

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR COM PROTOPORFIRINA IX DE FERRO PARA A
DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENOL**

José de Ribamar Martins Neto

SÃO LUÍS

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR COM PROTOPORFIRINA IX DE FERRO PARA A
DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENOL**

José de Ribamar Martins Neto

Orientador: Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Analítica.

**SÃO LUÍS
2010**

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR COM PROTOPORFIRINA IX DE FERRO PARA A
DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENOL**

José de Ribamar Martins Neto

Aprovada em:15/01/2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka (Orientador)
DEQUI - CCET - UFMA

Prof. Dra. Izauro Cirino Nogueira Diógenes
Universidade Federal do Ceará – UFC
Departamento de química orgânica e Inorgânica

Prof. Dr. Antonio Carlos da Silva Ramos
DETQUI - CCET - UFMA

Dedico aos meus queridos pais, Alexandrina e Martins, pelo apoio durante toda minha vida e confiança no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Nosso Deus pelo dom da vida.

Aos meus queridos pais, Alexandrina e Martins, pelo apoio durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Anderson e Andréa pela amizade e cumplicidade.

À Marcelle por partilhar comigo as tristezas, alegrias, dificuldades e vitórias dessa vida.

Ao Prof. Dr. Auro A. Tanaka, pela grande amizade, orientação e participação em minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Lauro Kubota pelo interesse e contribuição na realização deste trabalho, bem como por todo o apoio durante o estágio realizado no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS) do IQ-UNICAMP.

Aos amigos do LEEDS pelas ajudas e contribuições na realização deste trabalho e aos companheiros de prédio, que tornaram minha estadia em Campinas (SP) menos solitária.

Aos companheiros do Laboratório de Eletroquímica (LELQ) da UFMA.

Ao Prof. Jaldyr e ao amigo Junivaldo pelas figuras.

Aos grandes companheiros Maykon e Alielson.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e ao CNPq pelos auxílios outorgados ao LELQ.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	lx
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Polímeros de Impressão Molecular	6
1.2 Métodos de Preparação dos Polímeros	14
1.3 Aplicações de MIP em Química Analítica	17
1.4 Aplicação de MIP em Sensores	18
1.5 Objetivos	23
2. PARTE EXPERIMENTAL	25
2.1 Instrumentação	25
2.2 Reagentes e Soluções	26
2.3 Síntese do MIP	27
2.4 Preparo do Sensor	28
2.5 Metodologia de Trabalho	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Estudos Iniciais	31
3.2 Estudo do Potencial Aplicado	34
3.3 Estudo da Concentração do Peróxido de Hidrogênio	35
3.4 Estudo da Natureza da Solução Tampão	37
3.5 Estudo da Influência da Concentração Hidrogeniônica	37
3.6 Estudo da Concentração da Solução Tampão	40
3.7 Caracterização do sistema MIP/Protoporfirina IX	42
3.8 Características Analíticas do Sensor	47
3.9 Estudos de Seletividade	49
3.10 Aplicação do Sensor Proposto em Amostras Reais	51
4. CONCLUSÃO	53
Referências Bibliográficas	54

RESUMO

O presente trabalho apresenta um estudo analítico da determinação de 4-aminofenol com um sistema a base de um polímero de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) e protoporfirina IX de ferro como sensor biomimético da enzima peroxidase. A síntese do MIP foi realizada pelo método de precipitação e as determinações analíticas realizadas amperometricamente com um eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema biomimético. As melhores condições analíticas estabelecidas para a determinação de 4-aminofenol foram: potencial aplicado de - 0,1V vs Ag/AgCl, tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 e concentração de peróxido de 100 µmol L⁻¹. Sob tais condições, uma boa resposta linear do sensor foi observada numa faixa de concentração de 10 a 90 µmol L⁻¹ ($r > 0,9978$), com limites de detecção e de quantificação de 3 e de 10 µmol L⁻¹, respectivamente. Experimentos realizados com amostras de águas de torneira e de rio fortificadas com 4-aminofenol, resultaram em valores de recuperação entre 93 a 112 %, indicando a viabilidade da aplicação do sistema MIP/protoporfirina IX de ferro como sensor amperométrico para a detecção de 4-aminofenol em amostras reais.

Palavres-chave: sensor biomimético, 4-aminofenol, polímero de impressão molecular, protoporfirina de ferro.

