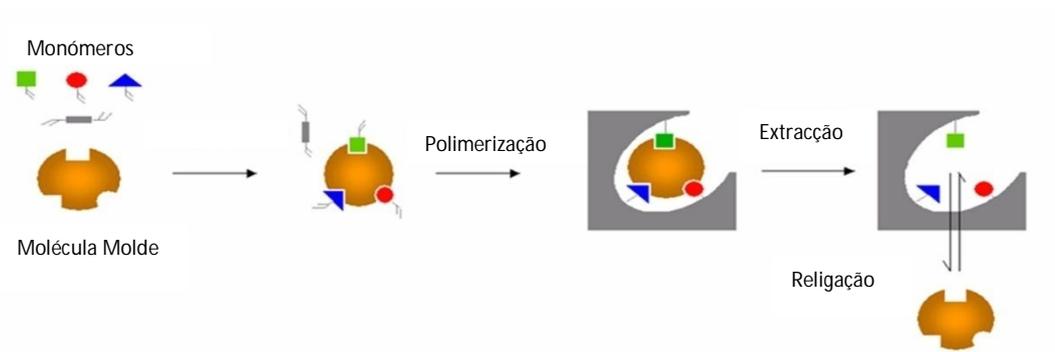
Uma abordagem para a construção de camadas de reconhecimento dos sensores que tem ganho cada vez mais popularidade é a impressão molecular.

#### **I.3.1) Princípio geral da Impressão Molecular**

A impressão molecular envolve a preparação de um material sólido, normalmente um polímero sintético, contendo cavidades que possuem a forma e grupos funcionais complementares à molécula molde (figura 5).

Tradicionalmente, os processos de impressão molecular são compostos pelos seguintes passos:

- 1- Preparação do conjugado covalente ou não covalente entre o monómero funcional e a molécula molde, num solvente apropriado ou líquido dispersivo, anteriormente à adição do agente de reticulação – estabelecimento de ligações covalentes ou não covalentes.
- 2- Polimerização do conjugado monómero - molécula molde, na presença de um agente de reticulação – fixação da estrutura dos conjugados na rede tridimensional polimérica.
- 3- Posterior remoção da molécula molde a partir do polímero - o espaço inicialmente ocupado pela molécula molde, fica livre, permanecendo memorizada a estrutura da molécula molde, originando assim um receptor específico para o mesmo [23].



**Fig. 5** - Princípio da técnica de Impressão molecular.

As interações existentes entre a molécula molde e o polímero podem ser de carácter covalente ou não covalente [24]. As impressões covalente e não covalente são as abordagens mais populares para a síntese de PMI, existindo no entanto outras como a semi-covalente, não covalente estequiométrica e a impressão mediada por iões metálicos [40].

### **I.3.2) Tipos de Impressão Molecular**

#### **I.3.2.1) Impressão covalente**

A impressão covalente teve início com o grupo de Wulff. [40] Nesta os monómeros funcionais formam complexos com as moléculas molde através de ligações covalentes (como éster de boronato, cetal ou acetal, base de Schiff) anteriormente à polimerização. A subsequente religação dos analitos ao polímero impresso dá-se através da formação de ligações covalentes entre eles.

Este tipo de impressão tem como vantagem o facto dos grupos funcionais se encontrarem apenas associados com o sítio da molécula molde, devido à maior estabilidade das ligações covalentes. Assim, esta abordagem fornece sítios de ligação mais homogéneos, no entanto a religação é lenta, uma vez que as ligações covalentes entre o modelo e o MIP têm de ser novamente formadas [26].

Infelizmente, apenas um grupo limitado de compostos [álcoois (dióis), aldeídos, cetonas, aminas e ácidos carboxílicos] podem ser impressos por esta abordagem [27].

### I.3.2.2) Impressão não covalente

A impressão não covalente foi primeiramente realizada por Mosbach e os seus colaboradores [17]. Nesta, as interações entre o monómero funcional e a molécula molde, bem como entre o polímero impresso e o analito, baseiam-se em forças não-covalentes como ligações de hidrogénio, iónicas, interações dipolo-dipolo, ligações  $\pi$ - $\pi$ , etc. [27].

A abordagem não covalente tem sido a mais usada, devido à sua simplicidade, fácil produção, maior variedade de monómeros funcionais disponíveis e ainda devido à cinética de religação da molécula molde mais rápida [25,27,28].

Nesta, a molécula impressa é simplesmente misturada com os monómeros e agentes de reticulação num solvente apropriado anteriormente à iniciação da polimerização. Embora centenas de monómeros e vários agentes de reticulação estejam disponíveis, poucos foram usados na maioria dos estudos. Normalmente os monómeros funcionais mais usados incluem o ácido metacrílico, 2- e 4-vinilpiridinas, ácido trifluorometilacrilico, acrilamida e o hidroxietilmetacrilato. Os agentes de reticulação incluem o dimetacrilato de glicol, divinilbenzeno e o trimetilacrilato de trimetilolpropilo [23].

A eficiência máxima da formação da impressão ocorre quando a reacção de polimerização é realizada usando um solvente aprótico tão polar quanto possível, de modo a que a solubilidade da espécie impressa não seja comprometida. Assim a intensidade máxima das interações não-covalentes (interações dependentes da polaridade do solvente) é assegurada.

A limitação desta técnica deve-se ao facto da molécula molde e o monómero terem de formar um número suficiente de interações intermoleculares não-covalentes para gerar a cavidade de ligação durante a polimerização. Consequentemente, a impressão não covalente não é bem sucedida para moléculas molde que não possuem grupos funcionais apropriados [28].

Uma alternativa poderá ser, o uso combinado das abordagens anteriores, usando as ligações covalentes para a impressão e as não covalentes para o passo de religação, constituindo assim a abordagem semi-covalente [23]. Esta abordagem visa tirar partido das vantagens de cada uma das anteriores.

Através destas duas abordagens (covalente e não covalente), os PMI devem ser capazes de reconhecer a molécula impressa (ou outra estruturalmente relacionada) de maneira selectiva. A afinidade da ligação pode ser moderada ou elevada, dependendo da aplicação desejada.

#### **I.4) Variáveis Experimentais - Controlo do processo de Síntese**

Durante o processo de síntese de PMI, são várias as variáveis que influenciam a sua capacidade e selectividade, pelo que todas elas devem ser criteriosamente estudadas de forma a se obter o máximo de eficiência. Entre elas encontram-se:

##### **I.4.1) Molécula molde**

O primeiro estudo publicado sobre o efeito da estrutura do modelo, teve a autoria do grupo de Wulff, e envolvia o reconhecimento enantioselectivo do ácido glicérico em PMI sintetizados pela abordagem covalente (anteriormente descrita) [39]. Desde então vários estudos têm sido realizados sobre o efeito da estrutura do polímero e do modelo nas propriedades de ligação de PMI covalentes e não-covalentes.

Em todos os processos de impressão molecular a molécula molde desempenha um papel de importância central uma vez que direcciona a organização de grupos funcionais dos monómeros funcionais [39]. As interacções de complementaridade entre a molécula molde, monómero funcional e agente de reticulação são necessárias para criar uma organização molecular de curta distância no sítio receptor. A estequiometria e a concentração do modelo e monómeros influenciam quer a morfologia do polímero quer a selectividade do mesmo [38].

Um estudo de Ellwanger *et al.* comparou métodos para a remoção completa do modelo de forma a minimizar a perda da fase estacionária, quando usados como fase estacionária na técnica de extracção em fase sólida [62]. O uso de análogos, as chamadas

moléculas molde fictícias (*dummy template*) pode ajudar a ultrapassar estes problemas [31, 33].

Infelizmente, por várias razões, não é possível usar todas as moléculas como moléculas molde. Em termos de compatibilidade com a polimerização radicalar livre, as moléculas molde deveriam idealmente ser quimicamente inertes sob as condições em que ocorre a polimerização [23].

Para além do tipo de molécula molde, também é sabido que a razão entre a molécula molde e o monómero funcional desempenha um papel determinante na selectividade, homogeneidade, sensibilidade e tamanho final dos PMI, devendo por isso ser optimizada [34, 38, 39]. Para a impressão molecular covalente, tal não é necessário, pois a molécula molde dita o número de monómeros funcionais que se podem ligar covalentemente, e para além disso, os monómeros funcionais encontram-se ligados estequiométricamente. Para a impressão não covalente, a razão óptima, molécula molde/monómero, pode ser atingida empiricamente através da avaliação de vários polímeros com diferentes formulações, com crescentes quantidade de molécula molde. Esta abordagem baseia-se no princípio de que cada complexo de pré-polimerização, entre a molécula molde e o monómero, é responsável pela formação de um sítio de ligação. Assim, aplicando o princípio de Le Chatelier ao complexo formado *a priori*, aumentando a concentração dos componentes de afinidade do complexo na mistura de pré-polimerização levará ao aumento do número de complexos de pré-polimerização [38]. Assim, haverá um aumento do número final de sítios de ligação resultando no aumento da capacidade de ligação e de selectividade por grama de polímero.

Andersson e tal. estudaram o efeito desta razão na selectividade do PMI sintetizado, tendo constatado que as razões mais pequenas levavam à produção de PMI menos selectivos devido à quantidade insuficiente de monómero [36]. Normalmente o excesso do monómero relativamente à molécula molde, tem produzido os melhores resultados [37]. Contudo após uma percentagem crítica de molécula molde, qualquer excesso de molécula molde adicionada não terá efeito na formação dos sítios de ligação, pois não têm monómeros funcionais para complexar.

Experiências de optimização referidas na literatura têm mostrado que esta razão

tem um limite mínimo de 1,0 e um valor óptimo próximo de 4,0. No entanto, a razão óptima deve ser determinada individualmente para cada molécula molde [38].

#### **I.4.2) Monómero Funcional**

Os monómeros funcionais são responsáveis pelas interações de ligação que ocorrem nos sítios de ligação impressos. Para protocolos de impressão não-covalente, são normalmente usados em excesso relativamente à molécula molde para favorecer a formação do complexo monómero-molécula molde [37].

É importante que a funcionalidade da molécula molde permita a formação do complexo de pré-polimerização, e consequentemente o efeito de impressão (ex: dador de ligações de hidrogénio com aceitador de ligações de hidrogénio). A complexação da molécula molde com o monómero funcional pode influenciar a reactividade do monómero até um certo ponto, resultando em perturbações na electrónica e/ou estereoquímica do monómero [39].

Existe uma vasta gama de monómeros que podem ser utilizados na síntese de PMI, estes podem ser básicos (ex: vinilpiridina), ácidos (ex: ácido metacrílico), monómeros polares (ex: metacrilato de *N,N,N*-trimetilaminoetilo) estabelecadores de ligações de hidrogénio (ex: acrilamida), hidrofóbicos (ex: estireno) , entre outros [40]. Estes monómeros normalmente possuem constantes de associação com a molécula molde que são muito baixas para formar um complexo estável, devendo por isso ser usados em excesso de modo a deslocar o equilíbrio para a formação do complexo [40]. Monómeros mais “sofisticados” têm sido usados para obter interações mais fortes no complexo de pré-polimerização, em solventes polares como a água, através do estabelecimento de ligações de coordenação com monómeros de um quelato metálico [41,42].

### **I.4.3) Agente de Reticulação**

Num polímero impresso o agente de reticulação é responsável pelo controlo da morfologia da matriz polimérica. Cabe também ao agente de reticulação a estabilização do sítio de ligação impresso, bem como a estabilização mecânica da matriz [39].

Na síntese, têm sido preferidas razões de agente de reticulação elevadas para que se obtenham não só materiais macroporosos como também mecanicamente estáveis. Tal pode dever-se ao facto da utilização de uma elevada concentração de agente de reticulação permitir manter a estrutura tridimensional complementar, quer na forma quer na funcionalidade química da molécula molde após a remoção deste. Consequentemente, os grupos funcionais encontram-se juntos numa configuração óptima para a religação da molécula molde, permitindo ao receptor o reconhecimento do substrato original e consequentemente a elevada especificidade do polímero. Em regra, os polímeros apresentam graus de reticulação superiores a 80% [43].

Um largo número de agentes de reticulação têm sido usados em estudos de PMI, sendo o divinilbenzeno e o dimetacrilato de etileno glicol os mais usados [40]. Outros agentes de reticulação portadores de três ou mais grupos (met) acrilato como o trimetacrilato de trimetilolpropilo (TRIM) e triacrilato de pentaeritritol mostraram ser superiores ao dimetilacrilato de etilenoglicol em algumas aplicações [44 - 46].

O trimetacrilato de trietanolamina foi também usado como agente de reticulação e o 1,3-di-isopropenilbenzeno tem sido usado como alternativa ao divinilbenzeno [46].

Um parâmetro importante que tem demonstrado ter influência na rigidez, selectividade e capacidade de ligação dos PMI sintetizados é a razão entre o agente de reticulação e o monómero funcional.

Um estudo efectuado por Yoshimatsu *et al.* demonstrou que é possível ajustar quer o tamanho físico, das micropartículas de polímero, quer a capacidade de ligação da molécula molde através da variação da razão molécula molde/monómero funcional/agente de reticulação, em sistemas de polimerização por precipitação [35].

Outros estudos demonstraram que um excesso do monómero funcional (ácido metacrílico), levava ao aumento de ligações não específicas que diminuía a selectividade do PMI, havendo um mínimo de quantidade de agente de reticulação necessário para a formação de uma rede polimérica que mantenha a fidelidade dos sítios de ligação. A maior parte dos estudos efectuados, indicam que a percentagem óptima de agente de reticulação se encontra na gama de 50 a 80%, relativamente ao monómero funcional [38].

A formulação óptima da razão monómero/agente de reticulação deve ser determinada por optimização empírica através da síntese e avaliação de vários polímeros. Este processo requer bastante tempo e os resultados obtidos não podem ser generalizados para qualquer substrato/molécula molde.

#### **I.4.4) Iniciador**

O processo de iniciação da polimerização deve ser adequado à molécula molde. Se esta for fotoquímica ou termicamente instável, então os iniciadores que podem ser activados do mesmo modo não são aconselháveis. Quando a complexação é feita por ligações de hidrogénio, então são preferíveis temperaturas de polimerização baixas, e sob estas circunstâncias iniciadores activados fotoquimicamente são mais aconselháveis, uma vez que podem operar de modo eficiente a baixa temperatura [40].

A decomposição térmica de azo-inibidores é a fonte comum mais usada na formação de PMI baseados em divinilbenzeno e metacrilato [40]. A decomposição fotoquímica do azo-bis-isobutironitrilo permite que os PMI sejam preparados a uma temperatura baixa, resultando num aumento na eficiência de separação dos polímeros. O iniciador 2,2'-azo-bis-(cyclo-hexilcarbonitrilo) possui uma solubilidade superior ao azo-bis-isobutironitrilo a temperaturas inferiores, o que pode representar uma vantagem na iniciação fotoquímica [47].

#### I.4.5) Temperatura

A temperatura a que decorre o processo de polimerização/impressão molecular influencia o tempo de separação de fase. Uma vez que o equilíbrio entre o monómero funcional e o modelo é dependente da temperatura, esta afecta também a selectividade e capacidade do PMI [40].

Vários estudos têm mostrado que a polimerização de PMI a baixas temperaturas leva à formação de polímeros mais selectivos, comparativamente aos que se formam a temperaturas elevadas. PMI preparados a baixas temperaturas com o uso de um iniciador activado fotoquimicamente, exibiram uma maior capacidade de separação de enantiómeros. Tal foi atribuído à maior estabilidade do complexo monómero-modelo devido à entropia mais favorável, levando a impressões bem definidas no polímero resultante. Shea *et al.* concluíram que a religação da 9-etiladenina foi superior para o polímero preparado a baixas temperaturas, usando um fotoiniciador, quando comparada com polímeros preparados por polimerização térmica [48].

Normalmente a polimerização é realizada à temperatura de 60°C, pois as temperaturas elevadas têm um impacto negativo na estabilidade do complexo.

Quando a complexação é mediada por ligações de hidrogénio, então são preferíveis temperaturas de polimerização mais baixas bem como iniciadores activados fotoquimicamente, uma vez que operam de uma maneira mais eficiente a baixa temperatura. Por exemplo, Mosbach *et al.* apresentaram um estudo com PMI, onde um polímero foi polimerizado a 60°C e o outro foi polimerizado a 0°C [47,49]. Os resultados mostraram que uma melhor selectividade podia ser conseguida à temperatura mais baixa comparativamente a polímeros idênticos termicamente polimerizados. A razão foi postulada com base no princípio de Le Chatelier, o qual afirma que temperaturas menores irão conduzir o complexo pré-polimérico em direcção à formação do complexo, aumentando o número e a qualidade dos sítios de ligação formados.

#### **I.4.6) Solvente**

Durante o processo de síntese do polímero em solução, as propriedades do solvente desempenham um papel dinâmico que está dependente do estado de crescimento do polímero.

O solvente é usado primeiramente para que todos os componentes necessários para a polimerização e consequente impressão molecular estejam numa única fase; em segundo para criar poros no polímero macroporoso; em terceiro, devem possuir pouca polaridade de forma a reduzir as interferências durante a formação do complexo entre a molécula impressa e o monómero, para a obtenção de elevada selectividade.

Na preparação dos polímeros macroporosos, a natureza e a quantidade do solvente podem ser usados para controlar a morfologia e o volume total do poro (sendo por isso muitas vezes referido como “porogen”) [50]. Mais especificamente, o uso de um solvente termodinamicamente adequado tende a levar à produção de polímeros com poros bem desenvolvidos e áreas de superfície com elevada especificidade e vice-versa. Para além disso, o solvente determina o tempo de separação de fase durante a polimerização (formação de partículas sólidas a partir da solução), que é um determinante importante da morfologia do polímero, porosidade e acessibilidade do sítio de ligação [51].

O solvente na impressão não-covalente, deve ser criteriosamente escolhido de forma a maximizar a formação do complexo entre o monómero funcional e a molécula molde, não devendo por isso interagir fortemente com ambos, o que normalmente implica o uso de solventes não-próticos, apolares [56, 57].

A simulação molecular da interacção do solvente com o monómero e a molécula molde, pode ajudar a escolher o solvente mais apropriado, como uma ferramenta complementar à selecção experimental [53].

O uso de água em meio não-polar tem mostrado aumentar as interacções hidrofóbicas, já as interacções iónicas são aumentadas através da presença de modificadores orgânicos em “porogens” aquosos entre o modelo e o monómero funcional [54].

Nos últimos anos o CO<sub>2</sub> supercrítico tem sido proposto como um “porogen” alternativo par a produção de PMI [55].

#### **I.4.7) Pressão**

Um outro parâmetro que necessita de ser investigado é a pressão da polimerização. Os efeitos da pressão na associação molecular são normalmente pequenos e consideravelmente menores que os efeitos da temperatura e do solvente. No entanto, Sellergren et al. constataram que impressões moleculares a pressões mais elevadas resultavam em melhores retenções da molécula molde, provavelmente devido à maior estabilização do conjunto monómero-molécula molde [56]. Piletsky et al. realizaram um estudo sobre a influência da pressão da polimerização e do inchamento do polímero no desempenho dos PMI. Tendo verificado que a pressão da polimerização desempenhava um papel importante, embora indirecto, na morfologia e desempenho dos materiais sintetizados, onde o mecanismo do efeito da pressão pareceu estar relacionado com a sua influência na temperatura de ebulição do solvente usado [57].

Embora o efeito da pressão no desempenho dos PMI necessite de mais estudos, este deve ser analisado e tido em conta no controlo de qualidade da síntese e aplicação dos PMI.

#### **I.4.8) Tempo de Polimerização**

Até à data é aceite por todos, que o prolongamento do tempo de polimerização deverá conduzir a um maior grau de conversão na reacção de polimerização, e consequentemente a um polímero mais reticulado. Polímeros com um maior tempo de polimerização serão mais rígidos e consequentemente irão conter cavidades de impressão molecular com uma forma mais definida, originando polímeros com maior especificidade, como foi constatado por Piletsky et al [57]. Por outro lado, polímeros mais rígidos podem

sofrer uma diminuição da transferência de massa e da cinética de ligação. O balanço entre a rigidez das cavidades impressas vs flexibilidade do polímero permanece ainda pouco esclarecida, necessitando assim de mais estudos experimentais.

## **I.5) Tipos de Polimerização**

Vários tipos de polimerização têm sido desenvolvidos para a síntese de PMI, entre as mais usadas encontram-se:

### **I.5.1) Polimerização Radicalar Livre**

A polimerização radicalar livre é normalmente o método de escolha para a síntese de PMI devido ao facto de poder ser realizada sob condições moderadas (ex: temperatura ambiente e pressões atmosféricas), sendo também bastante tolerável a grupos funcionais de vários monómeros e a impurezas no sistema (ex. água) [39].

A polimerização radicalar desenvolve-se em três passos distintos: iniciação, propagação e terminação.

#### **I) Iniciação**

A primeira etapa da polimerização radicalar livre denomina-se de iniciação e é constituída por dois passos. No primeiro passo o iniciador sofre uma clivagem homolítica originando dois radicais livres activos. No segundo passo, a instabilidade das ligações duplas no monómero torna-o susceptível a reagir com os electrões desemparelhados do radical. Nesta reacção, o centro activo do radical ataca a ligação dupla do monómero ou do agente de reticulação, deixando um electrão desemparelhado, no monómero, como novo centro activo [58]. A activação do iniciador normalmente ocorre por decomposição térmica ou fotólise. Em baixo encontram-se as reacções gerais da etapa iniciação, onde o I

representa o iniciador,  $R$  o radical activado do iniciador,  $M$  o monómero e  $M\cdot$  o monómero activado.



Para a iniciação da polimerização podem ser usados diferentes tipos de iniciadores com diferentes propriedades químicas, sendo normalmente usados em quantidades bastante inferiores às do monómero.

Inúmeros monómeros vinilo podem ser polimerizados eficientemente por este tipo de polimerização, incluindo etileno, estireno, metacrilato entre muitos outros [23].

## **II) Propagação**

Após a iniciação da síntese, segue a fase de propagação. Nesta, o monómero ou o agente de reticulação activado ataca a ligação dupla de outra molécula de monómero, processo que leva ao crescimento da cadeia polimérica.

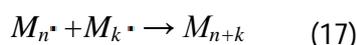
Tipicamente, na polimerização radicalar livre a velocidade de propagação é muito mais rápida que a de iniciação. Assim, quando as cadeias de polímero começam a aumentar propagam-se até um elevado peso molecular antes de terminar. O que significa que mesmo que a quantidade de monómero consumida seja pequena, está sempre presente na solução um produto de elevado peso molecular [58].

## **III) Terminação**

A terminação, geralmente ocorre por duas vias: combinação e dismutação. A combinação ocorre quando o polímero em crescimento finaliza o crescimento através de electrões livres de duas cadeias em crescimento que se juntam e formam uma única cadeia.

A dismutação ocorre quando um radical livre capta um átomo de hidrogénio de uma cadeia activa, originando-se uma ligação dupla na posição do hidrogénio.

A terminação pode também ocorrer através da combinação de uma cadeia activa com um radical do iniciador, transferência de cadeia ou ainda através da interacção com impurezas ou inibidores como o oxigénio. Em baixo encontra-se a equação geral da etapa iniciação, onde o  $M_n \cdot$  e  $M_k \cdot$  representam cadeias em crescimento activas, e  $M_{n+k}$  a cadeia final após a terminação.



A fonte de radicais livres encontra-se normalmente activa durante todo o processo de polimerização. Pelo que, enquanto decorre a polimerização, encontram-se presentes na solução as moléculas de monómero e iniciador que ainda não reagiram, as cadeias em propagação de polímero e as cadeias já terminadas, de elevado peso molecular [58].

### **I.5.2) Polimerização *in-situ***

A impressão molecular *in situ* é uma técnica usada para a preparação de polímeros impressos, que decorre no local onde irão ser directamente utilizados. Assim, os polímeros impressos por esta técnica não necessitam de qualquer subsequente tratamento do material resultante, exceptuando a extracção da molécula molde. A polimerização *in situ*, até à data, é normalmente realizada com recurso à electropolimerização e impressão de superfície.

A electropolimerização, em geral, envolve quer a redução quer a oxidação do monómero, de um polímero condutor, a um potencial que leva à produção de espécies activadas, geralmente um radical aniónico ou catiónico. Estas espécies sofrem um acoplamento para originar os primeiros dímeros e subsequentemente oligómeros e polímero. A grande vantagem da electropolimerização, quando comparada com outras técnicas, reside na sua capacidade de deposição precisa de um filme de reconhecimento, num determinado local da superfície do detector ou eléctrodo originando um revestimento com um filme homogéneo [59]. A espessura do filme e a densidade de deposição é

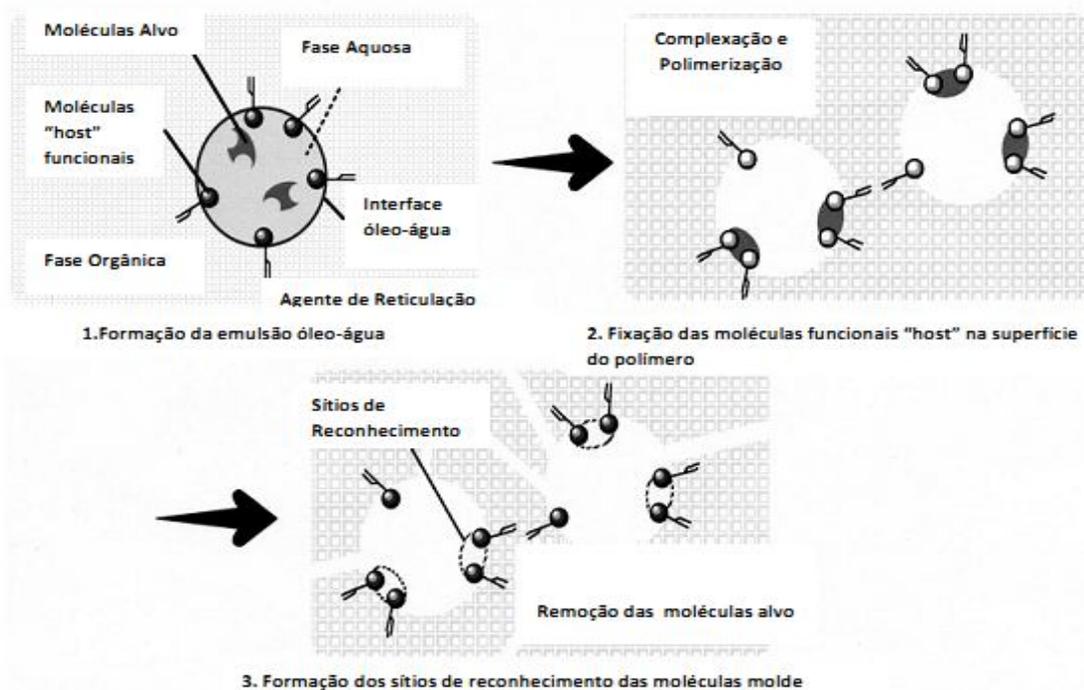
regulada pelas condições de polimerização (ex: voltagem aplicada). Contudo, a electropolimerização produz polímeros com baixo grau de reticulação o que resulta na diminuição do tempo da vida dos sensores [59].