ABSTRACT

This work presents an analytical study on determination of 4-aminophenol (4-APh) with a system based on molecularly imprinted polymer (MIP) and iron protoporphyrin IX as biomimetic sensor of the peroxidase enzyme. The MIP synthesis was performed by the precipitation method and the analytical determinations by amperometric measurements with a glassy carbon electrode modified with the biomimetic system. The best analytical conditions established for 4-APh determination were: applied potential of -0.1 V vs. Ag/AgCl, 0.05 mol L⁻¹ Tris buffer solution, pH 7 and hydrogen peroxide concentration of 100 μmol L⁻¹. Under such optimized conditions, a good linear sensor response was observed in a concentration range from 10 to 90 μmol L⁻¹ ($r > 0.998$), with detection and quantification limits of 3 and 10 μmol L⁻¹, respectively. Experiments performed with tap and river water samples spiked with 4-APh resulted in 93 to 112 % recovery values, suggesting the viability of using the MIP/iron protoporphyrin IX system as biomimetic sensor for determinations of 4-APh in real samples.

Keywords: biomimetic sensor, 4-aminophenol, molecularly imprinted polymer, iron protoporphyrin IX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de síntese e atuação do MIP	8
Figura 2: Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usualmente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.	13
Figura 3: Estrutura química dos iniciadores radicalares mais empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.	14
Figura 4: Estrutura da Fe(III)protoporfirina (IX) (hemina, Fe(III)PPIX)	22
Figura 5: Esquema de Preparação dos Eletrodos a base de polímero de impressão molecular.	29
Figura 6: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo modificados com MIP/protoporfirina IX: na ausência de H ₂ O ₂ (a) na presença de 50 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ (b) na presença de 10 μmol L ⁻¹ (c) e 20 μmol L ⁻¹ de 4-APh. Tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0).	32
Figura 7: a) Respostas amperométricas do eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema MIP/protoporfirina IX, sob um potencial aplicado de -0,1 V vs Ag/AgCl, após adições de alíquotas de 4-APh numa solução tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo H ₂ O ₂ 50 μmol L ⁻¹ , b) Dependência da resposta amperométrica com a concentração de 4-APh na solução..	33
Figura 8: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com o potencial aplicado para a determinação de 4-APh numa solução tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 50 μmol L ⁻¹ .	34
Figura 9: (a) Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX na ausência (a) e presença (b) de 50 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ . Potencial aplicado -0,1 V vs Ag/AgCl em tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (b) Dependência com a concentração de H ₂ O ₂ para a determinação de 4-APh numa solução tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L ⁻¹ . Potencial aplicado: -0,1V vs Ag/AgCl..	36
Figura 10: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com a natureza do tampão para a determinação de 4-APh numa solução tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 50 μmol L ⁻¹ .	38

- Figura 11:** Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com o pH para a determinação de 4-APh numa solução tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 4-APh $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: $-0,1\text{V vs Ag/AgCl}$. 39
- Figura 12:** Efeito da concentração molar do tampão TRIS nas concentrações de $(0,025)$; $(0,05)$; $(0,1)$; $(0,15)$; $(0,20) \text{ mol L}^{-1}$. Medidas conduzidas a potencial de $-0,1\text{V vs Ag/AgCl}$, com adições de alíquotas 4-aminofenol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em soluções pH 7,0 contendo $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .e o tampão nas concentrações indicadas.. 39
- Figura 13:** Cronoamperogramas para a determinação de 4-aminofenol em (a) CV; (b) CV-Nafion; (c) CV-NIP (hemina) e (d) CV-MIP (hemina). As medidas foram conduzidas em solução tampão Tris de concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, concentração de peróxido de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $-0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e adição de alíquotas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1} . 41
- Figura 14:** Diagrama esquemático do mecanismo proposto para a determinação 4-APh sobre o eletrodo CV modificado com MIP-protoporfirina de ferro. $4\text{-APh}_{\text{red}}$ e $4\text{-APh}_{\text{oxi}}$ são as formas reduzida e oxidada, respectivamente do 4-aminofenol; $\text{MIP}_{\text{Fe}^{+3}}$ e $\text{MIP}_{\text{Fe}^{+4}}$ são as formas reduzidas e oxidadas, respectivamente da hemina.. 43
- Figura 15:** Microscopia Eletrônicas de Varredura de partículas do MIP (a) e NIP (b). 46
- Figura 16** Cronoamperogramas para a determinação de 4-aminofenol. Medidas conduzidas em tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, (pH 7,0) concentração de peróxido de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $-0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e adição de alíquotas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1} . 47
- Figura 17:** Estruturas dos compostos fenólicos com estrutura química similar à do 4-Aminofenol: (a) 4-Aminofenol, (b) 2-aminofenol, (c) catecol, (d) 2-cresol, (e) guaiacol, (f) cloroguaiacol, utilizados no experimento de seletividade. 49
- Figura 18:** Comportamento do 4-aminofenol no sensor CV-MIP-hemina: Adições de (a,c) 20 mmol L^{-1} 4-APh, (b) 20 mmol L^{-1} 2-APh (2-aminofenol), 20 mol L^{-1} CA (catecol), 20 mmol L^{-1} GUA (guaiacol), 20 mmol L^{-1} 2-cre (cresol) and 20 mmol L^{-1} Clog (cloroguaiacol). Potencial aplicado de $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$, em tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; (pH 7,0); $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de monômeros funcionais empregados em impressão molecular.	11
Tabela 2: Resultados dos parâmetros obtidos para o processo de otimização dos parâmetros para o sensor proposto.	40
Tabela 3: Características de eletrodos modificados para a determinação de compostos fenólicos	50
Tabela 4: Resultados do teste de recuperação de 4-APh obtidos para as amostras analisadas	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AIBN: 2'2 azo-bis-iso-butironitrila

4-APh: Aminofenol

CE: Eletroforese Capilar, do inglês *capillary electrophoresis*

CEC: Eletrocromatografia Capilar, do inglês *Capillary Electrochromatography*

CV: Eletrodo de Carbono Vítreo

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

DPV: voltametria de onda quadrada

EGDMA: Etileno glicol-dimetacrilato

EC: Comissão Européia

EPA: Agência de Proteção Ambiental Norte Americana

EEC: Comunidade Econômica Européia

FET: Transistores de Efeito de Campo, do inglês *field effect transistors*

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LD: Limites de detecção

LQ: Limite de Quantificação

MAA: Ácido metacrílico

MIP: Polímero de Impressão molecular, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*

NIP: Polímero Não Impresso, do inglês *Non Imprinted Polymer*

TRIM: Trimetilpropano trimetacrilato

TLC: Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*

RLC: Reagente de ligação cruzada

SEM: Microscopia de Varredura Eletrônica, do inglês *Scanning Electron Microscopy*

SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Extraction*

SPME: Micro-extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

SAW: Osciladores de Onda Acústica de Superfície, do inglês *Surface-Acoustic Wave Oscillator*

QCM: Microbalanças de Quartzo, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*

UV-vis: Espectroscopia do Ultravioleta Visível

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR COM PROTOPORFIRINA IX DE FERRO PARA A
DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENOL**

José de Ribamar Martins Neto

**SÃO LUÍS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR COM PROTOPORFIRINA IX DE FERRO PARA A
DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENOL**

José de Ribamar Martins Neto

Orientador: Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Analítica.

**SÃO LUÍS
2010**

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE UM POLÍMERO DE IMPRESSÃO
MOLECULAR COM PROTOPORFIRINA IX DE FERRO PARA A
DETERMINAÇÃO DE 4-AMINOFENOL**

José de Ribamar Martins Neto

Aprovada em:15/01/2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka (Orientador)
DEQUI - CCET - UFMA

Prof. Dra. Izauro Cirino Nogueira Diógenes
Universidade Federal do Ceará – UFC
Departamento de química orgânica e Inorgânica

Prof. Dr. Antonio Carlos da Silva Ramos
DETQUI - CCET - UFMA

Dedico aos meus queridos pais, Alexandrina e Martins, pelo apoio durante toda minha vida e confiança no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Nosso Deus pelo dom da vida.

Aos meus queridos pais, Alexandrina e Martins, pelo apoio durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Anderson e Andréa pela amizade e cumplicidade.

À Marcelle por partilhar comigo as tristezas, alegrias, dificuldades e vitórias dessa vida.

Ao Prof. Dr. Auro A. Tanaka, pela grande amizade, orientação e participação em minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Lauro Kubota pelo interesse e contribuição na realização deste trabalho, bem como por todo o apoio durante o estágio realizado no Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS) do IQ-UNICAMP.