A impressão de superfície caracteriza-se, como o nome indica, pela preparação de PMI na superfície de substratos sólidos, como o vidro ou a sílica.

Esta técnica pode ser dividida basicamente em dois tipos:

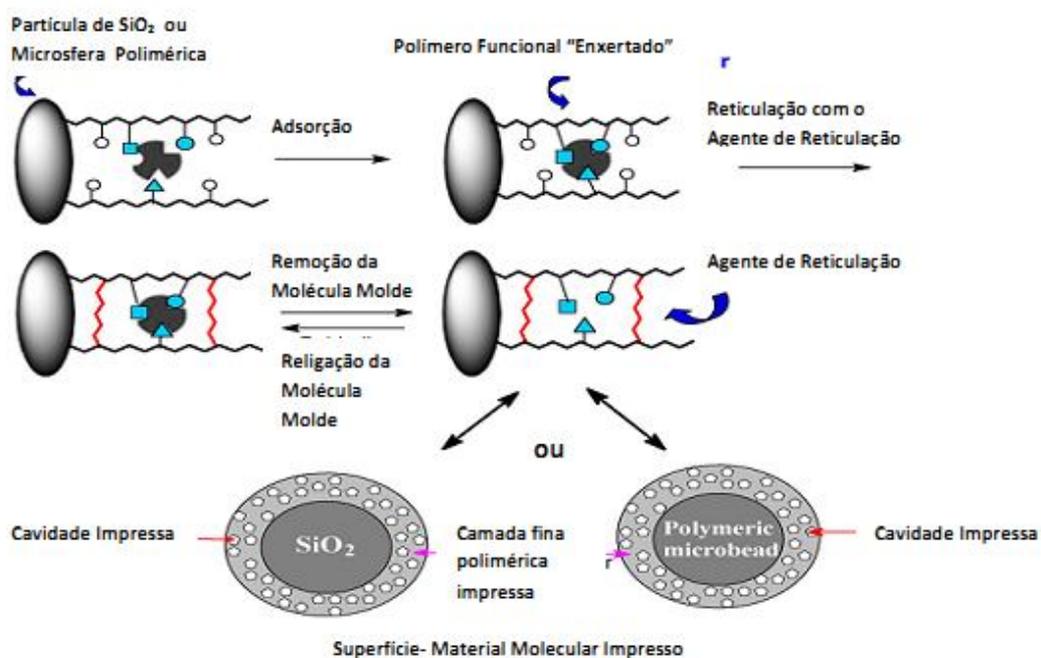
1) Impressão de superfícies baseada na polimerização por emulsão e precipitação:

O polímero é preparado em emulsões de água-óleo. A interface orgânica-aquosa é utilizada como um espaço de reconhecimento para a molécula molde. Esta forma um complexo com a molécula hospedeira, sendo a orientação da molécula funcional fixada na interface (figura 6). Tal proporciona, após a polimerização, a complementaridade dos sítios de reconhecimento para a molécula molde [60].



**Fig. 6** - Esquema ilustrativo da técnica de impressão de superfície baseada na polimerização por emulsão e precipitação [60].

2) Impressão de superfícies baseada na modificação da superfície de partículas de sílica – Neste método existem várias tecnologias, sendo a mais comum a polimerização por enxerto na superfície das partículas de sílica (figura 7). Nesta os polímero funcionais são pré- enxertados na superfície de micropartículas de gel de sílica, formando-se uma camada fina do polímero enxertado. Em seguida promove-se a adsorção das partículas da molécula molde no polímero enxertado, através do estabelecimento de interacções intermoleculares. A impressão da molécula molde é conduzida pela adição de um agente de reticulação que possui dois grupos reactivos [61]. Após a remoção da molécula molde, surgem cavidades impressas específicas e complementares a esta. Estes polímeros impressos possuem um melhor desempenho, sítios de ligação mais acessíveis e transferência de massa mais rápida [61].



**Fig. 7** - Esquema ilustrativo do processo de impressão de superfície baseada na modificação da superfície de partículas de sílica [61].

## I.6) Remoção da Molécula Molde

Após a síntese dos PMI é necessário proceder à remoção da molécula molde para que possa ocorrer a religação da mesma aquando da aplicação final do polímero.

A quantidade de molécula molde que é necessário extrair depende da subsequente aplicação, sendo no entanto normalmente necessária uma extracção de 100% para maximizar a capacidade do polímero. A remoção incompleta da molécula molde pode dar origem a incertezas em aplicações analíticas devido, por exemplo, ao derramamento (“*bleeding*”) de molécula molde não extraída [62]. Uma das razões que pode estar na origem da remoção incompleta das moléculas molde poderá ser o facto de os PMI não possuírem uma rede reticular totalmente homogénea, podendo conter zonas densamente reticuladas que aprisionam a molécula molde impedindo a sua extracção. Para a resolução deste problema têm sido aplicados análogos da molécula molde, denominados de moléculas molde fictícias [63]. A molécula molde fictícia usada deve ser estruturalmente semelhante de modo a ser capaz de formar o efeito de “impressão molecular” semelhante à molécula alvo/molde. Um exemplo típico deste tipo de impressão foi publicado por Andersson, o qual preparou um adsorvente da técnica de mixro-extracção em fase sólida (MFS), selectivo para a bupivacaína através da impressão do seu análogo, a pentilcaína [65].

A extracção das moléculas molde pode ser conseguida através de vários métodos, sendo os mais comuns a extracção por soxhlet, extracção através de lavagens extensivas com solventes e extracção de fase sólida. Existem também estudos onde a remoção das moléculas molde foi feita através de extracção com fluído supercrítico, extracção assistida por microondas e mais recentemente a extracção de solvente acelerada.

## **I.7) Caracterização dos Polímeros Molecularmente impressos**

### **I.7.1) Caracterização morfológica**

As técnicas analíticas mais importantes usadas na caracterização morfológica dos PMI baseiam-se na observação microscópica da superfície do polímero e na medição da porosidade do mesmo.

A superfície do polímero pode ser avaliada quer por microscopia de varrimento electrónico (MVE) quer por microscopia de força atómica (MFA). A microscopia de varrimento permite obter uma imagem superficial das partículas do polímero e da presença de macroporos superficiais, enquanto a MFA proporciona um perfil tridimensional quantitativo da superfície do polímero, que permite diferenciar as fases cristalinas e amorfas [64].

A porosidade do polímero determina a acessibilidade dos analitos aos pontos de união presentes no interior da matriz polimérica, para que quanto maior for a porosidade, mais rápido será o processo de transferência de massa e mais rapidamente se alcançará o equilíbrio [38].

Existem várias técnicas para a avaliação da porosidade, sendo as mais usadas aquelas que se baseiam na intrusão/extrusão de mercúrio ou adsorção/desadsorção de nitrogénio, sendo a primeira mais adequada no caso da presença de macroporos, com um tamanho superior a 50 nm [65].

Estas técnicas baseiam-se na medição da quantidade de nitrogénio ou mercúrio que é capaz de atravessar o material num determinado período de tempo, proporcionando informação acerca da área superficial específica, o volume do poro específico, a distribuição do tamanho dos poros e o seu diâmetro médio [63].

## I.7.2) Caracterização Química

Devido á baixa solubilidade dos polímeros de impressão molecular, as técnicas químicas mais usadas na caracterização química deste tipo de materiais são aquelas que permitem a análise em estado sólido.

A análise elementar do polímero proporciona informação acerca do conteúdo dos diferentes elementos (C, H, O, S, etc.) presentes no polímero. Mediante a comparação do resultado com dados teóricos, esta técnica pode utilizar-se para determinar, por exemplo, a quantidade de monómero funcional incorporada na matriz polimérica [66].

A análise espectroscópica do polímero, tanto mediante a espectroscopia de infravermelho (EI) como UV-Vis proporciona informação útil acerca do grau de polimerização, dos grupos funcionais presentes no polímero, a relação estequiométrica entre o monómero funcional e a molécula molde [46].

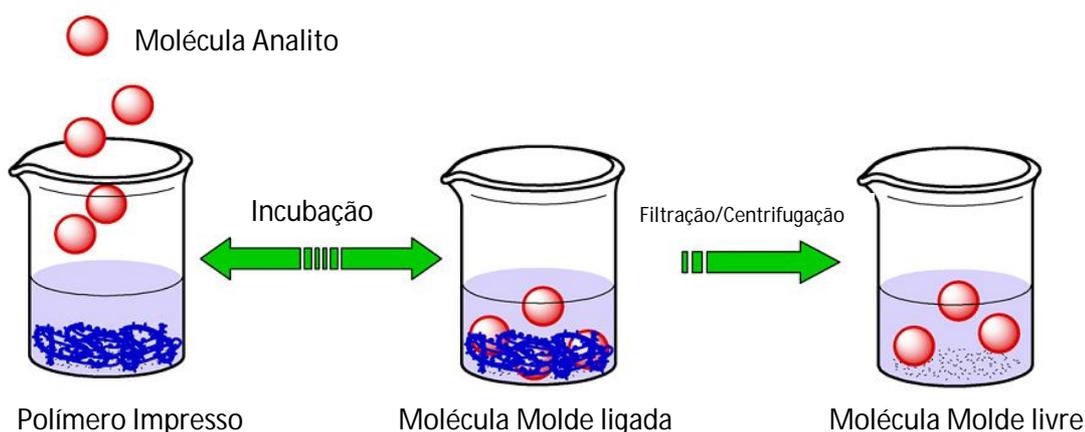
A técnica de EI baseia-se no facto das ligações e grupos das ligações vibrarem a determinadas frequências da radiação de infravermelho que são características daquela molécula. Durante a análise de infravermelho por transformadas de Fourier, um feixe da fonte de radiação infravermelha é dividido em dois feixes, sendo um deles reflectido por um espelho fixo enquanto o outro é reflectido por um espelho móvel. Todas as frequências são medidas simultaneamente durante um único varrimento do espelho móvel, produzindo um interferograma. Os dados recolhidos são convertidos a partir do domínio do tempo para o domínio da frequência através de uma técnica matemática chamada de transformada de Fourier [67]. A transmitância e reflectância dos raios de infravermelho provenientes da amostra, a diferentes frequências, são convertidos na forma de um espectro com o número de onda no eixo das abcissas e intensidade de absorção ou percentagem de transmitância no eixo das ordenadas.

Por último, o estudo através da ressonância magnética nuclear de carbono e protão permite avaliar o grau de polimerização, estabelecendo o número de ligações duplas presentes no mesmo, e ainda a estabilidade do complexo de pré-polimerização [46].

### I.7.3) Caracterização da Capacidade de Retenção/Religação do Analito

#### I.7.3.1) Estudo de Religação da molécula molde

Um dos métodos experimentais para avaliar os sítios de ligação dos PMI consiste no método de religação em lote (figura 8). Neste método, uma determinada quantidade de PMI é posta em contacto com soluções de diferentes concentrações da molécula molde. Após o contacto durante um determinado tempo, suficiente para que seja atingido o equilíbrio, a solução pode ser separada do polímero por filtração ou centrifugação. Esta solução é então usada para medir a concentração de molécula molde (substrato) livre em cada recipiente, sendo determinada através da absorção de luz ultravioleta, emissão, fluorescência ou radioatividade. A quantidade de substrato ligado/adsorvido no interior do PMI pode então ser calculado através da subtração da concentração de substrato livre inicial, e após o contacto com o PMI. Como o polímero é sólido, a quantidade de substrato ligado é dividida pela quantidade de polímero usada, para que seja obtida a quantidade de substrato ligado por grama de polímero. Cada valor determinado experimentalmente (quantidade de molécula molde ligada e a correspondente quantidade livre) é usado para estabelecer uma isotérmica de ligação, usando modelos matemáticos que permitem estimar os parâmetros de ligação dos sítios impressos no PMI (isotérmicas de adsorção).



**Fig. 8** - Esquema representativo do estudo de religação – obtenção da isotérmica de ligação experimental.

### **I.7.3.2) Isotérmicas de Adsorção**

Nos polímeros molecularmente impressos, em estado sólido, é habitual descrever os diferentes mecanismos de adsorção e retenção da molécula molde mediante a avaliação da isotérmica de adsorção, a qual permite obter informação sobre a selectividade, constante de afinidade e densidade dos sítios de ligação.

Uma isotérmica de ligação representa uma medida da relação entre as concentrações de equilíbrio da molécula analito, que se encontra absorvida pelo polímero e livre em solução, para uma determinada gama de concentração.

As propriedades de ligação podem ser calculadas a partir da isotérmica de ligação obtida experimentalmente (estudo de religação) através do ajuste desta a modelos de adsorção/ligação específicos [68].

Segundo Shimizu os modelos de adsorção usados para a caracterização dos PMI podem ser classificados em duas categorias [68]:

- a) Modelos de distribuição discreta, os quais assumem uma superfície homogénea dos PMI
- b) Modelos de distribuição contínua, que têm em conta a heterogeneidade da superfície.

#### **a) Modelos de Distribuição Discreta**

##### **Isotérmica de Langmuir e Bi-Langmuir**

As isotérmicas de Langmuir e Bi-Langmuir baseiam-se em três princípios:

1. A adsorção tem apenas lugar na superfície em monocamada;
2. Os sítios de ligação são equivalentes e podem apenas estabelecer ligação com uma molécula alvo/molde;
3. A capacidade da molécula molde/alvo estabelecer ligação com um determinado sítio de ligação não depende da ocupação dos sítios de ligação vizinhos.

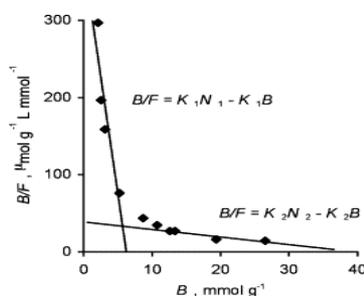
Os modelos discretos de Langmuir e Bi-Langmuir (equações 19 e 20) podem ser facilmente aplicados através de gráficos Scatchard, permitindo a obtenção directa dos parâmetros de ligação: afinidade de ligação ( $k$ ) e número de sítios de ligação ( $N$ ).

Na análise Scatchard, os dados experimentais obtidos para a isotérmica de ligação são representados graficamente no formato  $B/F$  versus  $B$  ( $B$  = quantidade de molécula molde adsorvida;  $F$ = quantidade de molécula molde livre em solução). Em sistemas homogéneos, que contêm apenas um tipo de sítios de ligação, o gráfico de Scatchard assume a forma linear, com um declive igual a  $-K$  e o valor da intersecção do eixo das ordenadas corresponde ao parâmetro  $N$  :

$$B/F = KN - KB \quad (18)$$

Contudo para a maior parte dos sistemas, os gráficos Scatchard apresentam a forma curva, resultado da heterogeneidade dos sítios de ligação. A heterogeneidade pode, ainda assim, ser tida em conta pela análise Scatchard através da modelação da isotérmica curvilínea em duas rectas separadas, o qual consiste num método para a aplicação da isotérmica de Bi-Langmuir. Este método produz dois conjuntos de parâmetros de ligação ( $K_1, N_1$  e  $K_2, N_2$ ) para duas classes de sítios de ligação. A recta com um declive mais acentuado diz respeito aos sítios de ligação com afinidade elevada e a recta mais horizontal diz respeito aos sítios de ligação com menor afinidade [68].

A aplicação gráfica do modelo de Bi-Langmuir é inconsistente uma vez que depende das decisões de cada um relativamente à escolha do pontos a serem abrangidos por cada uma das rectas [69].



**Fig. 9** - Exemplo de um Gráfico Scatchard para um polímero molecularmente impresso, no qual é aplicado o modelo de Bi-Langmuir.

A isotérmica de Langmuir (19) e Bi-Langmuir (20) podem ser aplicadas de uma forma mais sistemática usando uma curva de ajuste com a seguinte expressão:

$$B = \frac{N_1 K_1 F}{1 + K_1 F} \quad (19)$$

$$B = \frac{N_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{N_2 K_2 F}{1 + K_2 F} \quad (20)$$

Ajustes de maior ordem nomeadamente, tri- tetra-Langmuir (21) podem ser usados através de termos adicionais:

$$B = \frac{N_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{N_2 K_2 F}{1 + K_2 F} + \frac{N_3 K_3 F}{1 + K_3 F} + \frac{N_4 K_4 F}{1 + K_4 F} \quad (21)$$

Atendendo aos princípios desta isotérmica (enunciados acima), estes modelos assumem que os PMI são materiais relativamente homogêneos e contêm apenas uma ou duas classes distintas de sítios de ligação. Por outro lado, as medições da distribuição dos sítios de ligação têm revelado uma distribuição heterogênea. Esta discrepância entre o modelo e o sistema leva a inconsistências na determinação dos parâmetros de ligação. Por exemplo, os gráficos Scatchard conduzem a parâmetros de ligação (N e K) dependentes da concentração para PMI não covalentes os quais, na teoria, deviam ser constantes. Esta variabilidade no cálculo dos parâmetros de ligação para um único polímero é amplificada aquando da comparação de diferentes polímeros, levando a conclusões ambíguas [68].

## b) Modelos de Distribuição Contínua

### Isotérmica de Freundlich

A isotérmica de Freundlich (IF) consiste num modelo de distribuição contínua, o qual assume uma função potência entre a concentração da molécula analito ligada e aquela que se encontra livre em solução. [69] Segundo a equação em baixo, existem dois parâmetros de ajuste:  $a$  e  $m$ . O factor  $a$  é uma medida da capacidade ( $N_T$ ) e da afinidade média ( $K_0$ ), enquanto o parâmetro  $m$ , representa o índice de heterogeneidade. Este último varia entre 0 e 1, quanto mais próximo de 1 for o seu valor mais homogéneo será o polímero em estudo [70].

$$B = aF^m \quad (22)$$

O modelo de Freundlich é aplicado mais facilmente através da representação gráfica da isotérmica de ligação na forma logarítmica:  $\log B$  vs  $\log F$ . Nesta forma, os dados experimentais que se ajustam à IF apresentam-se linearizados, possuindo um declive com o valor de  $m$  e a ordenada na origem com o valor de  $\log a$ .

$$\log B = m \log F + \log a \quad (23)$$

A possibilidade de linearizar a isotérmica de ligação tem como vantagem o facto de necessitar de um menor número de dados experimentais para ser definida com precisão comparativamente a uma função não linear. Desvios da linearidade em sistemas que podem ser descritos pela IF podem ser usados para identificar fontes de erro na isotérmica de ligação.

A distribuição de afinidade consiste na representação gráfica do número de sítios de ligação em função da constante de associação ( $K$ ). Esta fornece uma medida quantitativa do número de sítios de ligação e respectiva afinidade de ligação, sendo também uma medida da heterogeneidade do polímero. A distribuição de afinidade permite a comparação das propriedades de ligação dos PMI independentemente da forma da distribuição ou das condições experimentais [71].

Vários métodos de aproximação têm sido desenvolvidos para estimar o número de sítios de ligação, a maior parte deles requer medições físicas adicionais do sistema. Guiochon desenvolveu uma expressão para a DA de uma IF que apenas necessita dos parâmetros experimentais,  $a$  e  $m$  [70].

$$N(K) = a \frac{\sin(\pi m)}{\pi} K^{-m} \quad (24)$$

Uma expressão semelhante foi também desenvolvida por Umpleby [68]:

$$N(K) = 2,03am(1-m^2)e^{-2,303m \log K} \quad (25)$$

As diferenças nestas expressões devem-se ao facto de ambas serem apenas uma aproximação da distribuição de decaimento exponencial da IF. As duas expressões possuem a mesma forma geral, com um factor de decaimento idêntico –  $m$ . As diferenças no coeficiente pré-exponencial representam a diferença dos métodos de aproximação usados na sua derivação.

Segundo as expressões acima (24 e 25), em teoria, é possível calcular a DA em qualquer gama de afinidades de ligação. No entanto, na prática são apenas válidas dentro de um limite ( $K_{\min}$  e  $K_{\max}$ ) definido pela gama de concentrações experimentais da isotérmica de ligação:

$$K_{\max} = 1/F_{\min} \quad (26) \quad K_{\min} = 1/F_{\max} \quad (27)$$

As DA calculadas através da IF podem ser representadas sob duas formas, a semi-logarítmica ( $N$  versus  $\log K$  - que apresenta a forma de decaimento exponencial) e sob a forma logarítmica ( $\log N$  versus  $\log K$ ). [70] Esta última é útil pois neste tipo de representação gráfica a distribuição adquire a forma linear, o que facilita a comparação visual da DA de diferentes polímeros. DA de polímeros com heterogeneidade semelhante são facilmente identificadas pelo facto de serem rectas paralelas, uma vez que o seu declive (no formato logarítmico) corresponde ao índice de heterogeneidade  $m$  [68]. Uma importante limitação da IF é o facto de apenas ser precisa para uma parte da isotérmica de ligação. As elevadas concentrações verifica-se um afastamento entre os pontos

experimentais e a IF, isto ocorre porque a IF não é capaz de modelar o comportamento de saturação dos PMI. Felizmente, as isotérmicas de ligação para a maior parte dos PMI estão restritas a concentrações abaixo da saturação, devido ao facto de os PMI manifestarem-se saturados para concentrações que normalmente elevadas ( $> \text{mM}$ ) comparativamente às que são normalmente utilizadas. Concentrações muito baixas ( $< \text{nM}$ ) são igualmente difíceis de serem medidas nos PMI devido a interferências da lixiviação lenta da molécula molde a partir da matriz polimérica [70].

### Isotérmica de Langmuir-Freundlich

A isotérmica de Langmuir - Freundlich (ILF) é uma função que descreve uma relação específica entre a concentração da molécula molde em equilíbrio, ligada ao PMI, e aquela que permanece livre em solução, para sistemas heterogéneos (28). A isotérmica de LF possui três coeficientes de ajuste:  $N_t$ ,  $a$  e  $m$ . O coeficiente  $N_t$  representa o número total de sítios de ligação, a variável  $a$  está relacionada com a afinidade de ligação média ( $K_0$ ) via  $K_0 = a^{1/m}$ , já o índice  $m$ , representa o índice de heterogeneidade, o qual varia entre 0 e 1, sendo que  $m=1$  para material homogéneo e  $m < 1$  para o material é heterogéneo [71].

$$B = (N_t a F^m) / (1 + a F^m) \quad (28)$$

Como o nome indica, a isotérmica de LF é uma junção das isotérmicas de Langmuir e Freundlich podendo ser reduzida a cada uma delas nos seus limites. Por exemplo, quando  $m=1$ , a isotérmica de LF é reduzida à isotérmica de Langmuir na qual a variável  $a$  corresponde directamente à afinidade de ligação ( $K$ ). Alternativamente, assim que  $F$  ou  $a$  se aproximam de zero, a isotérmica de LF reduz-se à isotérmica de Freundlich. É de salientar o facto de a isotérmica de LF se reduzir, para todos os sistemas, à isotérmica de Freundlich para concentrações baixas. Assim, o modelo LF é capaz de modelar quer superfícies e ligação homogéneas quer heterogéneas [71].

A isotérmica de LF possui igualmente uma expressão para a DA (29). Esta expressão, apesar de ser uma equação mais complexa continua a ser uma expressão algébrica simples que pode ser aplicada de maneira semelhante à DA para a IF. Através do uso dos parâmetros de ajuste, derivados dos pontos experimentais, a DA pode ser facilmente calculada para a gama de concentrações usadas no estudo de religação para a determinação da isotérmica de ligação.

$$N(K) = 2,3N_t m K_0^m K^{-m} \frac{(1+2K_0^m K^{-m} + K_0^2 K^{-2m} + 4K_0^m K^{-m} m^2 - K_0^{2m} K^{-2m} m^2 - m^2)}{(1+K_0^m K^{-m})^4} \quad (29)$$

Em geral, a isotérmica de LF é a isotérmica mais aplicada na caracterização dos PMI uma vez que é capaz de modelar o comportamento de saturação e subsaturação em conjunto ou individualmente. No entanto, normalmente não é necessária a aplicação desta isotérmica pois a maior parte das isotérmicas de ligação para os PMI têm sido medidas na região de subsaturação onde a aplicação, mais fácil, da IF é suficiente. Um teste simples para averiguar se é ou não necessário aplicar a isotérmica de LF consiste em representar graficamente log B versus log F. As isotérmicas que apresentam a forma linear sob toda a gama de concentrações são mais facilmente caracterizadas pela IF. [69] Por outro lado as isotérmicas que apresentam a forma curvilínea em toda a gama de concentrações, são caracterizadas mais facilmente pela isotérmica de Langmuir. Apenas sistemas que apresentam regiões lineares a baixas concentrações e regiões curvilíneas a concentrações elevadas beneficiam com a aplicação da isotérmica de LF [68].