Aos amigos do LEEDS pelas ajudas e contribuições na realização deste trabalho e aos companheiros de prédio, que tornaram minha estadia em Campinas (SP) menos solitária.

Aos companheiros do Laboratório de Eletroquímica (LELQ) da UFMA.

Ao Prof. Jaldyr e ao amigo Junivaldo pelas figuras.

Aos grandes companheiros Maykon e Alielson.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e ao CNPq pelos auxílios outorgados ao LELQ.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	lx
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Polímeros de Impressão Molecular	6
1.2 Métodos de Preparação dos Polímeros	14
1.3 Aplicações de MIP em Química Analítica	17
1.4 Aplicação de MIP em Sensores	18
1.5 Objetivos	23
2. PARTE EXPERIMENTAL	25
2.1 Instrumentação	25
2.2 Reagentes e Soluções	26
2.3 Síntese do MIP	27
2.4 Preparo do Sensor	28
2.5 Metodologia de Trabalho	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1 Estudos Iniciais	31
3.2 Estudo do Potencial Aplicado	34
3.3 Estudo da Concentração do Peróxido de Hidrogênio	35
3.4 Estudo da Natureza da Solução Tampão	37
3.5 Estudo da Influência da Concentração Hidrogeniônica	37
3.6 Estudo da Concentração da Solução Tampão	40
3.7 Caracterização do sistema MIP/Protoporfirina IX	42
3.8 Características Analíticas do Sensor	47
3.9 Estudos de Seletividade	49
3.10 Aplicação do Sensor Proposto em Amostras Reais	51
4. CONCLUSÃO	53
Referências Bibliográficas	54

RESUMO

O presente trabalho apresenta um estudo analítico da determinação de 4-aminofenol com um sistema a base de um polímero de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) e protoporfirina IX de ferro como sensor biomimético da enzima peroxidase. A síntese do MIP foi realizada pelo método de precipitação e as determinações analíticas realizadas amperometricamente com um eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema biomimético. As melhores condições analíticas estabelecidas para a determinação de 4-aminofenol foram: potencial aplicado de - 0,1V vs Ag/AgCl, tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 e concentração de peróxido de 100 µmol L⁻¹. Sob tais condições, uma boa resposta linear do sensor foi observada numa faixa de concentração de 10 a 90 µmol L⁻¹ ($r > 0,9978$), com limites de detecção e de quantificação de 3 e de 10 µmol L⁻¹, respectivamente. Experimentos realizados com amostras de águas de torneira e de rio fortificadas com 4-aminofenol, resultaram em valores de recuperação entre 93 a 112 %, indicando a viabilidade da aplicação do sistema MIP/protoporfirina IX de ferro como sensor amperométrico para a detecção de 4-aminofenol em amostras reais.

Palavres-chave: sensor biomimético, 4-aminofenol, polímero de impressão molecular, protoporfirina de ferro.

ABSTRACT

This work presents an analytical study on determination of 4-aminophenol (4-APh) with a system based on molecularly imprinted polymer (MIP) and iron protoporphyrin IX as biomimetic sensor of the peroxidase enzyme. The MIP synthesis was performed by the precipitation method and the analytical determinations by amperometric measurements with a glassy carbon electrode modified with the biomimetic system. The best analytical conditions established for 4-APh determination were: applied potential of -0.1 V vs. Ag/AgCl, 0.05 mol L⁻¹ Tris buffer solution, pH 7 and hydrogen peroxide concentration of 100 μmol L⁻¹. Under such optimized conditions, a good linear sensor response was observed in a concentration range from 10 to 90 μmol L⁻¹ ($r > 0.998$), with detection and quantification limits of 3 and 10 μmol L⁻¹, respectively. Experiments performed with tap and river water samples spiked with 4-APh resulted in 93 to 112 % recovery values, suggesting the viability of using the MIP/iron protoporphyrin IX system as biomimetic sensor for determinations of 4-APh in real samples.