## I.8) Aplicação dos PMI em Química Analítica

Durante as últimas duas décadas, o volume de pesquisa em torno do desenvolvimento de vários formatos dos PMI permitiu que o método de impressão molecular se estendesse a diversas áreas, como a nanotecnologia, biotecnologia, quimio/biossensores, síntese química e catálise, entre outras, tendo adquirido por isso

diversas aplicações. Actualmente são úteis em enantioseparações, catálise, extracção em fase sólida, libertação de fármacos, cromatografia de afinidade e na preparação de sensores específicos, usando uma variedade de métodos de detecção. Alguns exemplos dos métodos de detecção para os PMI incluem: ópticos, de massa, electroquímicos, entre outros [76-95].

### **I.8.1. Aplicação dos PMI nos Sensores Potenciométricos**

Actualmente tem-se verificado um aumento no número de estudos em sensores electroquímicos com transdução capacitiva, condutométrica, amperométrica, voltamétrica e potenciométrica. [91] No entanto, apesar desse aumento, o número de estudos existentes relativamente à aplicação de PMI a sensores potenciométricos é ainda limitado. Um dos estudos que pode ser encontrado na literatura relata a elaboração de um sensor potenciométrico baseado em membranas de polipirrol molecularmente impresso, para a determinação do ácido 2,4-diclorofenoxi acético. O sensor foi preparado através da electropolimerização do polipirrol num eléctrodo de carbono vítreo na presença do ácido como molécula molde. A molécula molde foi removida por sobreoxidação a +1,3V em solução tampão. O método foi bem sucedido na determinação do ácido em amostras ambientais de água, com taxas de recuperação desde 92 % a 108 % [92].

Levon e colaboradores desenvolveram sensores potenciométricos baseados na técnica de impressão de superfície acoplada a um transdutor em nanoescala, o óxido de índio e estanho. Após a extracção das moléculas molde, as medições potenciométricas mostraram detecções selectivas das espécies alvo como o ácido metil fosfónico, com uma gama de detecção entre  $5,0 \times 10^{-5}$  a  $0,62 \text{ molL}^{-1}$ , ácido dipolínico entre  $1,5 \times 10^{-6}$  a  $0,0194 \text{ molL}^{-1}$  e ácido N-carbobenzoxiaspártico entre  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $1,2 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ . Os tempos de resposta demonstraram ser muito curtos, desde poucos segundos a 2 minutos, devido á monocamada impressa ultrafina [94-96].

Na literatura foi também publicado o desenvolvimento de um sensor potenciométrico baseado em PIM, para a monitorização em campo do pesticida forato em águas naturais. O elemento sensível foi criado através da inclusão do forato em materiais

poliméricos impressos na matriz do PVC. O sensor apresentou uma resposta linear entre  $10 \times 10^{-8}$  e  $10 \times 10^{-5}$  molL<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de  $10 \times 10^{-8}$  molL<sup>-1</sup>. Apresentando estabilidade até três meses e podendo ser usado mais de 40 vezes sem perda de sensibilidade [96].

Um outro exemplo encontrado relata a elaboração de um filme de polianilina molecularmente impressa, electroquimicamente sintetizado usando o ácido ascórbico como molécula molde. Os estudos efectuados revelaram que o eléctrodo elaborado consegue detectar o ácido ascórbico na gama de 0,05-0,4 mM com um limite de detecção de 0,018 mM [97].

Estes são apenas alguns dos exemplos que podem ser encontrados na literatura, existindo outros estudos que incidem sobre o desenvolvimento de sensores potenciométricos, tendo como moléculas alvo a mioglobina e hemoglobina, ácido dipicolínico, atrazina, aminoácidos quirais, derivados do benzotiazol, *chlormequat*, ácido metilfosfórico e prometazina [98,99,103, 106, 107,109].

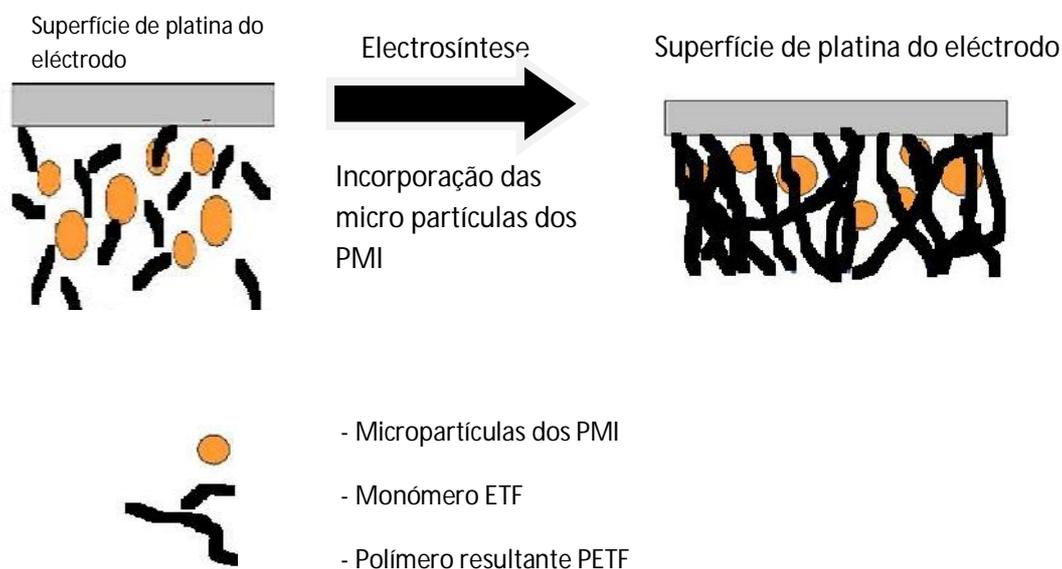
### **I.8.2) Métodos de Imobilização dos Polímeros Molecularmente Impressos na Membrana do Sensor Potenciométrico**

Após a síntese e caracterização do polímero molecularmente impresso, é necessário proceder à sua imobilização na membrana do eléctrodo do sensor. Dois dos métodos mais usados para este fim incluem a preparação dos filmes finos do PMI na superfície do transdutor e a incorporação das partículas de PMI numa membrana polimérica como PVC ou gel:

Até à data, o melhor procedimento para a produção de um filme fino de PMI é a polimerização *in situ*.

A electropolimerização na área da impressão molecular é usada quer na síntese *in situ* de membranas impressas, quer no aprisionamento das partículas dos PMI directamente na superfície do eléctrodo. A primeira abordagem engloba a electropolimerização de um

polímero condutor como o polipirrol ou politiofeno, na presença da molécula molde. Esta após a electropolimerização é removida, deixando cavidades impressas no filme polimérico do eléctrodo, complementares à molécula molde (figura 10). A segunda abordagem é semelhante à primeira no entanto a molécula molde é substituída pela partículas do PMI previamente sintetizado. Durante a electrodeposição do polímero condutor, as micropartículas de PMI e PNI ficam aprisionadas na rede polimérica como resultado de se encontrarem em suspensão. A figura em baixo exemplifica o processo de electropolimerização do polietililtiofeno e inclusão das micropartículas na rede polimérica.



**Fig. 10** - Esquema da preparação da membrana baseada em PETF e micropartículas dos PMI sintetizados.

Para além da polimerização *in situ* existem outros procedimentos que podem ser igualmente aplicados para o revestimento da superfície como por exemplo, por nebulização. Nesta, o controlo da espessura da camada é necessário para adaptar o tempo de resposta e a sensibilidade do sensor [52].

Para a incorporação das partículas de PMI numa membrana polimérica como PVC ou gel o PMI pode ser incorporado de igual modo como as substâncias activas tradicionais. Tipicamente a preparação da membrana consiste na dissolução do PVC, plastificante e

substância activa, num solvente como o tetrahidrofurano. Após evaporação do solvente obtém-se um filme polimérico.

Uma outra técnica interessante de imobilização consiste na integração dos PMI com o componente do transdutor como a grafite, na matriz do PMI [104]. Assim, os sítios de ligação e as partículas condutoras permanecem em contacto. Através de um simples polimento, a superfície do sensor pode ser renovada, apresentando assim vantagens na produção em série de sensores com superfície de reconhecimento baseado em PMI. O aprisionamento/inclusão das partículas de PMI em géis tem sido igualmente utilizado para o mesmo fim [105]. Por exemplo, o gel de agar foi usado para imobilizar as partículas de PMI num eléctrodo de platina para a detecção amperométrica da morfina [105]. Estes materiais já preparados são aplicados na superfície do transdutor.

### **I.9) Limitações dos Polímeros Molecularmente Impressos**

A impressão molecular é capaz de gerar cavidades com informação esterequímica das moléculas molde, numa rede polimérica reticulada. No entanto, a eficiência da impressão molecular depende da natureza da ligação entre o complexo modelo-monómero, da forma dos materiais impressos e da rigidez da matriz polimérica. Embora o protocolo convencional seja simples e efectivo, à semelhança de outras técnicas e respectivos produtos, também os PMI possuem algumas limitações. Alguns dos problemas associados com o desempenho dos PMI apontados na literatura são, em alguns casos, a sua baixa capacidade de ligação e cinética de ligação.

A maioria dos polímeros impressos são polímeros altamente reticulados, o que pode por vezes dificultar a extracção da molécula molde original, localizada na área interior dos mesmos, provocando uma redução na capacidade de re-ligação do analito alvo. Para além disso, caso as cavidades geradas não se encontrem à superfície ou na proximidade desta, a elevada resistência à transferência de massa poderá dificultar as espécies alvo de acederem às cavidades que se encontram mais afastadas da superfície, provocando assim uma diminuição na cinética de ligação do analito alvo [106]. Um outro inconveniente gerado, por vezes pela impressão molecular, é facto da rigidez da matriz polimérica reduzir a liberdade conformacional do reconhecimento molecular, sendo por isso importante

otimizar o processo de síntese de modo a obter as características de impressão desejadas, isto é, polímeros mais ou menos reticulados, rígidos ou porosos.

Uma das tentativas feitas para resolver tais problemas reside na preparação de materiais impressos de forma a controlar a posição das moléculas molde, situando-as o mais próximo possível da superfície do polímero. Mosbach, relatou uma estratégia de impressão molecular de superfície, através da imobilização covalente das moléculas molde à superfície de um substrato sólido [107]. Após a polimerização e remoção do substrato, todas as moléculas molde se situavam na superfície dos materiais impressos, permitindo a remoção completa das mesmas, e ainda uma excelente acessibilidade das espécies alvo e flexibilidade conformacional para o reconhecimento.

Um método alternativo para aumentar a quantidade dos sítios de ligação na superfície do polímero consiste na preparação dos filmes finos ou nanopartículas impressas molecularmente. Sellergren propôs a preparação de filmes molecularmente impressos através da imobilização química de iniciadores azo/agentes de transferência de cadeia na superfície dos substratos [108]. Embora a imobilização dos iniciadores seja muitas vezes complexa e quimicamente instável, o método pode ser adaptado a suportes com diferentes morfologias [24, 63, 78]. As nanopartículas impressas possuem dimensões pequenas com uma elevada razão superfície – volume e assim a maioria das moléculas molde encontram-se próximas da superfície do material impresso. Assim, espera-se que a nanoforma dos PMI provoque uma melhoria na cinética e capacidade de ligação dos materiais impressos [106].

Uma forma de aumentar a flexibilidade dos polímeros impressos pode estar na obtenção de materiais tipo gel, como os hidrogéis de quitosano [111]. Estes possuem uma menor densidade de agente de reticulação que os materiais impressos normais, sintetizados a partir dos monómeros poliméricos, conseqüentemente são mais flexíveis e possuem uma maior liberdade conformacional para o reconhecimento molecular. Uma outra abordagem, desenvolvida por Zimmerman, consiste na impressão de dendrites monomoleculares através da polimerização de dendrímeros com grupos terminais vinilo [112]. Cada dendrímero polimerizado contém apenas um sítio impresso após a remoção das moléculas molde.

## II – Materiais e Métodos

### II.1) Reagentes

Os reagentes usados neste trabalho foram: ácido metacrílico (AM) (99%, Sigma Aldrich); Trimetacrilato de trimetilolpropilo (TRIM) (99%, Sigma Aldrich); azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) (98%, Sigma Aldrich); acetonitrilo (99%, Sigma Aldrich); difenilamina (DFA) (99%, Sigma Aldrich); éter *o*-nitrofeniloctílico (*o*NPOE) (99%, Sigma Aldrich) etiltiofeno (ETF) (Sigma Aldrich); catequina (98%, Sigma Aldrich); tetra-hidrofurano (THF) (99%, Sigma Aldrich); etanol (99%, Sigma Aldrich); água ultra pura (Mili-Q); metanol (99%, Sigma Aldrich); ácido acético (99%, Riedel de Haen); perclorato de magnésio (83%, Merck); anilina (95%, M&B); ácido clorogénico (99%, Sigma Aldrich); fenol (99%, Panreac); Cloreto de polivinilo (PVC) (Fluka Chemika) ; nitrato de potássio (98%, Panreac); ácido nítrico; hidróxido de sódio (98%, Panreac).

### II.2) Preparação dos Polímeros Molecularmente Impressos

Todos os polímeros impressos com difenilamina e não-impressos foram sintetizados através da polimerização de precipitação com iniciação térmica.

O ácido metacrílico (AM) foi usado como monómero, o Trimetacrilato de trimetilolpropilo (TRIM) como agente de reticulação, o azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN) como o iniciador, a difenilamina (DFA) como molécula molde e o acetonitrilo como solvente.

Para o estudo da influência do tempo de polimerização e razão monómero/molécula molde, nas propriedades dos PMI, foram sintetizados PMI com diferentes horas de polimerização e diferentes razões monómero/molécula molde (tabela 1).

**Tabela 1** – Condições das polimerizações efectuadas.

Polímero	Razão Monómero/Molécula Molde	Tempo de Reacção (h)
PMI1	7,5	10
PMI2	7,5	24
PMI3	4,3	17
PMI4	3,0	10
PMI5	3,0	24
PMI6	2,0	24
PNI1	-	10
PNI2	-	24

Primeiramente introduziram-se 40 mL de solvente (acetonitrilo) no interior do reactor, em seguida adicionou-se 1,5 mmol de monómero funcional (ácido metacrílico), tendo-se variado a quantidade de molécula molde adicionada (0,75 mmol; 0,5 mmol; 0,2 mmol; 0,35 mmol; 0,0 mmol), deixando-se 15 min sob corrente de azoto para a formação do complexo monómero-molécula molde. Posteriormente adicionou-se 2 mmol de agente de reticulação TRIM e 0,5 mmol de iniciador AIBN, deixando-se 15 min sob corrente de nitrogénio. Em seguida elevou-se a temperatura do banho de água que envolvia o reactor de 20 para 60 °C. A elevação da temperatura foi necessária para que a polimerização se iniciasse uma vez que o iniciador apenas sofre a clivagem homolítica (geração de radicais livres), à temperatura de 57 °C. O tempo de polimerização variou de acordo com a tabela 1.

Após o fim de reacção, as partículas de polímero foram recolhidas por centrifugação. Após a obtenção de cada um dos PMI, procedeu-se à remoção da molécula molde através da extracção por Soxhlet, usando-se uma mistura de metanol e ácido acético (9:1), durante 12 h. Secaram-se os polímeros numa estufa a 50 °C até que a sua massa permanecesse

constante. A remoção da DFA foi confirmada através da medição da absorvência a 280 nm, onde a absorvência próxima ou igual a zero indicam a extracção da DFA.

Para a síntese dos polímeros não impressos procedeu-se do mesmo modo, com as mesmas condições, à excepção da adição da molécula molde (DFA). Depois de sintetizadas as partículas de polímero não impresso foram recolhidas por centrifugação, lavadas com acetonitrilo, sendo posteriormente secadas na estufa, até que a sua massa permanecesse constante.

### II.3) Caracterização dos Polímeros Molecularmente Impressos

#### II.3.1) Estudos de Religação

Incubaram-se durante 24 h, 1 mg do PMI em estudo num copo com 5 mL de uma solução (35% álcool e 65% água) de DFA com várias concentrações: 0,01-1,2 mL<sup>-1</sup> DFA. O PMI foi separado da solução através da centrifugação da mistura (solução de DFA+PMI) a 15000 rpm, durante 15 min. A concentração de DFA livre em solução foi determinada através da medição da absorção da solução a 280 nm (máximo de absorção da DFA) num espectrofotómetro UV/VIS Shimadzu UV-2101PC. A concentração de DFA ligada ao polímero foi calculada através da diferença entre a concentração de DFA livre inicial, em solução, e após o contacto com o PMI. Estes dados foram usados para calcular a capacidade de ligação de cada polímero de acordo com a expressão seguinte:

$$Q = \frac{m(DFA_{ligada})}{m_{PMI}} = \frac{(C_i - C_f)V_s}{m_{PMI}} \quad (30)$$

onde  $C_i$  – concentração de DFA inicial (mgL<sup>-1</sup>),  $C_f$  – concentração de DFA final (mgL<sup>-1</sup>),  $V_s$  – volume de solucao (L) and  $m_{PMI}$  – massa de polímero (g).

Estes dados foram representados graficamente: concentração de DFA livre em solução vs quantidade de DFA adsorvida por cada grama de PMI (figura 21). Estes dados foram usados para estabelecer uma isotérmica de ligação, tendo sido aplicadas a isotérmica de *Freundlich*, *Langmuir* e *Langmuir-Freundlich*, que permitem estimar os parâmetros de

ligação dos sítios de ligação impressos no PMI. A descrição detalhada de cada uma das isotérmicas anteriores encontra-se na introdução deste trabalho.

### II.3.2) Estudos de Selectividade

Para o estudo da selectividade dos PMI e PNI relativamente à molécula de DFA, efectuaram-se estudos de religação semelhantes ao descrito anteriormente, no entanto as moléculas alvo usadas para o efeito foram: catequina, anilina, ácido clorogénico e fenol. A concentração usada de cada uma delas foi de 0,1 mmolL<sup>-1</sup>. A concentração livre de catequina, anilina, ácido clorogénico e fenol em solução foi determinada espectrofotométricamente, através da medição da absorção a 212 nm, 230 nm, 329 nm e 210 nm, respectivamente. Os resultados obtidos neste ensaio e nos estudos de religação com a DFA, para a concentração de 0.1 mmolL<sup>-1</sup>, foram usados para determinar o coeficiente de selectividade através da fórmula:

$$K_{DFA/Int} = \frac{[DFA_{ligada}][Int_{livre}]}{[DFA_{livre}][Int_{ligada}]} \quad (31)$$

onde  $[DFA_{ligada}]$  – concentração de DFA ligada ao PMI ou PNI (mmolL<sup>-1</sup>),  $[Int_{livre}]$  – concentração de interferente livre em solução (mML<sup>-1</sup>),  $[DFA_{livre}]$  – concentração de DFA livre em solução (mmolL<sup>-1</sup>),  $[Int_{ligada}]$  –concentração de interferente ligada ao PMI ou PNI.

### II.3.3) Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier

O espectro de infravermelho foi obtido num espectrómetro de Infravermelho ABB MB3000. As medições foram efectuadas por reflectância total atenuada (RTA). O número de varrimentos foi de 64 para a amostra e fundo, sendo a resolução de 4000. Os dados foram recolhidos no modo de percentagem de transmitância, para números de onda entre 500-4000 cm<sup>-1</sup>.

### II.3.4) Microscopia de Varrimento Electrónico

A morfologia das partículas de PMI impressos e não impressos foi observada através de um microscópio electrónico de varrimento Hitachi, modelo SU-70.

As amostras foram previamente revestidas com ouro, durante alguns minutos com um aplicador por pulverização catódica, no vazio. A voltagem de aceleração usada durante a microscopia foi de 4,0kV.

### II.4) Avaliação estatística – ANOVA

A análise de variância dos efeitos da razão molécula molde/monómero e do tempo de polimerização na capacidade de ligação e selectividade dos polímeros sintetizados (impressos e não impressos) foi avaliada usando a ANOVA, com interacção, para 2 factores (tabela 2): concentração da molécula molde e tempo de polimerização, com um nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . O software utilizado foi o Microsoft Office Excel 2007.

**Tabela 2** - ANOVA para dois factores.

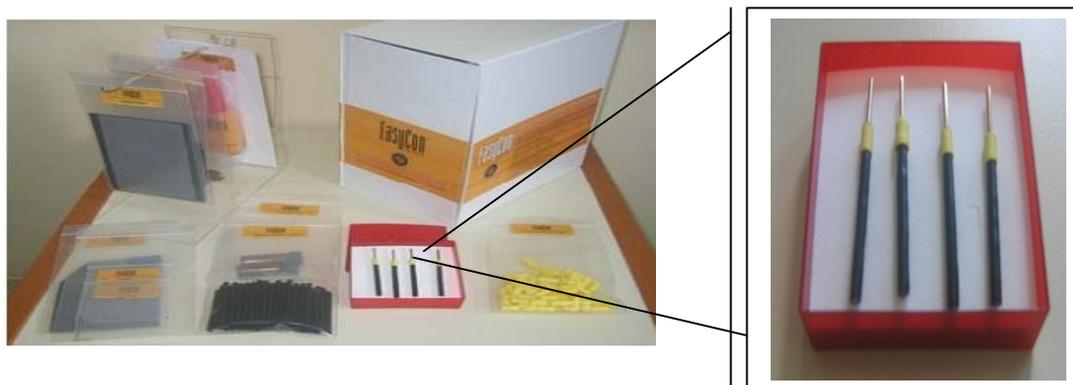
Fonte de variação	SS	DF	MS	F
Concentração da molécula molde (A)	$SS_A$	a-1	$MS_A$	$MS_A/MS_w$
Tempo de polimerização (B)	$SS_B$	b-1	$MS_B$	$MS_B/MS_w$
Interacção (AxB)	$SS_{AxB}$	(a-1) (b-1)	$MS_{AxB}$ B	$MS_{AxB}/M$ $S_w$
Resíduos	$SS_w$	ab(r-1)	$MS_w$	
Total	$SS_{Total}$	abr-1		

SS - Soma dos Quadrados; DF- Graus de Liberdade; a- níveis do factor A; MS – média dos quadrados; F- teste de F;

## II.5) Elaboração do sensor potenciométrico

### II.5.1) Preparação dos eléctrodos selectivos a iões

Os eléctrodos de platina que foram posteriormente revestidos com as membranas que incorporavam os PMI e PNI, foram preparados usando o conjunto para montagem de eléctrodos (Autolab B.V) (figura 11). De forma resumida, limpavam-se os tubos de bronze com etanol, no final de cada tubo fixou-se o disco de platina através de uma cola condutora de prata. Posteriormente, revestiu-se o tubo de bronze com duas camadas de uma mistura de cola epoxi. Para protecção do tubo de bronze revestido com a cola, usaram-se 2 tubos de plástico apropriados para o revestimento final, tendo-se deixado cerca de 1 cm para o contacto eléctrico que permite estabelecer ligação com o milivoltímetro.



**Fig. 11** – Conjunto para montagem usado na elaboração dos eléctrodos selectivos a iões. Na caixa vermelha da figura encontram-se representados os eléctrodos já finalizados.

## II.5.2) Preparação da Membrana selectiva para a Difenilamina

As membranas baseadas nas partículas de polímero foram preparadas usando duas matrizes poliméricas: PVC plastificado e polietiltiofeno electropolimerizado.

As membranas com base em PVC plastificado foram preparadas usando o seguinte método:

Aproximadamente 5 mg do polímero impresso foram dispersadas em aproximadamente 30 mg de NPOE, tendo-se posteriormente adicionado cerca de 15 mg de PVC. Adicionou-se então à mistura cerca de 1,5ml de tetra - hidrofurano (THF). A solução resultante foi homogeneizada através de agitação com uma barra magnética, num recipiente de vidro com o fundo raso. Deixou-se evaporar o THF à temperatura ambiente durante 24h. Após a evaporação do THF formou-se uma película sólida fina (membrana), da qual foram cortados discos com o diâmetro de 2 mm. As membranas cortadas foram coladas aos eléctrodos de platina com uma cola condutora de prata. As composições das membranas preparadas encontram-se na tabela 3.

Os polímeros impressos escolhidos foram o PMI1 e PMI5. Uma membrana controlo (branco) foi também preparada de maneira semelhante, possuindo a mesma composição à excepção das partículas de PMI, tendo-se neste caso usado o PNI1 e PNI 2 (tabela 3). Os eléctrodos foram deixados ao ar e temperatura ambiente quando não usados.

As membranas que têm como matriz polimérica o polietiltiofeno foram preparadas do seguinte modo:

Previamente ao início da electropolimerização do etiltiofeno, a superfície do eléctrodo de platina foi limpa com um papel abrasivo, fornecido no conjunto de montagem do eléctrodo, e lavada com etanol e água. A solução de electrosíntese era constituída por  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  de perclorato de magnésio e  $0,01 \text{ molL}^{-1}$  de monómero, etiltiofeno, em acetonitrilo. Posteriormente retirou-se uma alíquota de 5 mL da solução de electrosíntese, tendo-se adicionado 10 mg de micropartículas do PMI ou PNI em estudo (PMI1, PMI5, PNI2 e PNI1), sendo dispersadas por ultrasonicação durante 10min. Posteriormente deu-se início à electropolimerização da solução de monómero ultrasonificada, durante 8 minutos a

um potencial constante de 1,2 V, sob corrente de nitrogénio e sem agitação magnética, tendo-se usado, um potenciostáto EZ stat-pro, com um sistema de três eléctrodos:

- Eléctrodo de trabalho - eléctrodo de platina
- Eléctrodo de referência - eléctrodo de Ag/AgCl
- Eléctrodo auxiliar – Eléctrodo de carbono vítreo

Após a electrosíntese na superfície do eléctrodo esta foi lavada em água e deixada numa solução de água quando não utilizada.