Keywords: biomimetic sensor, 4-aminophenol, molecularly imprinted polymer, iron protoporphyrin IX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de síntese e atuação do MIP	8
Figura 2: Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usualmente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.	13
Figura 3: Estrutura química dos iniciadores radicalares mais empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.	14
Figura 4: Estrutura da Fe(III)protoporfirina (IX) (hemina, Fe(III)PPIX)	22
Figura 5: Esquema de Preparação dos Eletrodos a base de polímero de impressão molecular.	29
Figura 6: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo modificados com MIP/protoporfirina IX: na ausência de H ₂ O ₂ (a) na presença de 50 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ (b) na presença de 10 μmol L ⁻¹ (c) e 20 μmol L ⁻¹ de 4-APh. Tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0).	32
Figura 7: a) Respostas amperométricas do eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema MIP/protoporfirina IX, sob um potencial aplicado de -0,1 V vs Ag/AgCl, após adições de alíquotas de 4-APh numa solução tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo H ₂ O ₂ 50 μmol L ⁻¹ , b) Dependência da resposta amperométrica com a concentração de 4-APh na solução..	33
Figura 8: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com o potencial aplicado para a determinação de 4-APh numa solução tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 50 μmol L ⁻¹ .	34
Figura 9: (a) Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX na ausência (a) e presença (b) de 50 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ . Potencial aplicado -0,1 V vs Ag/AgCl em tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (b) Dependência com a concentração de H ₂ O ₂ para a determinação de 4-APh numa solução tampão Tris 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L ⁻¹ . Potencial aplicado: -0,1V vs Ag/AgCl..	36
Figura 10: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com a natureza do tampão para a determinação de 4-APh numa solução tampão TRIS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 50 μmol L ⁻¹ .	38

- Figura 11:** Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com o pH para a determinação de 4-APh numa solução tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 4-APh $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: $-0,1\text{V vs Ag/AgCl}$. 39
- Figura 12:** Efeito da concentração molar do tampão TRIS nas concentrações de $(0,025)$; $(0,05)$; $(0,1)$; $(0,15)$; $(0,20) \text{ mol L}^{-1}$. Medidas conduzidas a potencial de $-0,1\text{V vs Ag/AgCl}$, com adições de alíquotas 4-aminofenol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em soluções pH 7,0 contendo $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .e o tampão nas concentrações indicadas.. 39
- Figura 13:** Cronoamperogramas para a determinação de 4-aminofenol em (a) CV; (b) CV-Nafion; (c) CV-NIP (hemina) e (d) CV-MIP (hemina). As medidas foram conduzidas em solução tampão Tris de concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, concentração de peróxido de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $-0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e adição de alíquotas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1} . 41
- Figura 14:** Diagrama esquemático do mecanismo proposto para a determinação 4-APh sobre o eletrodo CV modificado com MIP-protoporfirina de ferro. $4\text{-APh}_{\text{red}}$ e $4\text{-APh}_{\text{oxi}}$ são as formas reduzida e oxidada, respectivamente do 4-aminofenol; $\text{MIP}_{\text{Fe}^{+3}}$ e $\text{MIP}_{\text{Fe}^{+4}}$ são as formas reduzidas e oxidadas, respectivamente da hemina.. 43
- Figura 15:** Microscopia Eletrônicas de Varredura de partículas do MIP (a) e NIP (b). 46
- Figura 16** Cronoamperogramas para a determinação de 4-aminofenol. Medidas conduzidas em tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, (pH 7,0) concentração de peróxido de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $-0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e adição de alíquotas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1} . 47
- Figura 17:** Estruturas dos compostos fenólicos com estrutura química similar à do 4-Aminofenol: (a) 4-Aminofenol, (b) 2-aminofenol, (c) catecol, (d) 2-cresol, (e) guaiacol, (f) cloroguaiacol, utilizados no experimento de seletividade. 49
- Figura 18:** Comportamento do 4-aminofenol no sensor CV-MIP-hemina: Adições de (a,c) 20 mmol L^{-1} 4-APh, (b) 20 mmol L^{-1} 2-APh (2-aminofenol), 20 mol L^{-1} CA (catecol), 20 mmol L^{-1} GUA (guaiacol), 20 mmol L^{-1} 2-cre (cresol) and 20 mmol L^{-1} Clog (cloroguaiacol). Potencial aplicado de $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$, em tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; (pH 7,0); $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de monômeros funcionais empregados em impressão molecular.	11
Tabela 2: Resultados dos parâmetros obtidos para o processo de otimização dos parâmetros para o sensor proposto.	40
Tabela 3: Características de eletrodos modificados para a determinação de compostos fenólicos	50
Tabela 4: Resultados do teste de recuperação de 4-APh obtidos para as amostras analisadas	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AIBN: 2'2 azo-bis-iso-butironitrila