Foram também sintetizadas membranas (“brancas”), sem qualquer partícula impressa ou não impressa, tendo o processo de electropolimerização sido exactamente igual à excepção da adição de partículas de PMI ou PNI.

**Tabela 3** - Composição das membranas funcionais elaboradas baseadas em PVC. MA – Material activo; P – Plastificante; MP – Matriz polimérica; AI – Aditivo iónico.

Composição da Membrana				Quantidade (% relativa ao peso total da membrana)			
MA	P	MP	AI	MA	P	AI	PVC
PMI1	oNPOE	PVC	-	1	66,0	-	33,0
PMI1	oNPOE	PVC	-	10	60,0	-	30,0
PMI1	oNPOE	PVC	TFBS	1	65,6	0,5	32,8
PMI1	oNPOE	PVC	TFBS	10	58,6	2,0	29,3
PMI5	oNPOE	PVC	-	1	66,0	-	33,0
PMI5	oNPOE	PVC	-	10	60,0	-	30,0
PMI5	oNPOE	PVC	TFBS	1	65,6	0,5	32,8
PMI5	oNPOE	PVC	TFBS	10	58,6	2,0	29,3
-	oNPOE	PVC	-	-	66,6	-	33,3

## II.6) Caracterização do Desempenho Analítico do Eléctrodo

### II.6.1) Calibração do eléctrodo

O procedimento foi o mesmo para ambos os tipos de membrana elaborados. As medições potenciométricas foram feitas na seguinte célula electroquímica:



As calibrações foram efectuadas para diferentes valores de pH nomeadamente pH 2 ( $\text{KNO}_3$ ,  $0,01 \text{ molL}^{-1}$  com adição de  $\text{HNO}_3$  até pH 4), pH 4 ( $\text{KNO}_3$ ,  $0,01 \text{ molL}^{-1}$  com adição de  $\text{HNO}_3$  até pH 4), pH 6 ( $\text{KNO}_3$ ,  $0,01 \text{ molL}^{-1}$ ) e pH 9 (Tris,  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ molL}^{-1}$ ).

Para a calibração do eléctrodo com membrana electropolimerizada de polietiltiofeno procedeu-se exactamente do mesmo modo que para os eléctrodos com membrana plastificada de PVC

Anteriormente ao início das calibrações efectuadas, o eléctrodo foi condicionado em 10 mL de uma solução aquosa, com pH correspondente ao pH de calibração, até que o potencial do eléctrodo permanecesse estável (variações não superiores a  $\pm 1 \text{ mV}$  durante 5min).

A calibração foi efectuada através da adição de quantidades crescentes de uma solução aquosa de DFA ( $5 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ), à solução anterior. As concentrações testadas encontravam-se na gama  $9,9 \times 10^{-8} \text{ molL}^{-1}$  -  $5 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ . O valor de pH da solução foi monitorizado simultaneamente, para assegurar que permanecia constante.

Os parâmetros da equação de Nernst foram calculados através de uma regressão linear resultante da representação gráfica do potencial do eléctrodo registado em função do logaritmo da concentração de DFA.

Para a calibração do eléctrodo com membrana electropolimerizada de polietiltiofeno procedeu-se exactamente do mesmo modo que para os eléctrodos com membrana plastificada de PVC

## II.6.2) Efeito do pH

A influência do pH na resposta potenciométrica do sensor foi avaliada entre pH 2-10. As medições foram efectuadas em 10 mL de uma solução aquosa, de  $0,01 \text{ molL}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  com pH 2, procedendo-se ao ajuste do valor de pH com hidróxido de sódio ( $1 \text{ molL}^{-1}$  e  $0,01 \text{ molL}^{-1}$ ), registando-se o valor do potencial do eléctrodo (E) para cada valor de pH.

O procedimento foi o mesmo para ambos os tipos de membrana elaborados.

## II.6.3) Estudo de Selectividade

### II.6.3.1) Determinação dos Coeficientes de Selectividade

Os coeficientes de selectividade foram determinados através do método do interferente fixo, método recomendado pela IUPAQ. Os interferentes estudados foram a catequina, anilina e fenol.

O procedimento experimental adoptado foi semelhante ao da calibração. No entanto, manteve-se fixa a concentração do interferente em estudo variando-se apenas a concentração do ião primário (DFA). A resposta do eléctrodo foi representada graficamente em função do logaritmo da concentração do interferente. A intersecção das porções lineares extrapoladas da representação gráfica, indicam o valor da concentração que deve ser usada para calcular o coeficiente de selectividade a partir da seguinte equação:

$$K^{\text{pot}}_{i,j} = [a_i]/[a_j]^{z_i/z_j} \quad (32)$$

sendo  $i$  o ião primário e  $j$  o interferente

O procedimento foi o mesmo para ambos os tipos de membrana elaborados.

### III) Resultados e Discussão

#### III.1) Síntese dos Polímeros Molecularmente Impressos

A impressão molecular consiste na síntese de polímeros altamente reticulados na presença de uma molécula molde. A remoção da molécula molde leva à produção de cavidades de ligação ou sítios de ligação à molécula molde (figura 12).

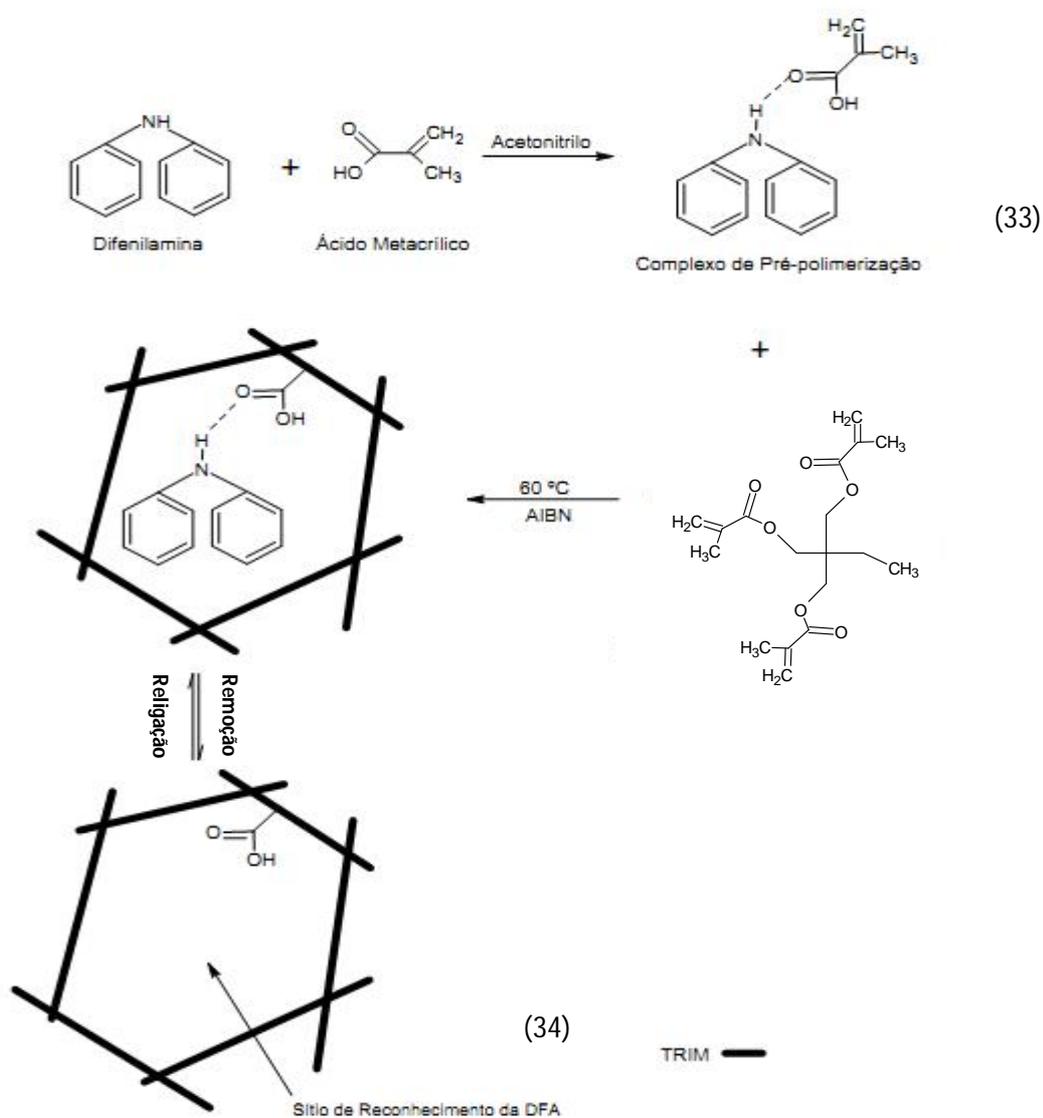


Fig. 12 - Esquema representativo da síntese para a análise.

Contudo, os PMI não são homogêneos, contêm sítios de ligação selectivos e não selectivos que afectam a afinidade do material. Tal é resultado da natureza complexa da formação de polímeros reticulados, a qual pode ser influenciada por diversos factores físicos por vezes inter-relacionados [57].

Neste estudo variaram-se dois factores, nomeadamente a razão molécula molde/monómero e o tempo de polimerização com o objectivo de otimizar as condições de síntese, usando a selectividade como critério de optimização, uma vez que o tempo de polimerização e a razão molécula molde/monómero influenciam as propriedades de ligação e selectividade dos PMI (descrito no capítulo de introdução), devendo a optimização destas variáveis ser determinada empiricamente para cada sistema.

## **III.2) Caracterização dos Polímeros Molecularmente impressos**

A rede polimérica macroscópica é difícil de caracterizar devido à sua insolubilidade e natureza intratável. No entanto, podem ser caracterizados até um determinado grau, podendo ser distinguidos três níveis de caracterização: a) Química, b) Morfológica, e c) Caracterização do Reconhecimento Molecular [30].

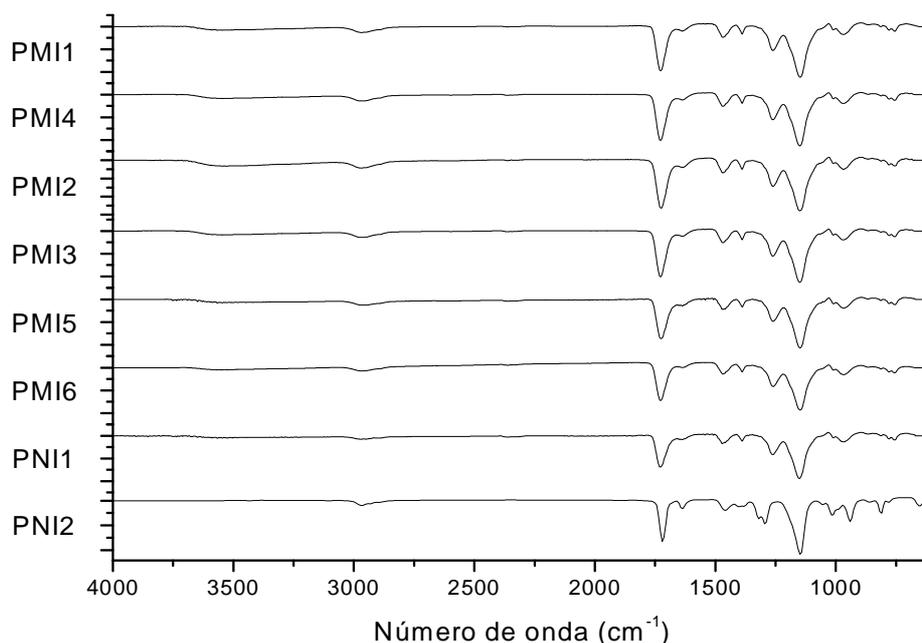
### **III.2.1) Caracterização Química**

#### **III.2.1.1) Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier**

A técnica de espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre as ligações químicas ou estrutura molecular dos materiais, quer sejam orgânicos quer inorgânicos. O seu principal objectivo é a determinação dos grupos químicos funcionais presentes na amostra [113].

Os espectros de cada um dos PMI obtidos encontram-se sobrepostos na figura 13. A identificação das vibrações responsáveis pela reflectância da radiação de infravermelho e consequente aparecimento dos picos característicos, encontra-se resumida na tabela 4.

a)



**Fig. 13** – Espectro de infravermelho obtido para cada um dos PMI e PNI sintetizados.

Comparando os espectros dos PMI e PNI sintetizados, rapidamente se constata a semelhança dos espectros, possuindo todos eles os mesmos picos característicos, indicando que as condições experimentais e até mesmo a presença da molécula molde não afectam a sua composição química, sendo portanto semelhantes quimicamente. A diferença entre eles deverá ser estrutural/morfológica, facto que irá ser avaliado pela técnica de MVE.

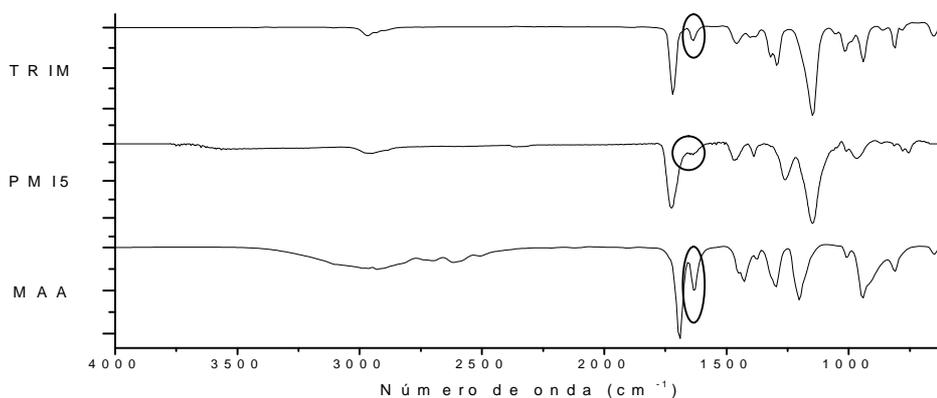
**Tabela 4** – Atribuição das frequências observadas nos espectros obtidos dos PMI e PNI.

<b>Número de Onda Observado (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de Onda Teórico (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>	<b>Composto responsável pelas vibrações</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<b>1143</b>	1150-1050	C-O vibração de alongação de éster substituído	TRIM	[113];[67]
<b>1253</b>	1320-1210	C-O vibração de alongação de cido Carboxílico	AM	[113];[67]
<b>1386</b>	1387- 1370	C-H vibração de deformação Assimétrica/Simétrica do grupo metil	AM TRIM	[113];[67]
<b>1458</b>	1485-1445	C-H vibração de deformação Metileno	AM TRIM	[113];[67]
<b>1625</b>	1680-1620	C=C vibração de alongação	AM; TRIM	[113];[67]
<b>1724</b>	1725-1700	Ácido carboxílico	AM; TRIM	[113];[67]
<b>2939</b>	2935-2915	Metileno C-H vibração de alongação asimetrica	TRIM	[113];[67]
<b>3560</b>	3620-3540	OH Vibração de alongação, H- ligado, do álcool terciário	AM	[113];[67]

Os polímeros obtidos através da polimerização resultaram do estabelecimento de ligações químicas entre as moléculas de monómero e de agente de reticulação, bem como

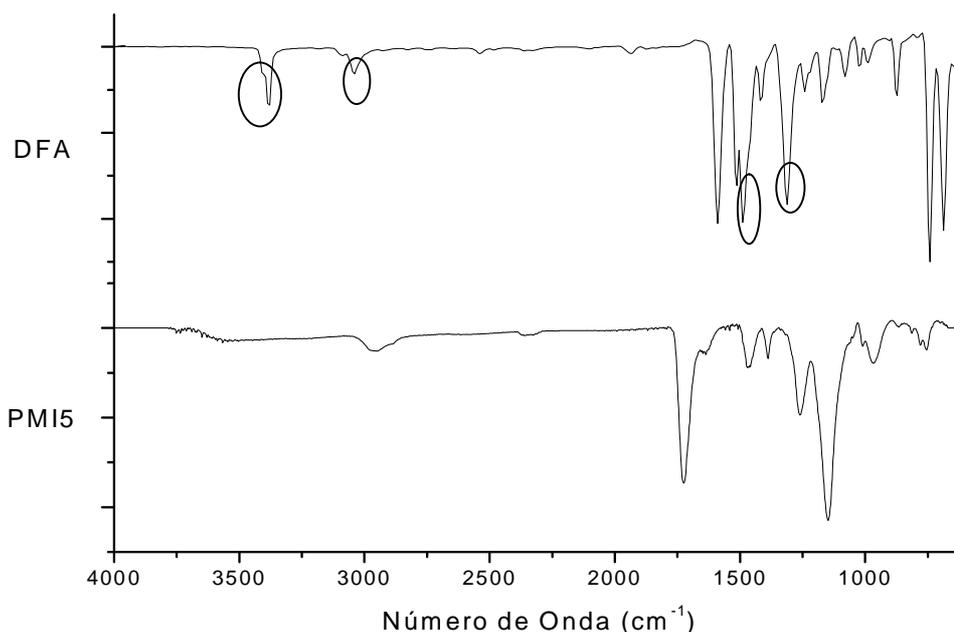
de ligações com elas próprias. O estabelecimento destas ligações pode ser confirmado através da verificação da diminuição das ligações duplas existentes após a síntese (vibrações de estiramento C=C – 1680-1620  $\text{cm}^{-1}$ ). Tal é visível nos espectros seguintes (figura 14), onde se verifica que o pico a cerca de 1625  $\text{cm}^{-1}$  possui menor intensidade no produto da polimerização, PMI5, comparativamente ao monómero (AM) e agente de reticulação (responsáveis pelas ligações duplas). Estas ligações duplas, segundo o mecanismo das fases de propagação e terminação da polimerização radicalar (como foi mostrado no capítulo I.5.1), deram origem a ligações simples responsáveis pela união do monómero e agente reticulação. A intensidade desta banda é semelhante em todos os polímeros, quer impressos quer não impressos pelo que o seu grau de polimerização deverá ser semelhante.

A banda próxima de 1700  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à vibração de estiramento C=O do ácido carboxílico, é visível no espectro do AM, TRIM e PMI4. No entanto, a posição exacta deste pico difere, sendo aproximadamente 1691  $\text{cm}^{-1}$  para o AM e 1725  $\text{cm}^{-1}$  para o PMI5, o que se pode dever à formação de ligações de hidrogénio entre dímeros carboxílicos e grupos carboxílicos “livres”, respectivamente. [142, 143]. Este pico no espectro do PMI5 é maior e menos simétrica comparativamente ao espectro do AM. Pode-se assim admitir a hipótese dos grupos carboxílicos no PMI serem maioritariamente livres, embora também possam estar presentes alguns dímeros, não sendo visível a mudança da posição deste pico nos diferentes PMI e PNI.



**Fig. 14** – Espectros de infravermelho do monómero (AM), agente de reticulação (TRIM) e de um dos PMI sintetizados (PMI5), obtidos pela técnica de FTIR.

A extracção da molécula molde do sítio de ligação dos PMI pôde também ser confirmada por EI, devido à ausência dos picos característicos das amins secundárias aromáticas (vibração de estiramento C-N – 1350-1280  $\text{cm}^{-1}$ ; vibração de estiramento N-H – 3450  $\text{cm}^{-1}$ ; vibração de estiramento C-H – 3130-3070  $\text{cm}^{-1}$ ; vibração de estiramento C=C-C aromático - 1510-1450  $\text{cm}^{-1}$ ), como é visível na comparação do espectro de um dos PMI, PMI5, com o espectro da DFA (figura 15).



**Fig. 15** - Espectros de infravermelho obtidos para a DFA e PMI5.

### **III.2.2) Caracterização Morfológica**

#### **III.2.2.1) Microscopia de Varrimento Electrónico**

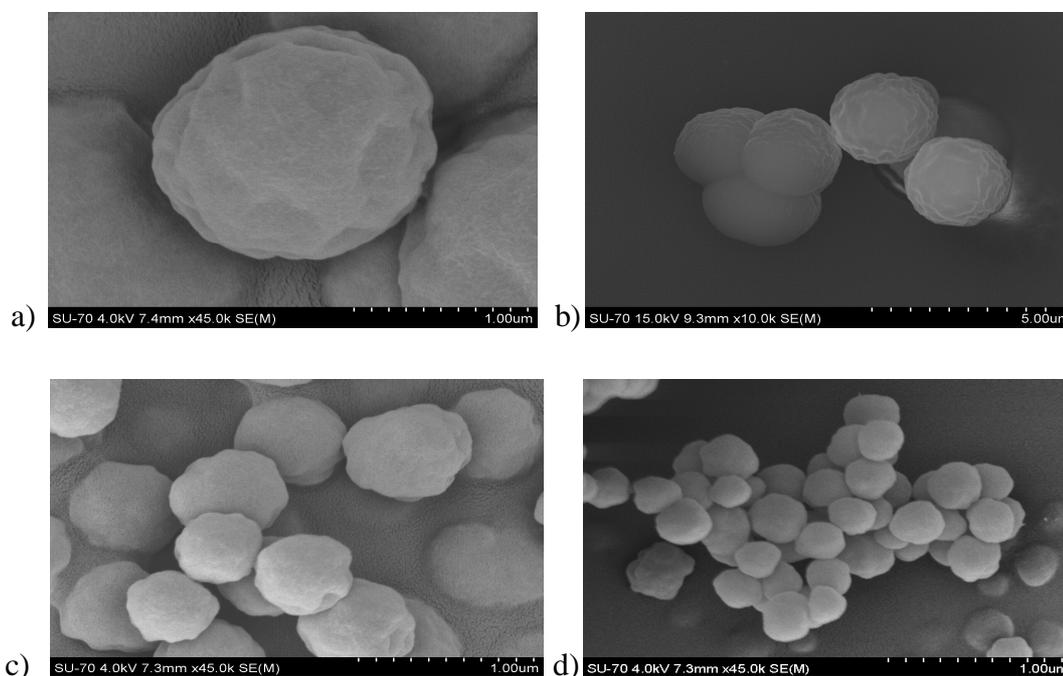
A morfologia dos polímeros sintetizados, impressos e não impressos, foi avaliada através da técnica microscópica de varrimento electrónico (MVE).

O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se fundamentalmente no bombardeamento da amostra (sólida) com electrões, os quais vão interagir com a mesma,

resultando na emissão de electrões secundários e raios-x. O sinal que deriva da interacção electrão - amostra revela informação qualitativa sobre a amostra incluindo morfologia (textura), topografia, estrutura cristalina e orientação dos materiais que constituem a amostra [114]. Uma vez que os polímeros sintetizados não são condutivos, houve necessidade de aplicar um revestimento (ouro) de modo a que este não provocasse alterações na estrutura observada.

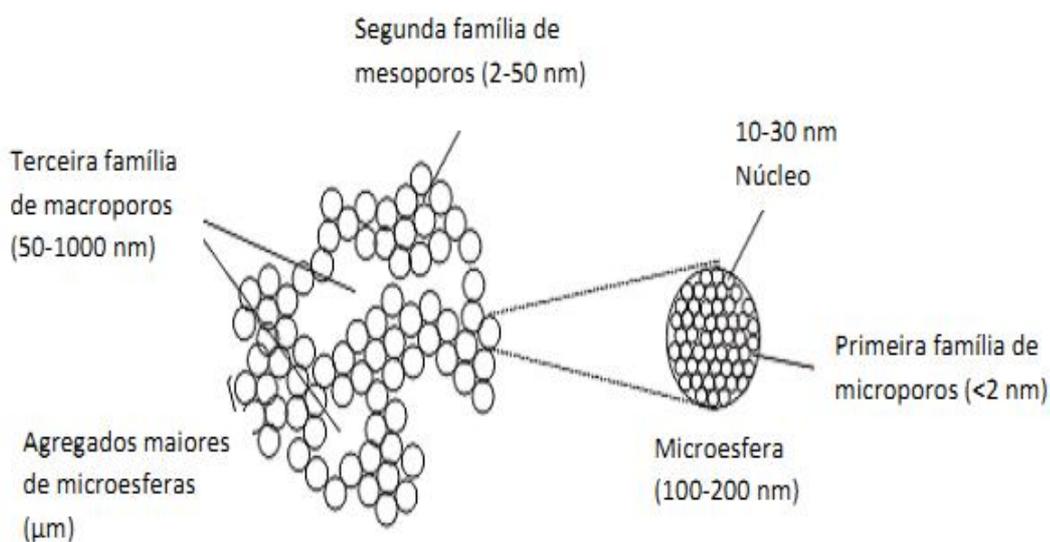
Em seguida encontram-se as imagens obtidas pela técnica de MVE. As imagens obtidas mostram que as polimerizações efectuadas levaram à produção de micropartículas, aproximadamente esféricas, que diferem essencialmente no tamanho (figura 16). As partículas dos PMI são de menor dimensão comparativamente às partículas dos PNI, sendo o seu diâmetro aproximadamente: 0,29-0,84  $\mu\text{m}$  e 1,60-2,80  $\mu\text{m}$  respectivamente.

Na literatura ainda não está esclarecida a influência da molécula molde no tamanho das partículas sintetizadas. Alguns autores referem que não verificaram uma relação, enquanto outros observaram que as partículas não impressas eram maiores que as impressas [115].

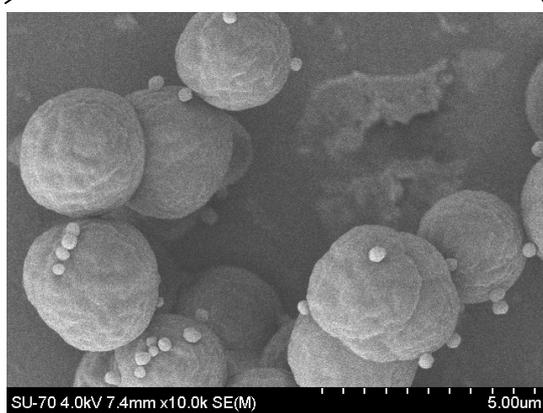
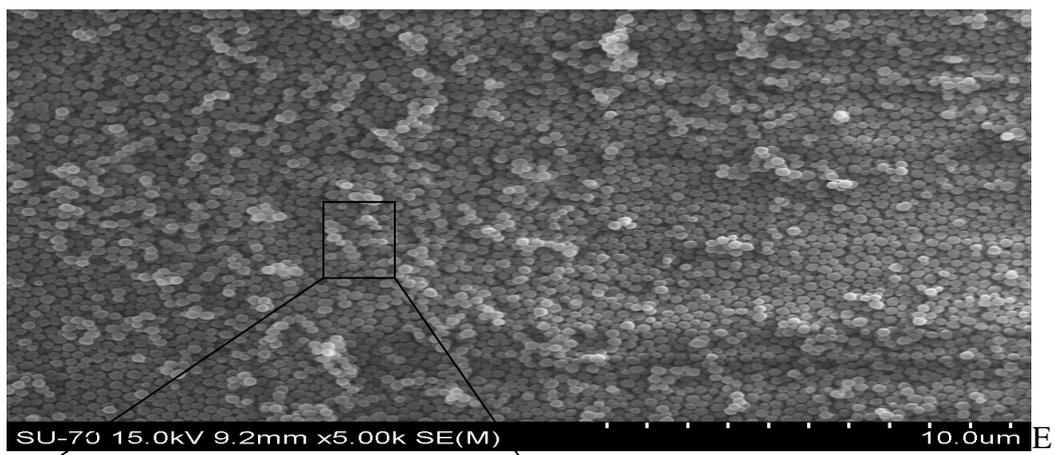


**Fig.16** - Imagens obtidas pela técnica SEM: a e b) PNI sintetizados; c e d) PMI sintetizados.

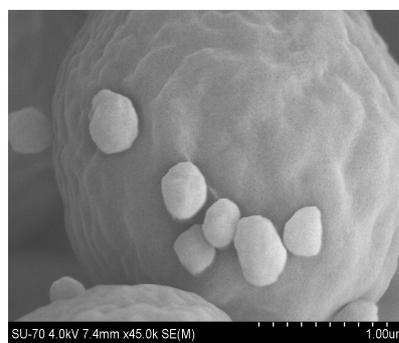
A morfologia dos PMI, surge a partir de núcleos que se formam ao redor do iniciador, o qual cresce cerca de 10-30 nm em diâmetro e que em seguida se agrega para formar microesferas (figura 17). Estas, por sua vez, agregam-se em grupos maiores que passam a formar o corpo das esferas/partículas. A porosidade e a resultante área de superfície dos PMI podem formar-se a partir de espaços vazios e irregulares, localizados entre os grupos das microesferas, ou a partir de espaços intersticiais de um dado grupo de microesferas, ou até mesmo dentro das próprias microesferas [30]. Na figura 18 é nítida a agregação de microesferas de menor tamanho ao corpo da micropartícula de maior tamanho, que por sua vez é constituída por nanopartículas esféricas como é visível na figura 18c. A maior ou menor agregação, não controlada, das nano/micropartículas é responsável pelos diferentes tamanhos das partículas sintetizadas e consequentemente pelas heterogeneidades microestruturais observadas.



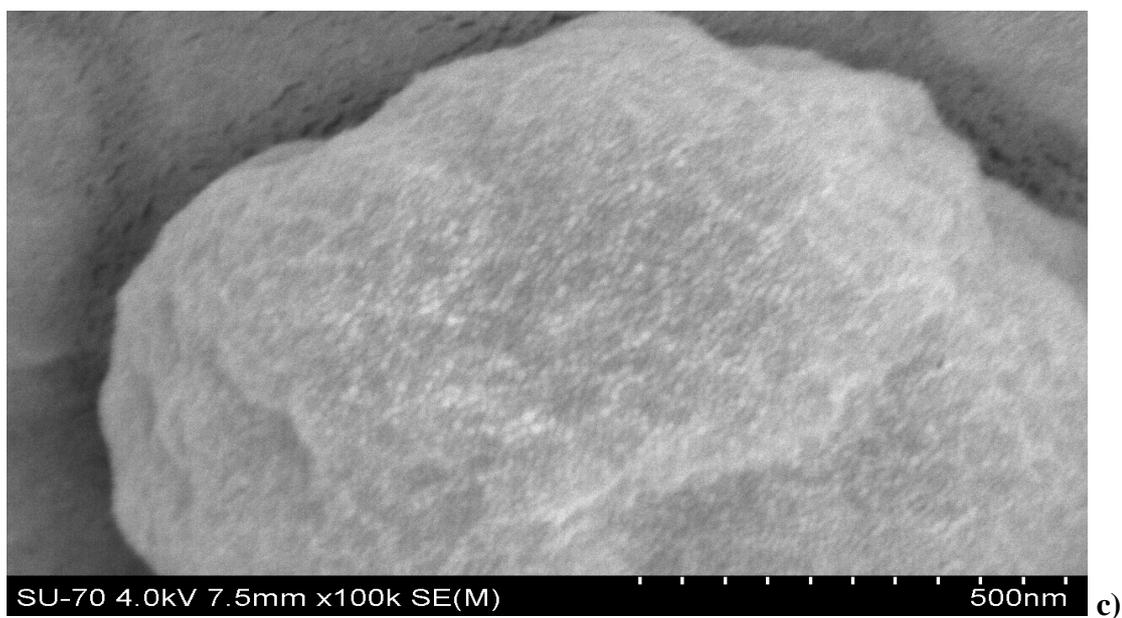
**Fig. 17** - Modelo da formação da morfologia que origina a rede porosa nos PMI [30].



a)



b)



**Fig. 18** - a e b) Agregação de microsferas dos PMI; c) Microsfera de PMI constituída por nanoparticulas de PMI aglomeradas.

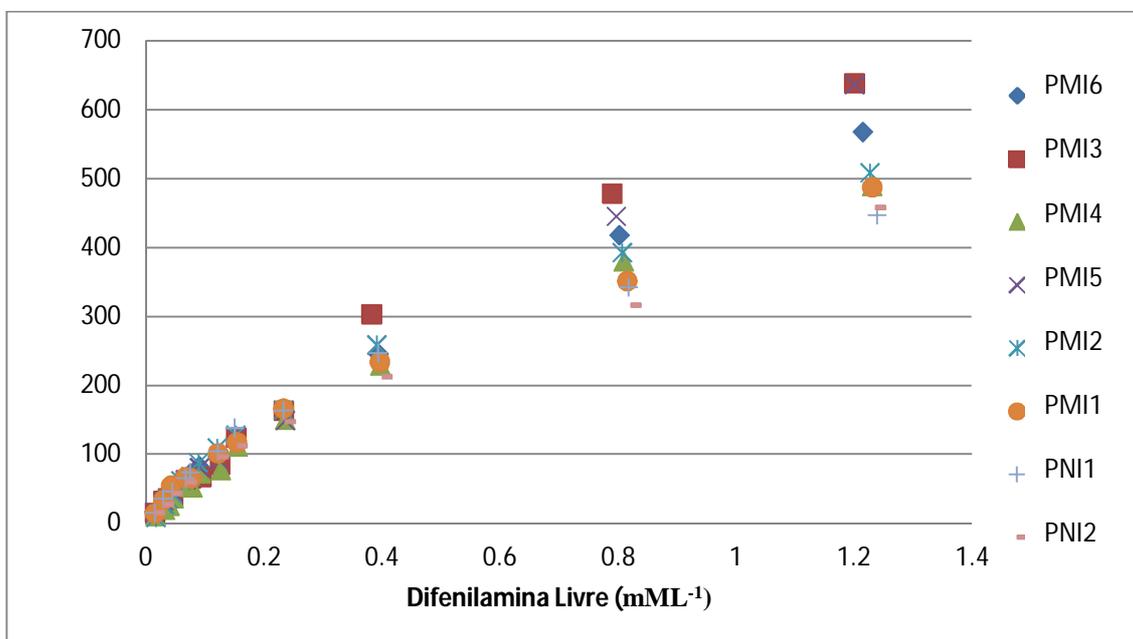
### III.2.3) Caracterização do Reconhecimento Molecular

#### III.2.3.1) Estudos de Religação – Capacidade de Ligação

Geralmente, os polímeros possuem a capacidade de estabelecer ligações através de interações específicas e não específicas. As interações específicas são maioritariamente originadas pelo processo de impressão, o qual cria sítios de religação selectivos para a molécula molde [30].

As características de ligação dos polímeros sintetizados foram avaliadas através da realização de experiências de religação, analisadas em equilíbrio. As interações específicas e não específicas foram avaliadas através da quantificação da ligação do polímero impresso e não-impresso relativamente à molécula molde.

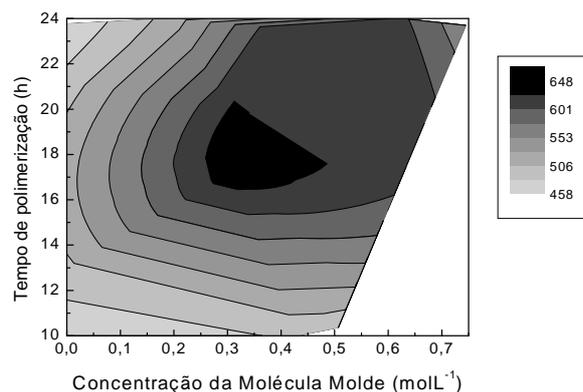
Na figura 19 encontra-se representada a quantidade de DFA adsorvida ao PMI ( $\text{mmolL}^{-1}$ ) em função da quantidade de DFA livre em solução por grama de polímero ( $\mu\text{molg}^{-1}$ ), após o contacto com o PMI.



**Fig. 19** – Gráfico do estudo de religação dos polímeros sintetizados, impressos e não impressos.

Analisando o gráfico, verificou-se um aumento da quantidade de DFA adsorvida ao polímero com o aumento da concentração de DFA inicial, variando este de forma linear para as concentrações mais baixas e adquirindo a forma aproximadamente exponencial para concentrações mais elevadas. Nesta experiência de religação, o gráfico da quantidade ligada *versus* quantidade livre da molécula molde, não apresenta o perfil de saturação, devido, provavelmente, ao aumento linear das ligações não específicas ou devido ao condicionamento da gama de concentrações utilizadas, devido à baixa solubilidade da DFA em soluções aquosas ( $300 \text{ mgL}^{-1}$ ). Assim, não é possível a visualização do comportamento de ligação dos PMI sintetizados para concentrações acima de  $1,77 \text{ mL}^{-1}$ . Uma outra razão que dificulta atingir a região de saturação, para a maior parte dos polímeros impressos não covalentemente, é a sua heterogeneidade, pois, a maior parte das vezes, mantém o ponto de saturação acima da gama das concentrações normalmente usadas ( $> \text{ mM}$ ) [70].

Relativamente ao efeito do tempo de polimerização e quantidade de molécula molde na capacidade de retenção da molécula molde, verificou-se que para as polimerizações que ocorreram num tempo total de 24h, o aumento da quantidade de molécula molde de 0,2 para 0,5 mmol levou a uma maior capacidade de retenção da molécula molde. No entanto, quando a quantidade de molécula molde foi aumentada para 0,75 mmol verificou-se uma diminuição da capacidade de retenção, comparativamente à polimerização com 0,5 mmol da molécula molde. Para polimerizações de dez horas, o aumento da concentração de molécula molde de 0,2 para 0,5 mmol não alterou a capacidade de retenção dos PMI sintetizados, apresentando capacidades de adsorção semelhantes. Assim, na síntese de PMI específicos para a DFA, um maior tempo de polimerização (24 h) leva a uma maior capacidade de retenção da molécula molde, sendo esta capacidade influenciada pela quantidade de molécula molde usada, e a interação destes factores (concentração da molécula molde e tempo de polimerização) não linear, apresentando um máximo no nível médio de ambos os parâmetros (figura 20). Esta não linearidade foi confirmada pela síntese do polímero com uma concentração de molécula molde superior à do PMI 5, o PMI6, o qual demonstrou menor capacidade de ligação que o PMI5, como foi referido em cima.



**Fig. 20** – Gráfico de contorno da capacidade de ligação das partículas (Q) dos PMI sintetizados à DFA vs concentração da molécula molde e tempo de polimerização

O efeito de impressão dos PMI foi avaliado de acordo com a razão BPMI/BPNI, a qual representa a razão entre a quantidade de molécula molde ligada ao PMI comparativamente à quantidade ligada ao PNI. O valor desta razão encontra-se representado na tabela 5, para cada concentração de DFA usada.

**Tabela 5** - Razão entre a capacidade de ligação (Q) de cada um dos PMI relativamente à quantidade ligada ao PNI1.

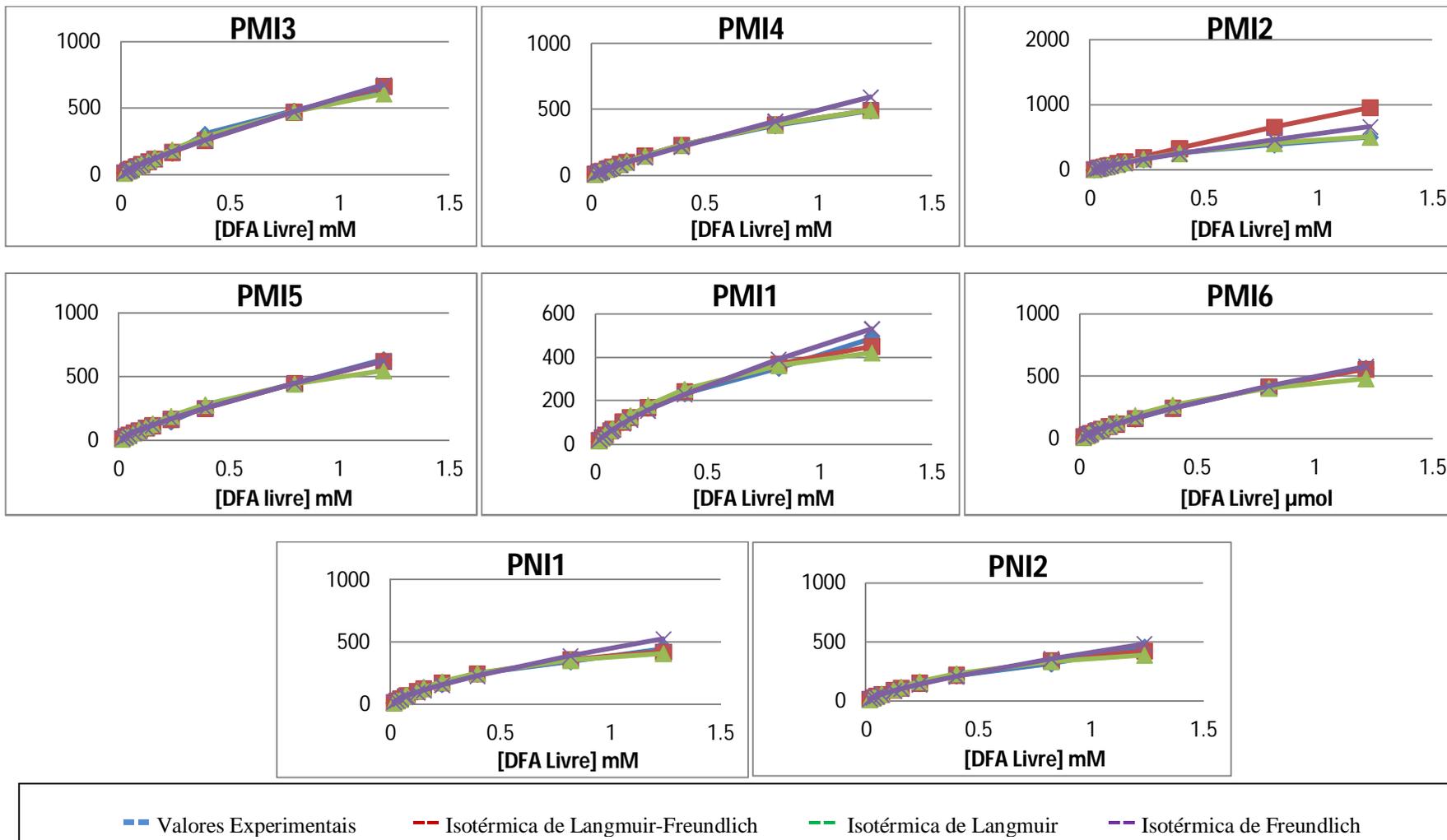
<b>Polímero sintetizado</b>	<b>Q (μmol/g)</b>	<b>Razão BPMI/B PNIM</b>
<b>PMI1</b>	488 (12)	1,09
<b>PMI2</b>	517 (8)	1,14
<b>PMI3</b>	648 (3)	1,42
<b>PMI4</b>	479 (6)	1,09
<b>PMI5</b>	636 (7)	1,43
<b>PMI6</b>	555 (3)	1,27
<b>PNI1</b>	460 (8)	-
<b>PNI2</b>	458 (6)	-

Atendendo à tabela apresentada, verifica-se que o PMI5 e PMI3 possuem uma maior capacidade de retenção da molécula molde comparativamente com os restantes PMI e PNI, sendo as razões BPMI/BPNIM 1,43 e 1,42, respectivamente.

### **III.2.3.2) Isotérmicas de Ligação**

A capacidade de ligação de dois polímeros pode ser avaliada usando as isotérmicas de ligação. A determinação dos parâmetros de ligação a partir de uma isotérmica requer a aplicação de um modelo de ligação específico. Os modelos de Langmuir, bi-Langmuir, Freundlich, e Langmuir-Freundlich têm sido aplicados aos PMI [68-71]. Cada um destes modelos especifica uma certa relação matemática entre as concentrações ligada (B) e livre (F) da molécula analito (molécula molde) na isotérmica de ligação.

Os dados obtidos durante a experiência de religação foram representados graficamente de forma a obter informação sobre a heterogeneidade dos PMI e PNI sintetizados segundo os modelos de Freundlich, Langmuir e Langmuir – Freundlich (figura 21).



**Fig. 21** – a-h) Representações gráficas dos dados do estudo de religação e correspondente ajuste pelas isotérmicas de Langmuir-Freundlich (IL-F), Freundlich (IF) e Langmuir (IL) para cada um dos PMI e PNI sintetizados.

**Tabela 6** - Valor do coeficiente de determinação para cada uma das isotérmicas de ligação (IL-F, L e F) aplicadas à isotérmica experimental dos PMI e PNI sintetizados.

Polímero	R <sup>2</sup>		
	Langmuir –Freundlich Isotherm	Langmuir Isotherm	Freundlich Isotherm
<b>PMI1</b>	0,988	0,986	0,982
<b>PMI2</b>	0,998	0,973	0,982
<b>PMI3</b>	0,993	0,987	0,993
<b>PMI4</b>	0,994	0,994	0,986
<b>PMI5</b>	0,996	0,986	0,996
<b>PMI6</b>	0,988	0,938	0,989
<b>PNI1</b>	0,994	0,994	0,981
<b>PNI2</b>	0,997	0,993	0,993

Segundo os coeficientes de determinação (tabela 6) para cada um dos PMI sintetizados, todos os modelos testados (Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich) são capazes de modelar com precisão a isotérmica experimental.

Na tabela 7 encontram-se representados os coeficientes de ajuste para a isotérmica de ligação de Freundlich pois este modelo tem em conta a heterogeneidade dos PMI ao contrário da isotérmica de Langmuir que se trata de um modelo de ligação homogéneo. Apesar do modelo de LF ter igualmente em conta a heterogeneidade das micropartículas, neste caso, os seus coeficientes de ajuste não podem ser estimados com precisão nesta gama de concentrações de DFA livre.

A aplicação do modelo de Freundlich aos PMI permite obter directamente o coeficiente de ajuste  $m$ , e o factor pré-exponencial  $a$ , através da equação 22 (página 52). Estes parâmetros possuem um significado físico, o índice  $m$  é uma medida da heterogeneidade dos PMI, podendo assumir valores entre 0 e 1, sendo os PMI mais heterogéneos para menores valores de  $m$ . O factor pré-exponencial,  $a$ , é uma medida da

capacidade de ligação dos PMI, podendo ser relacionado com o número de sítios de ligação e afinidade média segundo as equações 24 e 25 (página 53).

**Tabela 7** - Valores da capacidade de ligação obtidos na isotérmica experimental ( $Q$ ), do índice de heterogeneidade  $m$  e do parâmetro  $a$  da isotérmica de Freundlich.

<b>Polímero</b>	<b><math>Q, \mu\text{molg}^{-1}</math></b>	<b><math>a, \mu\text{molg}^{-1}\text{M}^{-1}</math></b>	<b><math>m</math></b>
<b>PMI1</b>	488 (12)	420 (5)	0,67 (0,02)
<b>PMI2</b>	517 (8)	451 (8)	0,69 (0,02)
<b>PMI3</b>	648 (3)	567 (11)	0,81 (0,03)
<b>PMI4</b>	479 (6)	430 (7)	0,75 (0,02)
<b>PMI5</b>	636 (7)	536 (10)	0,81 (0,02)
<b>PMI6</b>	555 (3)	492 (2)	0,76 (0,01)
<b>PNI1</b>	460 (8)	396 (8)	0,62 (0,02)
<b>PNI2</b>	458 (6)	387 (6)	0,69 (0,02)

Observando os valores do parâmetro de ligação  $m$ , segundo o modelo de Freundlich, os PMI3 e PMI5 são aqueles que demonstram ser menos heterogéneos, apresentando o maior valor do índice  $m$  (0,81). Já os PNI sintetizados revelaram ser mais heterogéneos que todos os PMI sintetizados.

Segundo as equações 24 e 25 (página 53), que estabelecem a relação do factor pré-exponencial com o número de sítios de ligação, para uma determinada constante de afinidade  $K$ , quanto maior o valor de  $a$  maior será o número de sítios de ligação do PMI. Assim, atendendo aos valores de  $a$  obtidos para cada um dos PMI, os PMI3 e PMI5 serão, provavelmente, os polímeros impressos com maior número de sítios de ligação, tendo estes apresentado uma maior capacidade de ligação à DFA.

Observando os valores de  $m$ ,  $a$  e  $Q$ , para os PNI, para além destes terem demonstrado ser mais heterogéneos, demonstraram também possuir um menor número de

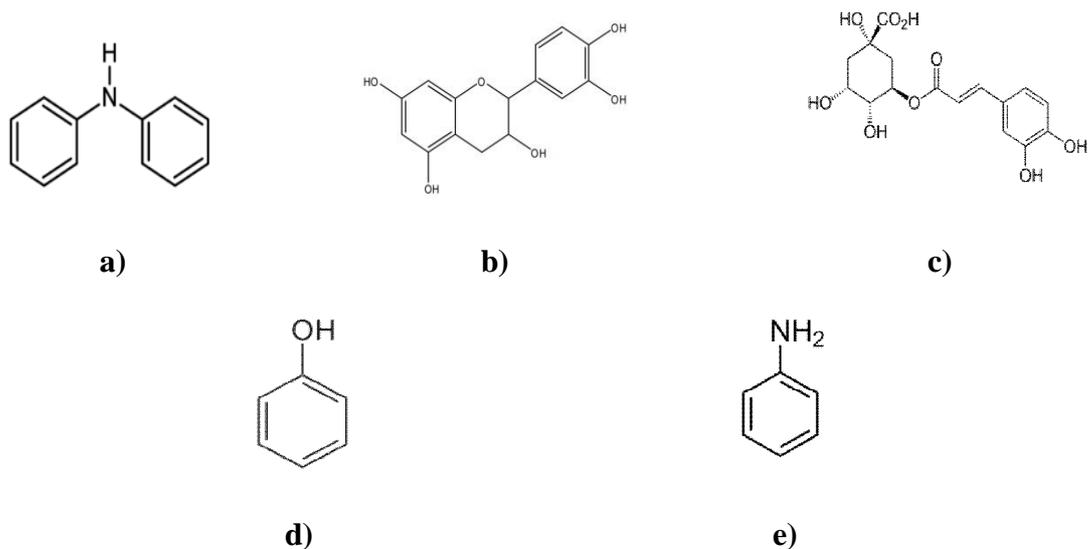
sítios de ligação e de capacidade de ligação à DFA. Assim, como os sítios de ligação presentes nos PNI são de carácter não específico, o maior número de sítios de ligação dos PMI dever-se-á, em parte, à presença de cavidades impressas resultantes do processo de impressão molecular.

### III.3) Estudo de Selectividade

A retenção de compostos que podem constituir possíveis interferentes na detecção da DFA, foi avaliada através da realização um estudo de religação semelhante ao descrito anteriormente, tendo-se usado a anilina, catequina, ácido clorogénico e fenol como possíveis analitos. Estes foram seleccionados atendendo quer ao seu aspecto estrutural quer ao propósito de uso/aplicação dos PMI, uma vez que os compostos testados (exceptuado a anilina) são compostos fenólicos que se encontram presentes na maçã, sendo a sua concentração mais elevada na casca do que na polpa, geralmente cerca de 1,5 vezes mais. A estrutura química da DFA e de cada um dos compostos testados, bem como a proporção em que se encontram na maçã, estão representados respectivamente na figura 22 e na tabela 8.

**Tabela 8** – Quantidade de cada composto fenólico, em estudo, por 100 g de maçã [118].

<b>Composto Fenólico</b>	<b>Quantidade (mg/100g de maçã)</b>
<b>Catequina</b>	0,58 - 8,38
<b>Ácido Clorogénico</b>	4,58 – 37,09



**Fig. 22-** Estrutura química de: a) difenilamina; b) catequina; c) ácido clorogénico; d) fenol; e) anilina.

Na tabela 9 encontra-se representado o valor da razão de selectividade para cada um dos possíveis interferentes. Segundo os resultados obtidos, todos os polímeros impressos retiveram parte dos interferentes em estudo, sendo evidente uma maior retenção por parte dos polímeros não impressos.

**Tabela 9** – Valores do coeficiente de selectividade para cada um dos compostos testados e PMI e PNI sintetizados. O desvio padrão encontra-se em parêntesis.

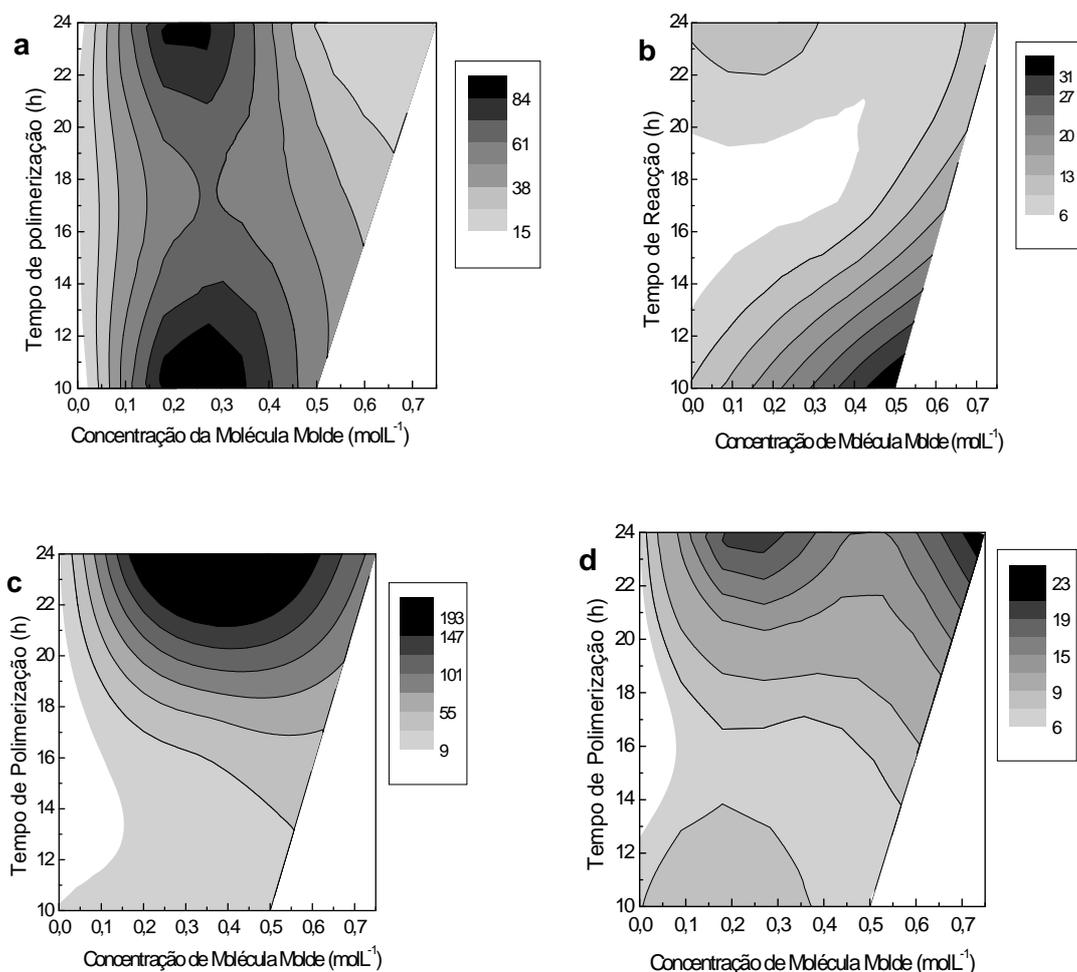
Polímero	Coeficiente de Selectividade			
	Interferente			
	Anilina	Catequina	Ácido Clorogénico	Fenol
MIP1	96(11)	19 (1)	14 (2)	9 (0,5)
MIP2	92 (2)	12 (5)	170 (18)	20 (2)
MIP3	59 (16)	6 (0,5)	44 (5)	7 (1)
MIP4	52 (4)	34 (1)	31 (4)	6 (1)
MIP5	23 (2)	6 (5)	193 (20)	14 (2)
MIP6	20 (1)	12 (2)	92 (5)	23 (1)
NIP1	3 (1)	10 (0,9)	10 (0,5)	7 (0,5)
NIP2	7 (2)	10 (0,5)	9 (0,5)	6 (0,7)

Os PMI3, PMI4 e PMI1 demonstraram, comparativamente aos restantes, ser mais selectivos para a anilina. Por outro lado os PMI6, PMI5 e PMI2 demonstraram maior selectividade para o ácido clorogénico. Para a catequina o PMI4 e PMI1 foram os mais selectivos. Já para o fenol o PMI4 e PMI6 e PMI2 foram os que apresentaram maior razão de selectividade e consequentemente maior selectividade. Assim, nenhum dos PMI sintetizados demonstrou possuir maior ou menor selectividade para todos os compostos em estudo, variando de “interferente para interferente”. Tal pode dever-se a possíveis diferenças na microporosidade da rede polimérica, o que condiciona a difusão do composto até ao sítio de ligação. Uma outra possível explicação poderá residir na dimensão do próprio local de ligação impresso, onde apenas os compostos que possuam a estrutura com o tamanho adequado ou complementar à mesma poderão estabelecer ligação. No entanto, todos os PMI sintetizados demonstraram possuir uma maior afinidade para a DFA uma vez que a quantidade de DFA retida, para a mesma concentração inicial de interferente e de DFA ( $0,10\text{mmolL}^{-1}$ ), foi superior para todos os PMI, sendo esta afinidade superior à demonstrada pelos PNI sintetizados.

**Tabela 10** - ANOVA para os factores que afectam a capacidade de ligação (Q), os parâmetros da isotérmica de Freundlich (a e m) e os coeficientes de selectividade para a anilina ( $K_{\text{DFA/An}}$ ), catequina ( $K_{\text{DFA/Cat}}$ ), ácido clorogénico ( $K_{\text{DFA/AC}}$ ) e fenol ( $K_{\text{DFA/Fe}}$ ).

Efeitos Parâmetros	p-valores		
	Concentração	Tempo de polimerização	Concentração x Tempo de polimerização
Q	0,0002	0	0,0002
$K_{\text{DFA/An}}$	< 0,0001	0,821	< 0,0001
$K_{\text{DFA/Cat}}$	0,157	0,005	< 0,0001
$K_{\text{DFA/AC}}$	0,038	0,002	< 0,0001
$K_{\text{DFA/Fe}}$	0,014	0,013	< 0,0001

De acordo com a tabela 10, o efeito da concentração foi significativo para a selectividade de todos os compostos interferentes excepto a catequina, já o efeito do tempo de polimerização foi significativo para a selectividade de todas as substâncias excepto para a anilina. O efeito de interacção foi significativo na selectividade dos quatro interferentes.



**Fig. 23** - Gráficos de contorno dos coeficientes de selectividade dos polímeros sintetizados relativamente a: a) anilina, b) catequina, c) ácido clorogénico e d) fenol vs tempo de polimerização e concentração de molécula molde.

Os gráficos de contorno demonstram que a interacção dos efeitos entre a selectividade e as condições de síntese é não linear e dependente do interferente (figura 23 a-d). No caso da anilina, a concentração de molécula molde possuiu o maior efeito na selectividade do polímero, a qual foi maior para a menor concentração da molécula molde,

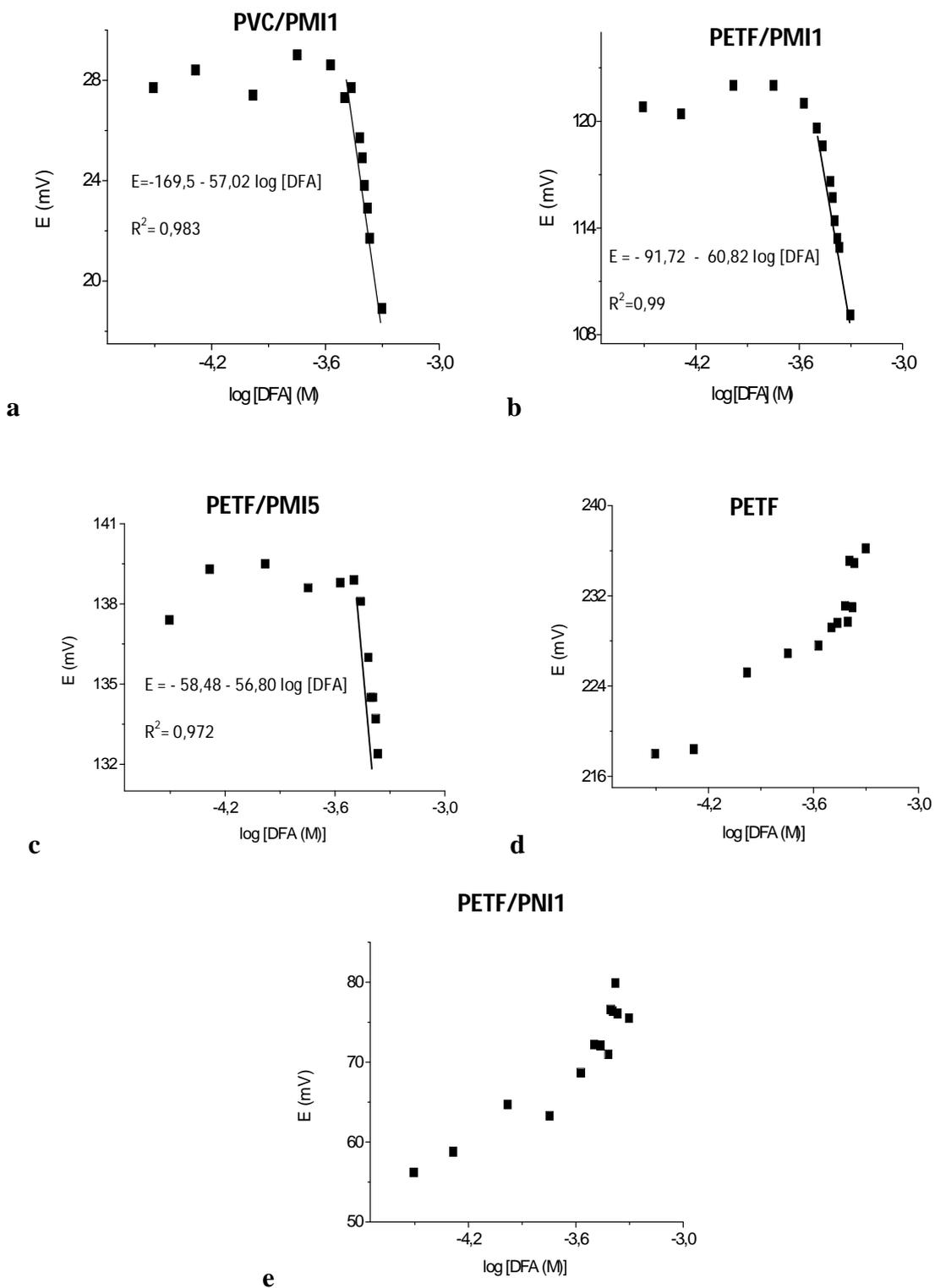
independentemente do tempo de polimerização (figura 23 a). Por outro lado, a selectividade para o ácido clorogénico e fenol foi maior para o tempo de reacção maior e não dependeu da concentração da molécula molde (figura 23 c e d). A dependência da selectividade para a catequina demonstrou ser mais complexa, com uma selectividade máxima observada para o polímero com maior concentração da molécula molde e menor tempo de reacção, seguida pelos polímeros com capacidade de retenção de 0,2 mol, independentemente do tempo de polimerização. Não foi possível tirar uma conclusão clara acerca do efeito do tempo de polimerização ou concentração de molécula molde com base nos dados obtidos para a selectividade, o que dificultou a escolha dos polímeros impressos para a preparação do sensor.

Dois dos polímeros impressos, PMI1 e PMI5, os quais demonstraram maior selectividade para a anilina e ácido clorogénico, respectivamente, foram escolhidos para a preparação do sensor. Foram também preparados um sensor contendo o polímero não impresso PNI1 e outro sem qualquer incorporação de PMI ou PNI.

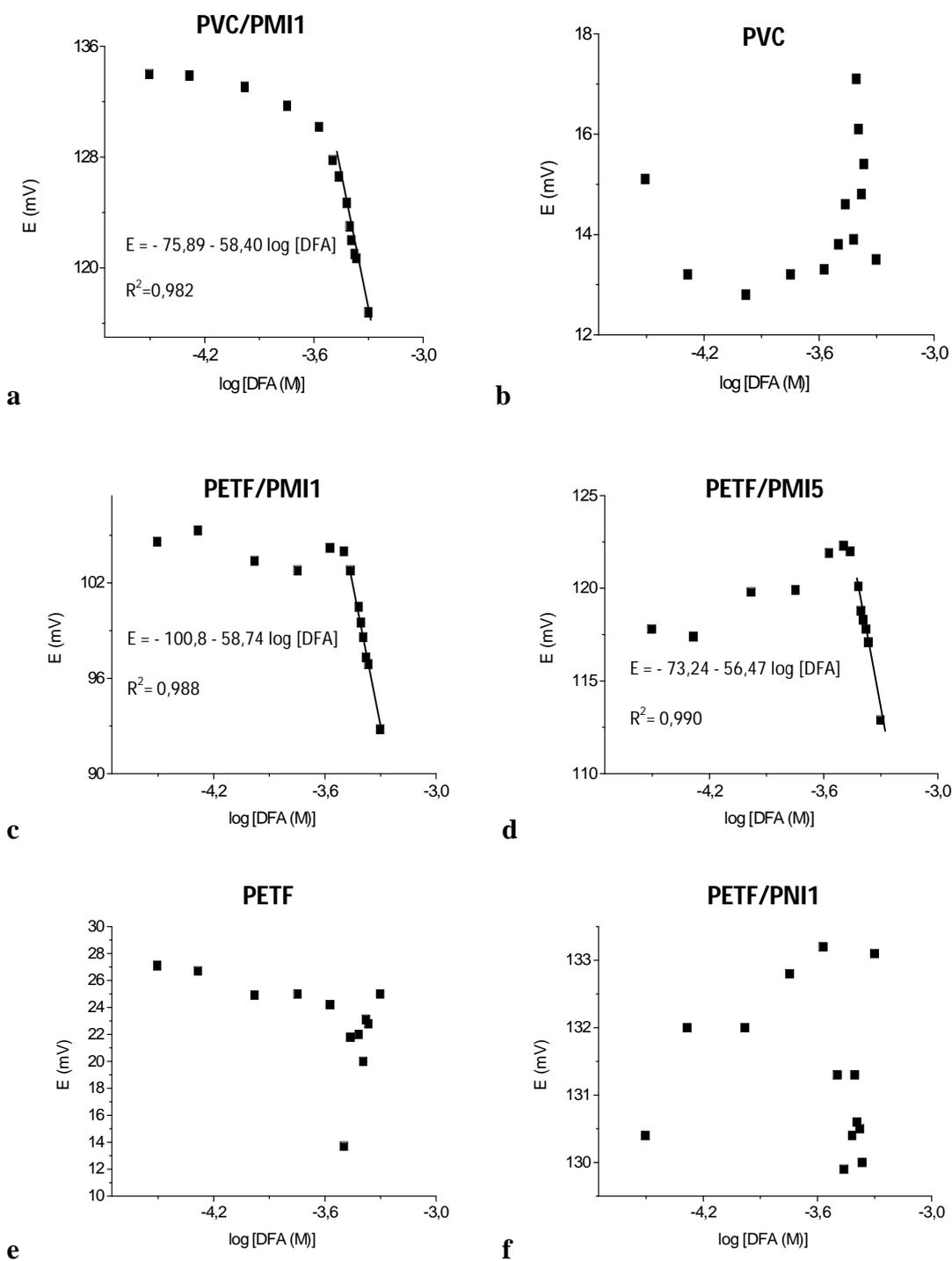
### **III.4) Caracterização do Desempenho Analítico dos Sensores Elaborados**

#### **III.4.1) Calibração do sensor**

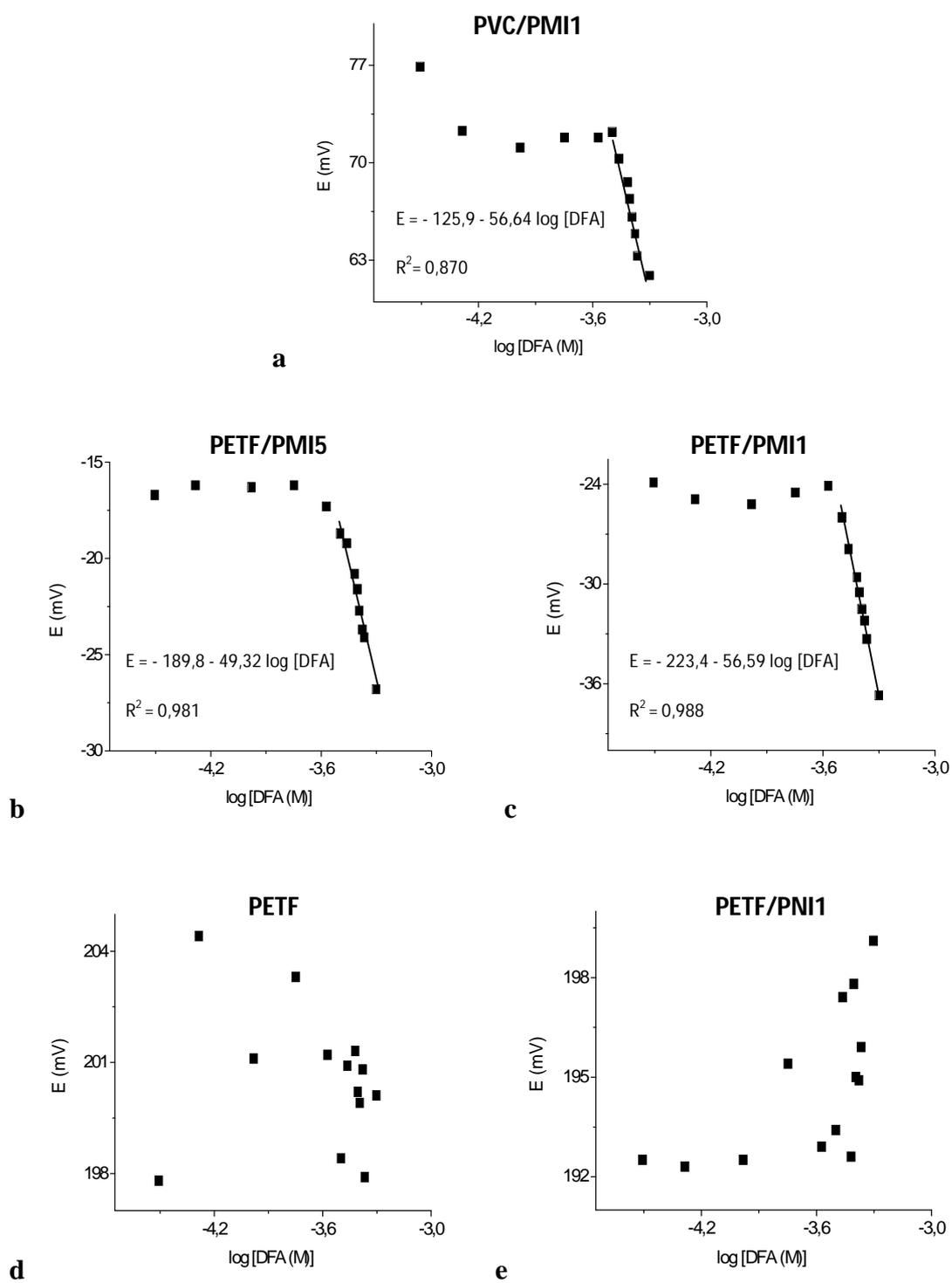
Para a determinação do pH óptimo de funcionamento dos sensores elaborados, baseados em PVC e PTEF, realizaram-se várias calibrações a diferentes valores de pH (2, 4, 6 e 9) que se encontram representadas nas figuras 24-27. O pH óptimo escolhido foi de 2 e 4, uma vez que para estes valores de pH a resposta dos sensores elaborados se encontra mais próxima da Nernstiana. As suas características potenciométricas para o pH 2 e 4 encontram-se expostas nas tabelas 10 e 11.



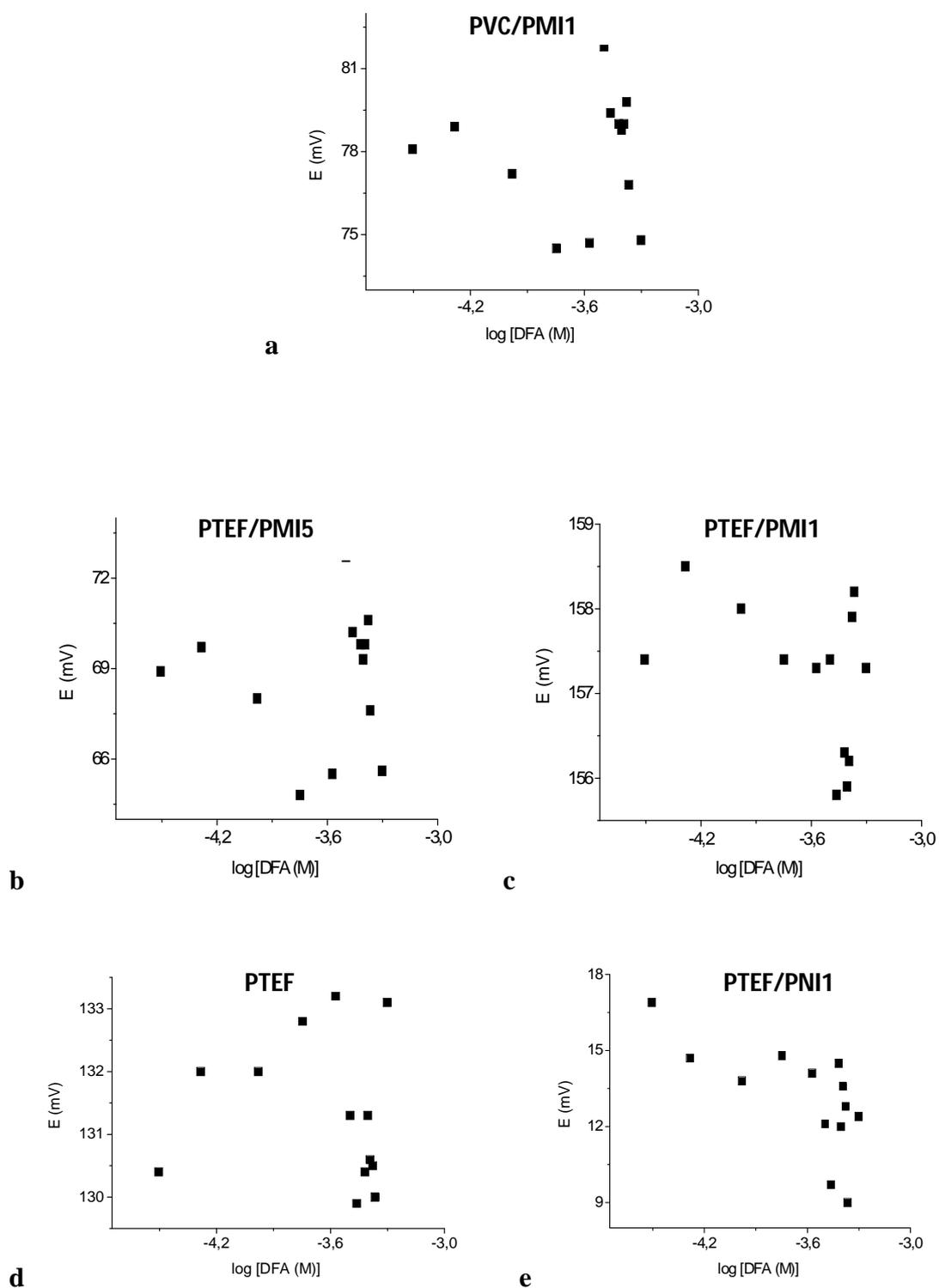
**Fig. 24** - a) Resposta potenciométrica do sensores a pH 2. a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) b) PTEF/PMI1; c) PTEF/PMI5; d) PTEF, e) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.



**Fig. 25** - a) Resposta potenciométrica dos sensores a pH 4. a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) b) PVC; c) PTEF/PMI1; d) PTEF/PMI5; e) PTEF; f) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.



**Fig. 26** - a) Resposta potenciométrica do sensores a pH 6. a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) b) PTEF/PMI5; c) PTEF/PMI1; d) PTEF, e) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.



**Fig. 27** - a) Resposta potenciométrica dos sensores a pH 9. a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI) b) PTEF PMI1/; c) PTEF/PMI5; d) PTEF, e) PTEF/PNI1. Medições efectuadas à temperatura ambiente.

**Tabela 11** – Características potenciométricas do sensor baseado em PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI), a pH4. MA - Material activo; P – Plastificante; AI- Aditivo iónico; LD- Limite de detecção; GL- Gama linear. A percentagem de material activo relativamente ao peso total da membrana encontra-se entre parêntesis.

<b>pH</b>	<b>Declive (mV/década) [a]</b>	<b>R<sup>2</sup> (n=5)</b>	<b>LD (M)</b>	<b>GL (M)</b>
2	-57,0 ± 0,4	0,983	2,88x10 <sup>-4</sup>	3,45x10 <sup>-4</sup> – 5x10 <sup>-4</sup>
4	-58,6 ± 0,3	0,987	2,88x10 <sup>-4</sup>	3,45x10 <sup>-4</sup> – 5x10 <sup>-4</sup>

[a]  $x = \bar{x} \pm t_{0,95} \times s_x$  para  $n = 5$  e  $t_{0,95} = 2,78$  (tabelado).  $s_x$  refere-se ao desvio padrão da média.

**Tabela 12** - Composição da membrana e características do desempenho analítico do sensor baseado em PETE, a pH4. MA - Material activo LD- Limite de detecção; GL- Gama linear; R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação.

<b>MA</b>	<b>pH</b>	<b>Declive [a] (mV/década)</b>	<b>R<sup>2</sup> (n=5)</b>	<b>LD (M)</b>	<b>GL (M)</b>
<b>PMI1</b>	2	- 60,8 ± 0,8	0,982	3,24x10 <sup>-4</sup>	3,18x10 <sup>-4</sup> – 5x10 <sup>-4</sup>
	4	-58,5 ± 2,7	0,987	3,24x10 <sup>-4</sup>	3,18x10 <sup>-4</sup> – 5x10 <sup>-4</sup>
<b>PMI5</b>	2	-55,3 ± 1,4	0,984	3,50x10 <sup>-4</sup>	3,45x10 <sup>-4</sup> – 5x10 <sup>-4</sup>
	4	-54,6 ± 1,9	0,988	3,50x10 <sup>-4</sup>	3,45x10 <sup>-4</sup> – 5x10 <sup>-4</sup>

[a]  $x = \bar{x} \pm t_{0,95} \times s_x$  para  $n = 5$  e  $t_{0,95} = 2,78$  (tabelado).  $s_x$  refere-se ao desvio padrão da média.

Atendendo às calibrações efectuadas a diferentes pHs, verificou-se que a resposta de ambos os sensores, baseados em PVC e PTEF, era aproximadamente Nernstiana para pH 2 e 4, tendo-se verificado uma diminuição da mesma com o aumento do valor do pH para 6, verificando-se ausência de resposta para pH 9 (figura 24-27). Assim, as calibrações

periódicas, bem como a determinação das características de desempenho dos sensores foram efectuadas a pH4.

Relativamente ao sensor cuja matriz polimérica se baseia em PVC, este apresentou uma resposta Nernstiana (declive teórico de 59,2 mV a 25°C, para iões monovalentes) com declive médio de  $-58,6 \pm 0,3$  e limite de detecção de  $2,88 \times 10^{-4} \text{M}$ . A gama linear medida é bastante estreita, estando limitada por um lado pela baixa solubilidade da DFA e por outro pelo limite de detecção do sensor (tabela 11). A resposta do sensor dever-se-á às micropartículas do PMI1, pois a membrana branco, que apenas contém PVC e plastificante, não apresentou uma relação entre a resposta potenciométrica e o aumento da concentração de DFA (figura 25b), verificando-se quer um ligeiro aumento, quer diminuição do potencial do eléctrodo medido.

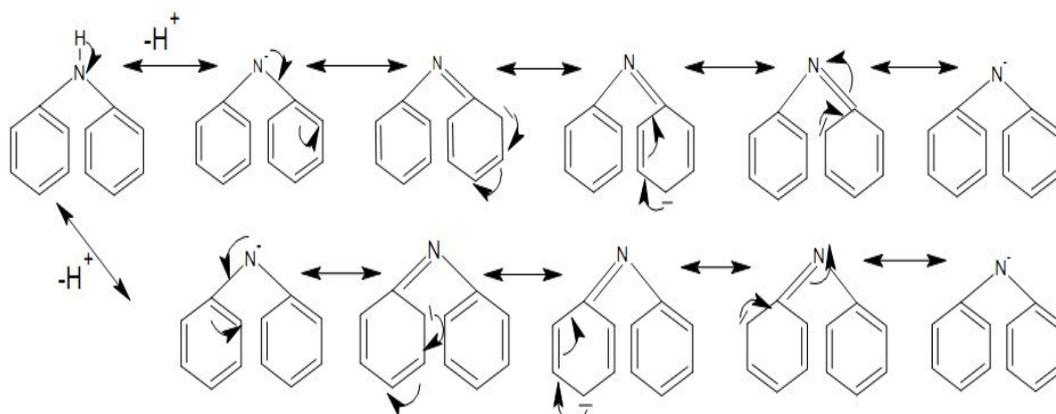
Devido à dificuldade da reprodução de um bom contacto entre a membrana de PVC e a superfície do eléctrodo, e com o intuito de melhorar o limite de detecção do sensor, decidiu-se usar um outro tipo de membrana, baseada na electropolimerização do etiletiltiofeno. Esta escolha prende-se com o facto de o polímero resultante ser condutor, o que à partida melhoraria a condutividade da membrana e ainda pelo facto da síntese da membrana ser *in situ*.

Atendendo aos resultados obtidos para os sensores, cujas membranas se baseiam em PTEF, verificou-se uma resposta aproximadamente Nernstiana para os eléctrodos, cuja membrana incorporava as micro partículas do PMI1 e do PMI5. Estes apresentaram um declive médio de  $-58,5 \pm 2,7$  e  $-54,6 \pm 1,9$  e limite de detecção de  $3,24 \times 10^{-4}$  e  $3,50 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ , respectivamente (tabela 12), no entanto não se conseguiu diminuir o limite de detecção (LD membrana PVC =  $2,88 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ ). Apesar disso, estas membranas (comparativamente ao eléctrodo com membrana de PVC) são de aplicação mais fácil e reprodutível, uma vez que a elaboração das membranas é feita *in situ* e de modo controlado, não envolvendo o operador.

Nestes eléctrodos, a resposta do sensor dever-se-á às micropartículas do PMI1 e PMI5, pois as membranas branco, que contém apenas PETF e PETF/micro partículas do polímero não impresso (PNI1), não apresentaram uma relação entre o valor do potencial e o aumento da concentração de DFA. Nestas membranas verifica-se quer um aumento quer

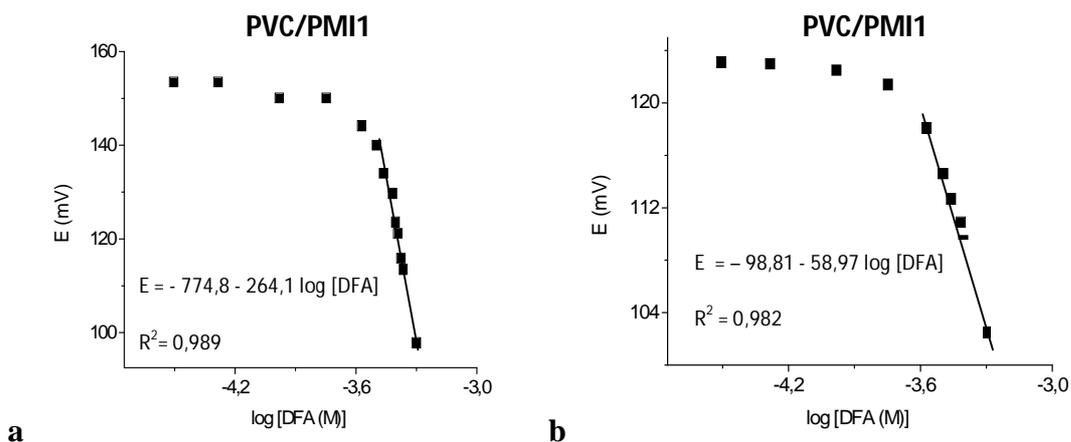
uma diminuição do potencial do eléctrodo (figura 25e e 25f). Assim, as ligações da DFA ao PMI deverão ocorrer maioritariamente nos sítios de ligação formados aquando da síntese dos PMI, sendo portanto maioritariamente ligações específicas

A resposta dos sensores à DFA apresenta uma resposta Nernstiana aniónica, o que significa que o sensor responde a um anião. Tal deve-se ao facto das aminas primárias e secundárias serem mais ácidas que as aminas alifáticas. A DFA, arilamina secundária, possui um pKa de 0,79, estando portanto presente em forma de anião (figura 28) em todos os pH estudados. O ácido metacrílico, por sua vez, possui um pKa de 4,66 que durante a polimerização sofre ainda um aumento, passando a ser de 6,7 [119 - 121]. Assim, a pH 2 e 4 os grupos carboxílicos do polímero não se encontram dissociados. No entanto, a pH 6 e 9 cerca de 17% e 67% dos grupos carboxílicos estão dissociados e conseqüentemente a resposta do sensor à DFA diminui devido à repulsão electrostática do anião e dos grupos carboxílicos do polímero carregados negativamente.



**Fig. 28** - Formação do anião responsável pela resposta aniónica do sensor e respectivas estruturas de ressonância.

Ao longo das calibrações efectuadas verificou-se que a resposta Nernstiana, para o sensor baseado em PVC, só era conseguida quando se hidratava a membrana do sensor em água (aproximadamente 1h), previamente, ao início das medições, uma vez que o sensor era deixado ao ar quando não utilizado (fig. 29a e 29b). Pelo que a resposta Nernstiana do sensor requer a hidratação prévia da membrana. Assim, para garantir a hidratação da membrana e proporcionar a comparação com o eléctrodo de membrana de PVC, os sensores baseados em PTEF foram deixados em água Mili-Q sempre que não utilizados.



**Fig 29** – Resposta potenciométrica do sensor com membrana de PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI). a) Membrana não hidratada previamente à medição da resposta do sensor; b) Membrana hidratada previamente à medição da resposta do sensor. Medições efectuadas a pH4 e temperatura ambiente.

### III.5.2) Tempo de Resposta e Tempo de Vida do Sensor

O tempo necessário para se atingir um potencial do eléctrodo de resposta estável ( $\pm 1\text{mV}$ ) com os sensores elaborados foi sempre inferior a 5min (tempo de intervalo entre cada incremento da concentração de DFA).

Após várias calibrações dos sensores, observaram-se apenas pequenos desvios no seu potencial e mudanças negligíveis na sua resposta.

O limite de detecção (LD), tempo de resposta (TR), gama linear (GL) e declives de calibração não sofreram mudanças significativas durante pelo menos 73 dias (tabela 14), no caso do sensor com membrana de PVC, e durante 30 dias no caso dos sensores com membranas de PTEF (tabela 13). Esta avaliação foi feita por recalibrações periódicas.

**Tabela 13** - Características do desempenho analítico do sensor baseado em membrana de PETF ao longo de 30 dias. LD- Limite de detecção; GL- Gama linear; TR – Tempo de resposta; R<sup>2</sup>- Coeficiente de determinação.

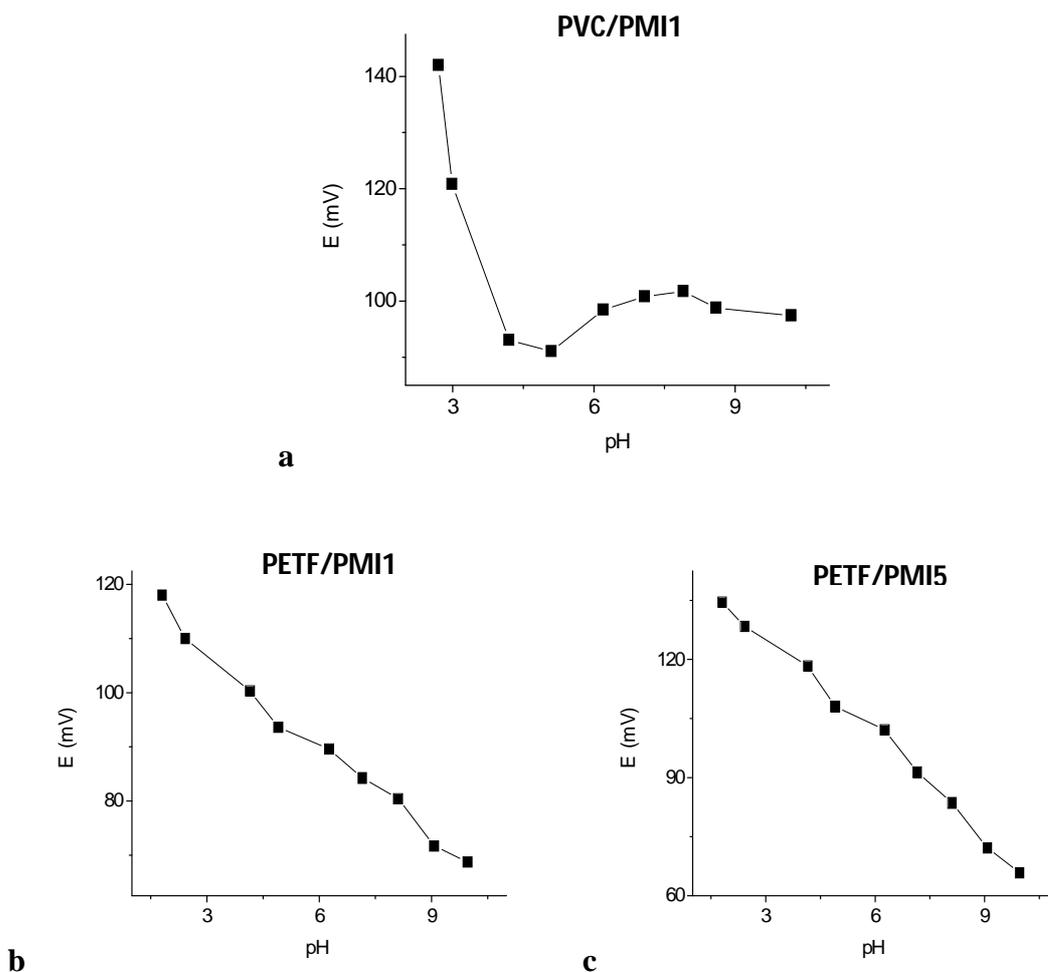
ESI	Dia	Declive	R <sup>2</sup>	LD	TR (min)
<b>PETF/PMI5</b>	<b>2</b>	-52,1	0,986	3,25x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>9</b>	-56,5	0,990	3,40x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>13</b>	-55,0	0,987	3,34x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>20</b>	-54,6	0,986	3,38x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>30</b>	-54,7	0,990	3,34x10 <sup>-4</sup>	< 5
<b>PETF/PMI1</b>	<b>2</b>	-54,7	0,992	3,16x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>9</b>	-58,7	0,988	3,17x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>13</b>	-59,9	0,980	3,15x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>20</b>	-59,3	0,988	3,16x10 <sup>-4</sup>	< 5
	<b>30</b>	-59,7	0,989	3,16x10 <sup>-4</sup>	< 5

**Tabela 14** - Características do desempenho analítico do sensor baseado em membrana plastificada de PVC (10% PMI1, sem AI) ao longo de 73 dias. LD- Limite de detecção; GL- Gama linear; TR – Tempo de resposta; R<sup>2</sup>- Coeficiente de determinação.

Dia	Declive	R <sup>2</sup>	LD	TR (min)
<b>7</b>	-58,97	0,982	2,45x10 <sup>-4</sup>	< 5
<b>13</b>	-58,40	0,982	2,91x10 <sup>-4</sup>	< 5
<b>30</b>	-58,55	0,990	2,51x10 <sup>-4</sup>	<5
<b>57</b>	-58,83	0,991	2,62x10 <sup>-4</sup>	< 5
<b>73</b>	-58,42	0,989	2,55x10 <sup>-4</sup>	< 5

### III.5.3) Resposta ao pH

Para este estudo os dados recolhidos foram representados graficamente: potencial do eléctrodo *versus* pH da solução.



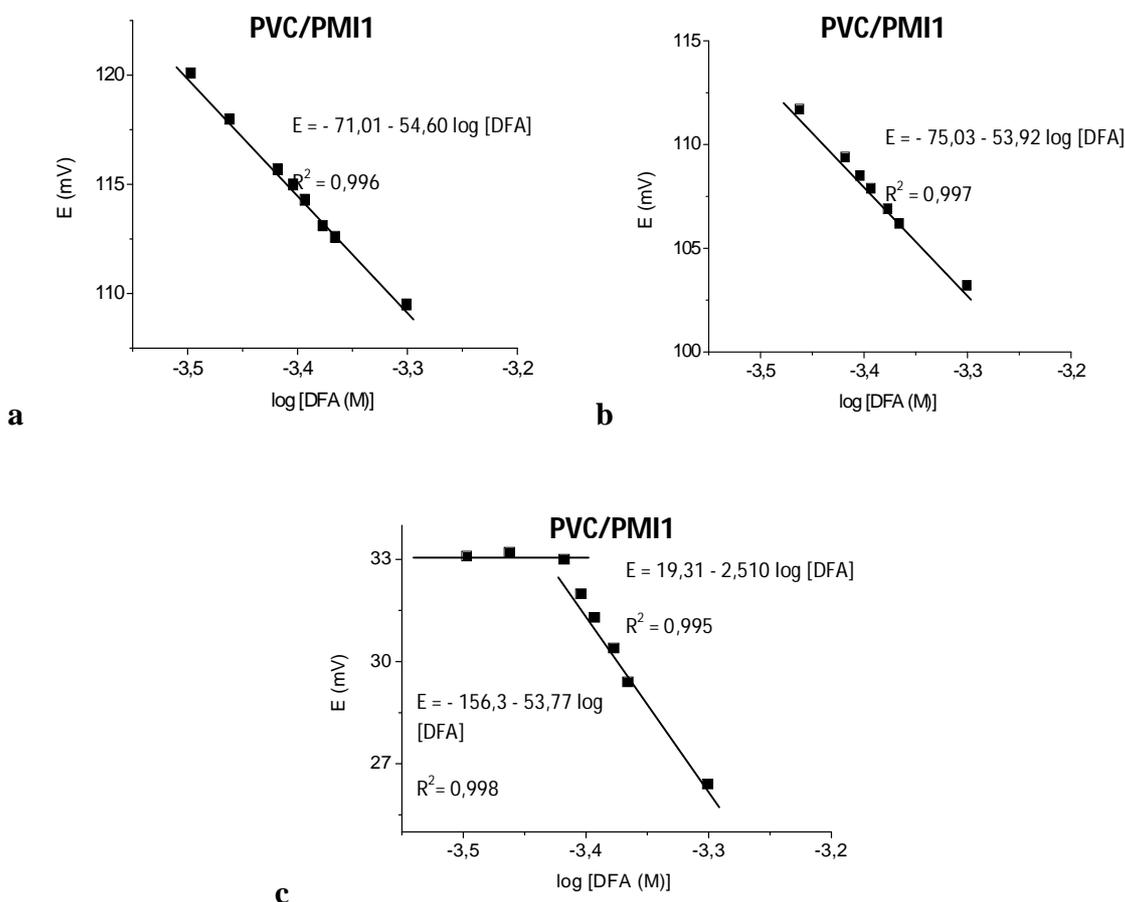
**Fig. 30** – Resposta dos sensores elaborados em função do pH. a) PVC/PMI1 (10% PMI1, sem AI), b)PETF/PMI1 e c)PETF/PMI5.

Observando o diagrama obtido para o sensor PVC/PMI1 (figura 30 a), verifica-se uma maior resposta ao pH quando este é inferior a 3. Para a restante gama medida, a resposta do sensor manteve-se aproximadamente constante, demonstrando assim pouca sensibilidade ao ião  $H^+$ .

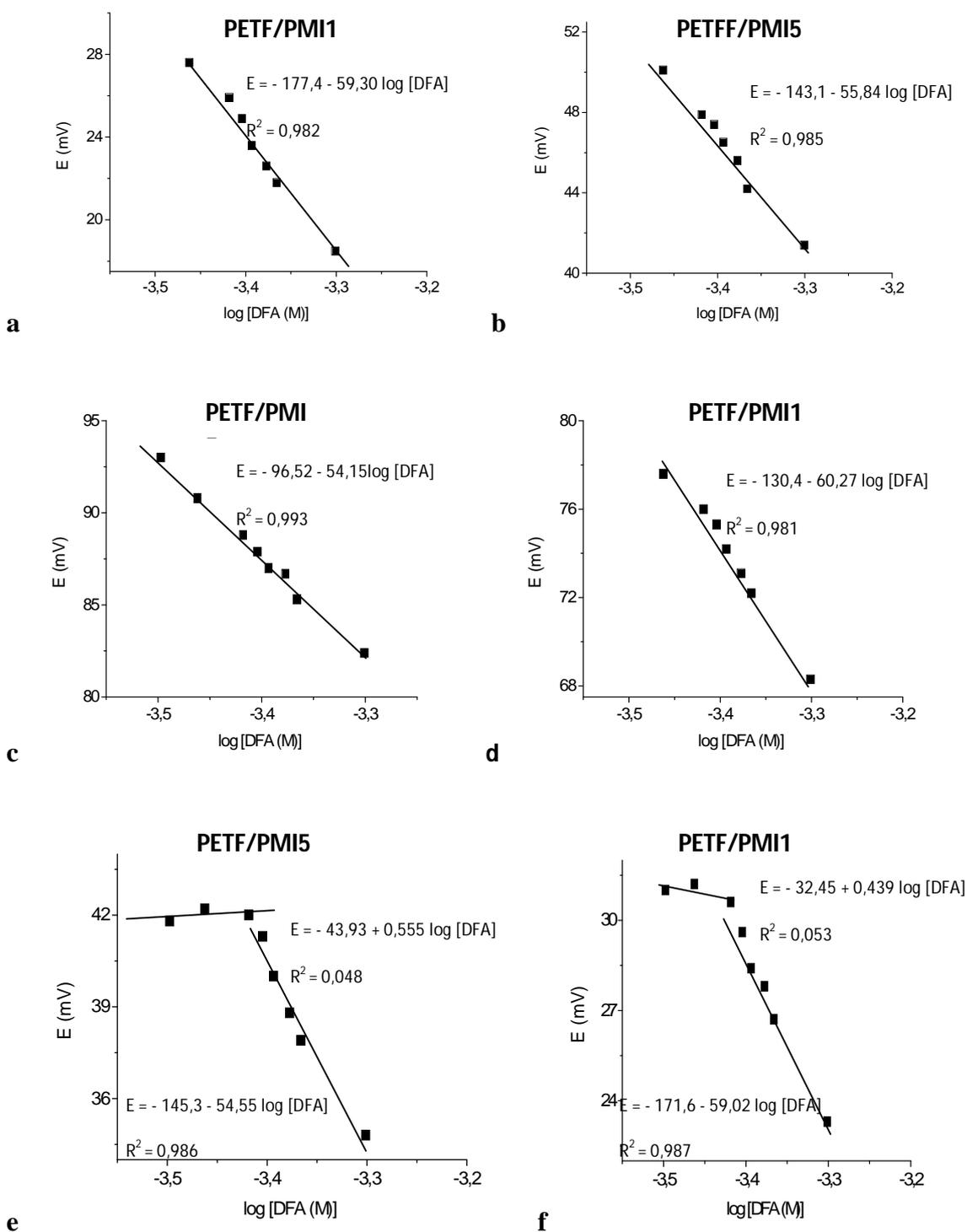
Observando os diagramas obtidos para os sensores baseados em PTEF (figura 29 b e c), verifica-se uma resposta baixa ao  $H^+$  em toda a gama de pH.

### III.5.4) Selectividade do Sensor

A selectividade dos sensores elaborados relativamente ao fenol e compostos fenólicos, anilina e catequina, foi estimada através do método do interferente fixo, referido no capítulo de introdução. Na figura 31 e 32, encontram-se as representações gráficas da resposta dos sensores elaborados, baseados em PVC e PTEF, na presença dos interferentes em estudo.



**Fig 31** - Resposta potenciométrica do sensor com membrana de PVC (10% PMI1, sem AI) na presença do interferente: a) Fenol (0,5 M), b) Catequina ( $5,0 \times 10^{-3}$  M), c) Anilina ( $5,0 \times 10^{-2}$  M). As medições foram efectuadas a pH 4 e temperatura ambiente.



**Fig. 32** - Resposta potenciométrica do sensor com membrana de PTEF na presença do interferente: **a e b**) Fenol (0,5 M), **c e d**) Catequina ( $5,0 \times 10^{-3}$  M), **e e f**) Anilina ( $5,0 \times 10^{-2}$  M). Na parte superior de cada gráfico encontra-se o tipo de membrana do eléctrodo. As medições foram efectuadas a pH 4 e temperatura ambiente.

**Tabela 15** - Logaritmo dos coeficientes de selectividade dos sensores potenciométricos elaborados, relativamente à anilina, catequina e fenol.

<b>ESI</b>	<b>Anilina</b>	<b>Catequina</b>	<b>Fenol</b>
<b>PVC/PMI1</b>	-2,12	< -2	< -3,9
<b>PETF/PMI1</b>	-2,14	< -2	< -3,9
<b>PETF/PMI5</b>	-2,11	< -2	< -3,9

Atendendo aos resultados obtidos, não se verificaram diferenças na selectividade dos PMI em estudo, PMI1 e PMI5. Como se pode ver nos gráficos apresentados, para ambos os sensores elaborados (membrana de PVC e de PTEF) o fenol, bem como a catequina não interferem na resposta do sensor à DFA até à concentração de  $0,5 \text{ molL}^{-1}$  e  $5,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, a anilina quando presente, com a concentração de  $5,0 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ , interferiu na quantificação da DFA. O logaritmo do coeficiente de selectividade ( $\log K^{\text{pot}}_{\text{DFA, A}}$ ) determinado foi de -2,12 (tabela 15) para o sensor com membrana de PVC, -2.11 para o eléctrodo com PETF/PMI5 e -2,14 para o eléctrodo com PETF/PMI1. Como o logaritmo do coeficiente de selectividade é inferior a zero, em todos os casos, o eléctrodo selectivo para a DFA responde mais selectivamente ao ião primário, neste caso a DFA, do que à espécie interferente, anilina [20]. Assim, todos os sensores elaborados demonstraram uma elevada selectividade aos compostos em estudo.

Comparando a selectividade dos PMI quando estão incorporados na membrana dos eléctrodos e quando estão na forma “livre” (estudo de religação), não se verifica qualquer correspondência na magnitude dos coeficientes de selectividade entre o estudo de religação e as medições potenciométricas. Por exemplo, os polímeros que demonstraram maior selectividade para a anilina no estudo de religação, demonstraram a menor selectividade para a anilina comparativamente aos restantes compostos.

Na literatura pode ser encontrado um estudo onde os resultados do estudo de religação não puderam ser usados para prever a selectividade do polímero na técnica cromatográfica [149]. De modo semelhante, também já se verificou que a selectividade potenciométrica dos sensores com membranas que incorporam PMI não pode ser correlacionada com o estudo de religação. De facto, ao contrário do estudo de religação, não se verificaram diferenças na selectividade potenciométrica dos PMI 1 e 5.

#### IV) Conclusão

A elaboração de um sensor potenciométrico baseado em polímeros molecularmente impressos como ionóforos para o reconhecimento e determinação da difenilamina, foi o principal objectivo deste trabalho. Procedeu-se também à optimização das condições de síntese, nomeadamente da razão monómero/molécula molde e tempo de polimerização, dos PMI tendo-se usado a capacidade de ligação e selectividade, determinadas a partir de estudos de religação estáticos, como critério de optimização. Os efeitos em estudo e a sua interacção foram significativos na capacidade de ligação dos PMI sintetizados. A dependência da capacidade de ligação nestes dois factores foi não linear, tendo a capacidade máxima sido atingida para uma razão molécula molde/monómero de 4,3 e tempo de reacção de 17. O modelo de adsorção aplicado, Freundlich, permitiu averiguar quais os polímeros mais homogéneos, sendo estes o PMI3 e PMI5.

O efeito da concentração da molécula molde foi significativa para a selectividade de todos os compostos em estudo, exceptuando a catequina. Já o tempo de polimerização foi significativo para todas as substâncias exceptuando a anilina. Por sua vez, a interacção dos factores concentração da molécula molde e tempo de polimerização, foi significativo para todos os compostos, sem excepção. Verificou-se também, através da EITF, que a variação das condições de síntese não afectou o grau de polimerização e a composição química dos PMI sintetizados.

A técnica de SEM permitiu visualizar as diferenças na morfologia dos PMI sintetizados, tendo-se verificado que as partículas sintetizadas possuem um tamanho micrométrico e forma aproximadamente esférica, sendo as micropartículas impressas maiores que as não impressas. Esta técnica permitiu também observar a aglomeração de nanopartículas para formarem nano/micropartículas de tamanho maior, processo responsável pela formação de macroporos na rede polimérica.

PMI sintetizados com condições e propriedades diferentes (capacidade de ligação e selectividade) foram seleccionados para a preparação de sensores potenciométricos para a determinação de DFA em soluções aquosas. Tendo sido preparados sensores com membranas de PVC e de PTEF. Em ambos os casos, os sensores elaborados, apresentaram

respostas Nernstianas, não se verificou diferenças notórias na selectividade e limite de detecção dos dois tipos de membranas elaboradas e PMI aplicados. Não tendo-se verificado qualquer resposta à DFA por parte dos sensores com partículas não impressas, pelo que grande parte das respostas obtidas para os sensores com partículas impressas dever-se-à aos sítios de ligação selectivos formados aquando da impressão molecular.

Os sensores elaborados demonstraram ser selectivos para a DFA, comparativamente à anilina catequina e ao fenol. Não se verificou qualquer correspondência entre a selectividade dos sensores contendo partículas impressas e a selectividade demonstrada pelos PMI no estudo de re ligação.

Os eléctrodos elaborados, com partículas impressas, demonstraram um tempo de resposta inferior a 5 minutos, com um bom desempenho durante pelo menos 73 dias para o ESI com membrana de PVC e 30 dias para o ESI modificado com PETF.

## V) Referências bibliográficas

- [1] Drzyzga O., *Diphenylamine and derivatives in the environment: a review*, Chemosphere, 2003, 53, 809-818
- [2] Reyes J., Barrales P., Díaz A., *Rapid Determination of Diphenylamine Residues in Apples and Pears with a Single Multicommutated Fluorometric Optosensor*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 2005, 53, 9874-9878
- [3] Kim-Kang H., Robinson R., Wu J., *Fate of 14C Diphenylamine in Stored Apples*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 1998, 46, 707-717
- [4] Bramlage W., *Factors Influencing DFA residues o Apples*, Post Harvest Pomology Newsletter, 2002, 2, 18-19
- [5] Environmental Protection Agency, *Diphenylamine*, Prevention- Pesticides and Toxic Substances, 1998
- [6] Goodwin W., *The Biochemistry of Carotenoids*, Chapman and Hall, 1980
- [7] Silva I., *Análise de Pesticidas na Polpa e Casca de Frutas para Sumo*, Universidade de Aveiro- Departamento de Química, 2009
- [8] Hulanicki A., Geab S., Ingman F., *Chemical Sensors Definitions And Classifications*, International Union of Pure and Applied Chemistry, 1991, 63, 1247-1250
- [9] Piletsky S., Anthony P., Turner F., *Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers*, Electroanalysis, 2002, 14, 317-323
- [10] Torres K., Marzal P., Kubota L., *Recientes Avanços e Novas Perspectivas dos Eléctrodos Íão- Seletivos*, Química Nova, 2006, 29, 1094-1100
- [11] Bakker E., Buhlmann P., Pretsch E., *Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes*, Chemical Reviews, 1997, 97, 3083-3132
- [12] Morf W., Rooijja N., Pretsch E., *Influence of cationic and anionic additives on the electrical properties of ionophore-based ion-selective membranes*, Journal of Electroanalytical Chemistry , 2005, 581, 265-274
- [13] Pérez M., Marín L., Quintana J., Yazdani-Pedram M., *Influence of different plasticizers on the response of chemical sensors based on polymeric membranes*, Sensors and Actuators B, 2003, 89, 262-268
- [14] Telting-Diaz M., Bakker E., *Effect of Lipophilic Ion-Exchanger Leaching on the Detection Limit of Carrier-Based Ion-Selective Electrodes*, Analytical Chemistry, 2001, 22, 5582-5589
- [15] Merkoçia A., Alegret S., *New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers*, Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21, 717-725

- [16] Bobacka J., Ivaska A., Lewenstam A., *Potentiometric Ion Sensors*, Chemical Reviews, 2008, 108, 329-351
- [17] Rundle C., *A Beginners Guide to Ion-Selective Electrode Measurements*, Nico2000 Ltd, 2005, 10-25
- [18] Janata J., *Principles of Chemical Sensors*, Springer, 200, 1-257
- [19] Lindner E., Umezawsa Y., *Performance Evaluation Criteria for Preparation and Measurement of Macro and Microfabricated Ion-Selective Electrodes*, Pure and Applied Chemistry, 2008, 80, 85-104
- [20] Lindner E., Toth K., Pungor K., *Definition and Determination of Response Time of Ion Selective Electrodes*, Pure and Applied Chemistry, 1986, 469-479
- [21] Bobacka J., *Conducting Polymer-Based Solid-State Ion-Selective Electrodes*, Electroanalysis, 2006, 18, 7-18
- [22] Nalwa H., *Electronic and Photonic Materials and Devices*, Academic Press, 2001, 17-18
- [23] Komiyama M., Takeuchi T., Mukawa T., *Molecular imprinting: from Synthesis to Applications*, 2003, Wiley-VCH, 765-770
- [24] Andersson L., *Molecular imprinting for drug bioanalysis A review on the application of imprinted polymers to solid-phase Extraction and binding assay*, Journal of Chromatography, 2000, 739, 163-173
- [25] Alexander C., Andersson H., Andersson L., Ansell R., Kirsch N., Nicholls I., O'Mahony J., Whitcombe M., *Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003*, Journal of Molecular Recognition, 2006 ,19, 80-106.
- [26] Ye L ., Mosbach K., *The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, And Future Aspects*, Chemistry and Materials Science, 2001,41, 107-113
- [27] Ye L., Mosbach K., *Molecular Imprinting: Synthetic Materials As Substitutes Biological Antibodies and Receptors*, Chemical Materials, 2008, 20, 859-869
- [28] Huiqi Z., Lei Y., Mosbach K., *Non-covalent molecular imprinting with emphasis On its application in separation and drug development*, Journal of Molecular Recognition, 2006, 19, 248-259
- [29] Peter A., Cormack G., Elorza A., *Molecularly imprinted polymers: Synthesis and Characterisation*, Journal of Chromatography, 2004, 804, 173-182
- [30] Spivak D., *Optimization, evaluation, and characterization of molecularly Imprinted polymers*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57, 1779-1794
- [31] Shea K., Sasaki D., *On the control of micro environment shape of functionalized network polymers prepared by model polymerization*, Journal of Chemistry Society, 1989, 111, 3442–3444

- [32] Ellwanger A., Berggren C., Bayouhd S., Crecenzi C., Karlsson L., Owens P., Ensing K., Cormack P., Sherrington D., Sellergren B., *Evaluation of methods aimed at complete removal of model from molecularly imprinted polymers*, *Analyst*, 2001, 10, 784–792
- [33] Theodoridis G., Kantifes A., Manesiotis P., Raikos N., Tsoukali-Papadopoulou H., *Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy model molecule*, *Journal of Chromatography*, 2003, 673, 103–109
- [34] Andersson H., Karlsson J., Piletsky S., Schmidt A., *Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II [1] Influence of monomer–template ratio and sample load on retention and selectivity*, *Journal of Chromatography A*, 848, 1999, 39–49
- [35] Yoshimatsu K., Yamazaki T., Chronakis I., Ye L., *Influence of Template /Functional Monomer/Cross-Linking Monomer Ratio on Particle Size and Binding Properties of Molecularly Imprinted Nanoparticles*, *Journal of Applied Polymer Science*, 2011, 10, 35–47
- [36] Andersson S., Nicholls A., *Spectroscopic Evaluation of Molecular Imprinting Polymerization Systems*, *Bioorganic Chemistry*, 1997, 25, 203
- [37] Karima K., Breton F., Rouillon R., Piletska E., Guerreiro A., Chianella I., S. Piletskya, *How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers?*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57, 1795–1808
- [38] Zhu Q., Haupt K., Knopp D., Niessner R., *Molecularly imprinted polymer for metsulfuron-methyl and its binding characteristics for sulfonylurea herbicides*, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468, 217–227
- [39] Tamayo F., Casillas J., Martin-Esteban A., *Evaluation of new selective molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerisation for the extraction of phenylurea herbicides*, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1069, 173–181
- [40] Hantash J., Bartlett A., Oldfield P., Dénès G., O'Rielly R., David F., *Application of an in-line imprinted polymer column in a potentiometric flow-injection chemical sensor to the determination of the carbamate pesticide carbaryl in complex biological matrices*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 351–357
- [41] Mallik S., Johnson R., Arnold F., *Synthetic Bis-Metal Ion Receptors for Bis-Imidazole "Protein Analogs"*, *Journal of the American Chemical Society*, 1994, 116, 8902–8911
- [42] Hart B., Shea K., *Synthetic Peptide Receptors: Molecularly Imprinted Polymers for the Recognition of Peptides Using Peptide–Metal Interactions*, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123, 2072–2083
- [43] Lv Y., Lin Z., Feng W., Zhou X., Tan T., *Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers*, *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 36, 221–229
- [44] Kempe M., *Antibody-mimicking polymers as chiral Stationary phases in HPLC*, *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 1948–1953.

- [45] Dong X., Sun H., Lu X., Wang H., Liu X., Wang N., *Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers—influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance*, *Analyst*, 2002, 127, 1427-1432
- [46] Ye L., WESIs R., Mosbach K., *Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres*, *Macromolecules*, 2000, 33, 8239–8245
- [47] O'Shannessy D., Ekberg B., Mosbach K., *Molecular imprinting of amino-acid derivatives at low-temperature (0°C) Using photolytic homolysis of azobisnitriles*, *Analytical Biochemistry*, 1989, 177, 144-149
- [48] Spivak D., Gilmore M., Shea K., *Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers*, *Journal of American Chemical Society*, 1997, 119, 4388–4393
- [49] Kempe M., Mosbach K., *Binding studies on substrate- and enantio-selective molecularly imprinted polymers*, *Analytical Letters*, 1991, 24, 1137-1145
- [50] Yoshizako K., Hosoya K., Iwakoshi Y., Kimata K., Tanaka N., *Porogen Imprinting Effects*, *Analytical Chemistry*, 1998, 70, 386- 389
- [51] Sellergren B., Shea K., *Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers*, *Journal Chromatography*, 1993, 635, 31–49
- [52] Ramstro O., Ansell R., *Molecular Imprinting Technology: Challenges and Prospects for the Future*, *Chirality*, 1998, 10, 195–209
- [53] Donga W., Yana M., Liua Z., Wub G., Li Y., *Effects of solvents on the adsorption selectivity of molecularly imprinted polymers: Molecular simulation and experimental validation*, *Separation and Purification Technology*, 2007, 53, 183-185
- [54] Yan H., Ho H., *Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer*, *International Journal of Molecular Science*, 2006, 7, 157-178
- [55] Cooper A., Holmes A., *Synthesis of Molded Monolithic Porous Polymers Using Supercritical Carbon Dioxide as the Porogenic Solvent*, *Advanced Materials*, 1999, 11, 1270–1274
- [56] Sellergen B., Dauwe C., Schneider T., *Pressure-Induced Binding Sites in Molecularly Imprinted Network Polymers*, *Macromolecules*, 1997, 30, 2454-2459
- [57] Piletska E., Guerreiro A., Whitcombe M, Piletsky S., *Influence of the Polymerization Conditions on the Performance of Molecularly Imprinted Polymers*, *Macromolecules*, 2009, 42, 4921-4928
- [58] Painter P., *Fundamentals of Polymeric Science: An Introductory Text*, Technomic Public Company, 1997, 10-22
- [59] Blanco-López C., Fernández S., Castañón M., Ordieres A., Blanco P., *Electrochemical sensing with electrodes modified with molecularly imprinted polymer films*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378, 1922-1928

- [60] Yoshida M., Hatate Y., Uezu K., Goto M., Furusaki S., *Chiral-recognition polymer prepared by surface molecular imprinting technique*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2000, 169, 259-269
- [61] Gao B., Liu S., Li Y., Preparation and recognition performance of uric acid-imprinted material, Journal of Chromatography A, 2010, 1217, 2226-2236
- [62] Pardieu E., Cheap H., Vedrinea C., Lazergesa M., Lattacha Y., Garniera F., Remita S., Pernelle S., *Molecularly imprinted conducting polymer based electrochemical sensor for detection of atrazine*, Analytica Chimica Acta, 2009, 649, 236-245
- [63] Kajiro T., Fukushima T., Santa T., Imai K., *Development of water-soluble fluorogenic reagents having a 2,1,3-benzoxadiazole structure and their application to the determination of peptides*, Analyst, 2000, 125, 1515-1517
- [64] Gore M., Karmalkar R., Kulkarni M., *Enhanced Capacities and Selectivities for Cholesterol in Aqueous media by Molecular Imprinting: Role of Novel Cross-Linkers*, Journal of Chromatography B, 2004, 804, 211-221
- [65] Karlsson J., Karlsson B., Anderson L., Nicholls A., *The roles of template complexation and ligand binding conditions on recognition in bupivacaine molecularly imprinted polymers*, Analyst, 2004, 129, 456-462
- [66] Andaç M., Say R., Denizli A., *Molecular Recognition Based Cadmium Removal From Human Plasma*, Journal of Chromatography B, 2004, 811, 119-126
- [67] Stuart B., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*, Analytical Chemistry by Open Learning, 1997, 22, 35-55
- [68] Umpleby II R., Baxter S., Rampey A., Rushton G., Chen Y., Shimizu K., *Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers*, Journal of Chromatography B, 2004, 804, 141-149
- [69] García-Calzón J., Díaz-García M., *Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers*, Sensors and Actuators B, 2007, 123, 1180-1194
- [70] Rampey A., Umpleby R., Rushton G., Iseman J., Shah R., Shimizu K., *Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis*, Analytical Chemistry, 2004, 76, 1123-1133
- [71] Umpleby R., Baxter S., Chen Y., Shah R., Shimizu, *Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm*, Analytical Chemistry, 2001, 73, 4584-4591
- [72] Ansell R., *Molecularly imprinted polymers for the Enantioseparation of chiral drugs*, Advanced drug delivery, 2005, 57, 1809-1835

- [73] Yina J., Yanga G., Chen Y., *Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its l-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers*, Journal of chromatography, 2005, 1090, 68-75
- [74] Nakagama J., Uchiyama K., Hobo T., *Molecularly Imprinted Polymer as Chiral Selector for Enantioseparation of Amino Acids by Capillary Gel Electrophoresis*, Chemistry and Materials Science, 1996, 43, 585-591
- [75] Wulff G., *Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers*, Chemical Reviews, 2002, 102, 1-28.
- [76] Ramström O., Mosbach K., *Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials*, Chemical Biology, 1999, 3, 759-764
- [77] Andersson L., *Molecular imprinting: developments and applications in the Analytical chemistry field*, Journal of Chromatography, 2000, 745, 3-13
- [78] Maier N., Lindner W., *Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: a critical review*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389, 377-397
- [79] Lorenzo C., Concheiro A., *Molecularly imprinted polymers for drug delivery*, Journal of Chromatography, 2004, 804, 231-245
- [80] Liu Z., Zheng C., Yan C., *Molecularly imprinted polymers as a tool for Separation in CEC*, Electrophoresis, 2007, 28, 127-136
- [81] Lahav M., Kharitonov A., Katz O., Kunitake T., Willner I., *Tailored Chemosensors for Chloroaromatic Acids Using Molecular Imprinted TiO<sub>2</sub> Thin Films on Ion-Sensitive Field-Effect Transistors*, Analytical Chemistry, 2001, 73, 720-723
- [82] Turiel E., Martin-Esteban A., *Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis*, Chemistry and Materials Science, 2003, 378, 1876-1886
- [83] Turkewitsch P., Wandelt B., Darling G., Powell W., *Fluorescent Functional Recognition Sites through Molecular Imprinting. A Polymer-Based Fluorescent Chemosensor for Aqueous cAMP*, Analytical Chemistry, 1998, 70, 2025-2030
- [84] Fang Y., Yan S., Ning B., Liu N., Gao Z., Chao F., *Flow injection chemiluminescence sensor using molecularly imprinted polymers As recognition element for determination of maleic hydrazide*, Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24, 2323-2327
- [85] Jenkins A., Uy O., Murray G., *Polymer-Based Lanthanide Luminescent Sensor for Detection of the Hydrolysis Product of the Nerve Agent Soman in Water*, Analytical Chemistry, 1999, 71, 373-378
- [86] Lotierzoa M., Henrya O., Piletskya S., Tothilla I., Cullena D., Kaniab M., Hockb N., Turner A., *Surface Plasmon resonance sensor for domoic acid Based on grafted imprinted polymer*, Biosensors and Bioelectronics, 2004, 20, 145-152

- [87] Yang Z., Zhang C., *Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in Solution*, Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 142, 210-215
- [88] Liang C., Peng H., Nie L., Yao S., *Bulk acoustic wave sensor for herbicide assay based on molecularly imprinted polymer*, Journal of Analytical Chemistry, 2000, 367, 551-555
- [89] Zayats M., Lahav M., Andrei B., Willner I., *Imprinting of specific molecular recognition sites in inorganic and organic thin layer membranes associated with ion-sensitive field-effect transistors*, Tetrahedron, 2002, 58, 815-824
- [90] Javanbakhta M., Fardb S., Mohammadic A., Abdoussa M., Ganjalie M., Norouzie P., Safaralie L., *Molecularly imprinted polymer based potentiometric sensor for the determination of hydroxyzine In tablets and biological fluids*, Analytica Chimica Acta, 2008, 612, 65-74
- [91] Blanco-López M., Lobo-Castañón M., Miranda-Ordieres A., Tuñón-Blanco P., *Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers*, Trends in Analytical Chemistry, 2004, 23
- [92] Xie C., Gao S., Guo Q., Xu K., *Electrochemical sensor for 2,4-dichlorophenoxy acetic acid using molecularly imprinted polypyrrole membrane as recognition element*, Microchemical Acta, 2010, 169, 145-152
- [93] Zhou Y., Yu B., Shiu E., Levon K., *Potentiometric sensing of chemical warfare agents surface imprinted polymer integrated with an indium tin oxide electrode*, Analytical Chemistry, 2004, 76
- [94] Zhou Y., Yu B., Levon K., *Potentiometric sensor for dipicolinic acid*, Biosensors and Bioelectronics, 2005, 20
- [95] Zhou Y., Yu B., Levon K., *Potentiometric sensing of chiral amino acids*, Chemical Materials, 2003, 15, 2774-2779
- [96] Prasad K., Prathish K., Gladis J., Naidu G., Rao T., *Design and Development of Imprinted Polymer Inclusion Membrane-Based Field Monitoring Device for Trace Determination of Phorate (O,O-Diethyl S-Ethyl Thiomethyl Phosphorodithioate) in Natural Waters*, 2007, 19, 1195-1200
- [97] Roy A., Nisha S., Dhand C., Malhotra B., *Molecularly imprinted polyaniline film for ascorbic acid detection*, Journal of Molecular Recognition, 2011, 24, 700-706
- [98] Wang Y., Zhou Y., Sokolov J., Rigas B., Levon K., *Rafailovich MA potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method*, Biosensors and Bioelectronics, 2008, 24, pp 162-166
- [99] Rebelo T., Almeida S., Guerreiro J., Montenegro M., Sales M., *Trimethoprim-selective electrodes with molecularly imprinted polymers acting as ionophores and potentiometric transduction on graphite solid-contact*, Microchemical Journal, 2011, 98, 21-28

- [100] Prasad K., Prathish K., Gladis J., Niadu G., Rao T., *Molecularly imprinted polymer (biomimetic) based potentiometric sensor for atrazine*, Sensors and Actuators B: Chemistry, 2007, 123
- [101] Zhou Y., Yu B., Levon K., *Potentiometric Sensing of Chiral Amino Acids*, Chemistry of Materials, 2003, 15
- [102] Sadeghi S., Fathia F., Abbasifar J., *Potentiometric sensing of levamisole hydrochloride based on molecularly imprinted polymer*, Sensors and Actuators B: Chemical, 2007, 122
- [103] Alizadeh T., Akhoundian M., *A novel potentiometric sensor for promethazine based on a molecularly imprinted polymer (MIP): The role of MIP structure on the sensor performance*, Electrochimica Acta, 2010, 55
- [104] Langea U., Roznyatovskaya1 N., MirskyConducting V., *Polymers in chemical sensors and arrays*, Analytica Chimica Acta, 2008, 614, 1-26
- [105] Kriz D., Mosbach K., *Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer*, Analytical Chimica Acta, 1995, 300, 71
- [106] Guan G., Liu B., Wang Z., Zhang Z., *Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Applications in Chemosensors*, Sensors, 2008, 8, 8291-8320
- [107] Yilmaz E., Haupt K., Mosbach K., *The use of immobilized templates-A new approach in molecular imprinting*, Angew. Chem. Int. Ed., 2000, 39, 2115-2118
- [108] Sellergren B., Rückert B., Hall A., *Layer-by-layer grafting of molecularly imprinted polymers via iniferter modified supports*, Advanced Materials, 2002, 14, 1204-1208
- [109] Delaney L., Zimin D., Rahm M., Weiss D., Wolfbeis S., Mirsky M., *Capacitive Detection in Ultrathin Chemosensors Prepared by Molecularly Imprinted Grafting Photopolymerization*, Analytical Chemistry, 2007, 79, 3220-3225
- [110] Malitesta C., Losito I., Zambonin P., *Molecularly Imprinted Electrosynthesized Polymers: New Materials for Biomimetic Sensors*, Analytical Chemistry, 1999, 71, 13661388
- [111] Panasyuk-Delaneya T., Mirsky V., Ulbrichtb M., Wolfbeis O., *Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers*, Analytica Chimica Acta, 2001, 435, 157-162
- [112] Zimmerman S., Wendland M., Rakow N., Zharov I., Suslick K., *Synthetic hosts by monomolecular imprinting inside dendrimers*, Nature, 2002, 418, 399-403.
- [113] Coates J., *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2000, 10815-10837
- [114] Brandon D., Kaplan W., *Microstructural Characterization of Materials*, Wiley, 2008, 264
- [115] Yoshimatsu K, Reimhult K, Krozer A, Mosbach K, Sode K, Ye L., *Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control*

*of particle size suitable for different analytical applications*, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 584, 112–121

[116] D'Agostino G., Alberti G., Biesuz R., Pesavento M., *Potentiometric sensor for atrazine based on a molecular imprinted membrane*, *Biosensors and Electronics*, 2006, 22, 145-152

[117] Blanco-López M., Lobo-Castañón M., Miranda-Ordieres A., Tuñón-Blanco P., *Voltammetric sensor for vanillyl mandelic acid based on molecularly Imprinted polymer-modified electrodes*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18, 353-362

[118] Abdel-Rahim A., El-Beltagi H., *Constituents of Apple, Parsley and Lentil Edible Plants and Their Therapy Treatments for Blood Pictures as Well as Liver and Kidneys Functions Against Lipidemic Disease*, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 9, 1117-1127

[119] Carey F., *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, 2000

[120] Perrin D., Dempsey B., Serjeant E., *pK<sub>a</sub> Prediction for Organic Acids and Bases*, Chapman & Hall, 1981

[121] Piletska E., Guerreiro A., Romero-Guerra M., Chianella I., Turner A., Piletsky S., *Design of molecular imprinted polymers compatible with aqueous environment*, *Analytica Chimica Acta*, 2008, 607, 54–60