4-APh: Aminofenol

CE: Eletroforese Capilar, do inglês *capillary electrophoresis*

CEC: Eletrocromatografia Capilar, do inglês *Capillary Electrochromatography*

CV: Eletrodo de Carbono Vítreo

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

DPV: voltametria de onda quadrada

EGDMA: Etileno glicol-dimetacrilato

EC: Comissão Européia

EPA: Agência de Proteção Ambiental Norte Americana

EEC: Comunidade Econômica Européia

FET: Transistores de Efeito de Campo, do inglês *field effect transistors*

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LD: Limites de detecção

LQ: Limite de Quantificação

MAA: Ácido metacrílico

MIP: Polímero de Impressão molecular, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*

NIP: Polímero Não Impresso, do inglês *Non Imprinted Polymer*

TRIM: Trimetilpropano trimetacrilato

TLC: Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*

RLC: Reagente de ligação cruzada

SEM: Microscopia de Varredura Eletrônica, do inglês *Scanning Electron Microscopy*

SPE: Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid-Phase Extraction*

SPME: Micro-extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

SAW: Osciladores de Onda Acústica de Superfície, do inglês *Surface-Acoustic Wave Oscillator*

QCM: Microbalanças de Quartzo, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*

UV-vis: Espectroscopia do Ultravioleta Visível

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são de grande interesse por vários motivos como: sua toxicidade, sua capacidade de acumulação no meio ambiente e suas diversas aplicações na área farmacêutica e de alimentos. Estão presentes em efluentes industriais das indústrias de plástico, corantes, tintas, drogas, polímeros, borrachas, desinfetantes e principalmente de papel e celulose [1]. Na natureza podemos encontrá-los como componente natural na madeira (lignino e tanino), nas flores e em algumas frutas sendo responsáveis por propriedades organolépticas.

Alguns compostos fenólicos vêm causando problemas de poluição ambiental de maneira generalizada, praticamente em todas as partes do mundo. Já na área biológica e farmacológica os compostos fenólicos que mais têm sido pesquisados são os neurotransmissores. Estes são mensageiros químicos que transmitem uma mensagem de um neurônio a outro. Esta transmissão ocorre pela secreção de um neurotransmissor a partir de um neurônio que se liga por um receptor específico localizado na membrana da célula mãe [2]. Esta interação entre o neurônio e o neurotransmissor é o maior caminho de comunicação entre os neurônios, por isso, os neurotransmissores possuem um importante papel no sistema nervoso central. Alguns compostos fenólicos têm sido intensamente pesquisado por neurocientistas, já que a deficiência no organismo pode implicar em doenças graves como esquizofrenia e doença de Parkinson [3]. Daí a necessidade de utilizar em formulações farmacêuticas contendo compostos fenólicos, como a dopamina, como forma de suprir ou minimizar tal deficiência.

O composto fenólico 4-aminofenol (4-APh) tem sido largamente utilizado como matéria-prima em indústrias químicas em áreas como medicamentos, corantes, borracha, petróleo e fotografia. Tem importante aplicação na produção do paracetamol que é um dos produtos farmacêuticos mais comercializados de todo o mundo. Este composto também é um produto intermediário da decomposição do paracetamol, como resultado, o 4-aminofenol está presente no ambiente como poluente, sendo considerado uma substância perigosa porque causa aumento da temperatura corpórea em humanos e conduz a longos períodos para ser eliminado do organismo por processos biofísicos e bioquímicos [4,5].

Compostos fenólicos também são conhecidos como poluentes orgânicos, representam o principal produto da degradação de alguns pesticidas organofosforados e fenoxi-ácidos [1,6]. São altamente prejudiciais ao homem e aos organismos aquáticos, seja por ingestão de alimentos contaminados ou simplesmente por contato com a pele, pois esses compostos apresentam fácil penetração nas membranas celulares provocando diversos males e afetando os processos de respiração e fotossíntese [7,8].

Assim, fenóis e especialmente seus derivados clorados, nitrados e alquilados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da EC (Comissão Europeia) [9] e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana) [6, 10,11]. A diretiva (80/778/CCE) da Comunidade Econômica Europeia, por exemplo, incluiu compostos fenólicos como 2-amino-4-clorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol e 4-clorofenol como substâncias perigosas para o

despejo em ambientes aquáticos e estabeleceu a concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em água potável, conhecido como índice de fenóis, no valor de 0,5 µg por litro de água [12]. No Brasil, a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente Nº 20, de 18 de junho de 1986 estabelece o índice de fenóis em 1µg L⁻¹ para águas de abastecimento doméstico.

Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção e determinação destas espécies químicas em diferentes matrizes é de grande interesse, sendo um consenso universal a necessidade de monitoramento contínuo do teor destes contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos [13]. Porém, o tempo e os custos envolvidos com a detecção destes poluentes ambientais (seja na aquisição da amostra, na preparação da amostra ou análise de laboratório) têm imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental [14].

As análises de compostos fenólicos têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos, como cromatografia gasosa com ionização em chama, cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estas técnicas são reconhecidamente sensíveis, permitindo detecção desses analitos em baixas concentrações. Porém, são geralmente caras, lentas, necessitam de operadores bem treinados, requerem etapas de extração ou pré-concentração aumentando o risco de perda da amostra [6].

Uma alternativa que pode ser utilizada como sistema de detecção mais versátil para o monitoramento ambiental, estimulando a produção de uma grande variedade de métodos analíticos são os biossensores. Estes são conhecidos com grande perspectiva de aplicação no monitoramento ambiental em efluentes e qualquer outra matriz de interesse ambiental e suas principais vantagens são a rapidez da análise e a possibilidade de aplicação direta sem a necessidade de preparação da amostra. O seu uso em métodos analíticos tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, apresentando resultados satisfatórios em vários procedimentos relacionados ao controle ambiental [15-17].

Os biossensores eletroquímicos representam uma das mais interessantes áreas da pesquisa no campo da eletroanalítica. Três aspectos importantes podem ser considerados antes de avaliarmos um sensor eletroquímico: (i) seleção de um elemento químico ou biológico de reconhecimento molecular conhecido como receptor; (ii) seleção de um elemento de transdução eletroquímica conhecido como transdutor; (iii) a integração dos dois elementos, normalmente via imobilização do receptor no transdutor através de procedimentos de modificação de superfície [18].

Nos biossensores, o reconhecimento seletivo é realizado por biomoléculas, tais como, anticorpos ou enzimas, que possuem a capacidade de suprir as demandas analíticas para uma ampla gama de analitos, mas, por outro lado, apresentam desvantagens como baixa estabilidade química. Dentre esses analitos destacam-se diversas aplicações de biossensores para determinação de compostos fenólicos [19,20].

Tendo em vista a baixa estabilidade química e física das espécies biológicas empregados em biossensores, receptores artificiais vêm ganhando importância como uma possível alternativa aos sistemas naturais de reconhecimento [21]. Assim, várias estratégias foram propostas no sentido de substituir os materiais biológicos por materiais sintéticos que possuam o mesmo grau de reconhecimento molecular e seletividade [22].

A habilidade de muitas biomoléculas de reconhecer e ligar-se seletivamente a um substrato específico é um processo essencial para todos os sistemas biológicos. O reconhecimento molecular seletivo geralmente ocorre via formação de ligações não-covalentes. Portanto, a seletividade está entre as propriedades mais desejáveis de anticorpos artificiais e receptores biomiméticos [23]. A seletividade é obtida se o receptor sintético possuir uma cavidade com tamanho e formato adequados, bem como sítios capazes de estabelecer uma interação favorável com a espécie de interesse. Moléculas como a ciclodextrina e o éter-coroa foram bastante empregadas como receptores moleculares sintéticos [24,25].

Dentre os materiais mais promissores no campo dos sistemas de reconhecimento molecular biomimético destacamos os Polímeros de Impressão Molecular conhecidos popularmente como MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*. A tecnologia de impressão molecular tem como vantagem fornecer polímeros capazes de reconhecimento molecular e catálise, que podem ser utilizados em técnicas de extração, separação, detecção química ou reações catalíticas [21].

1.1 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR

A existência na natureza de vários sistemas de reconhecimento molecular como a interação antígeno-anticorpo ou enzima-substrato, tem despertado grande interesse da ciência na síntese de sítios seletivos de reconhecimento [26]. A partir da teoria de *Pauling* para formação de anticorpos, surgiu a teoria da impressão molecular, onde um antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respectiva cadeia de anticorpos [27]. A partir desta concepção, surgiu a idéia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (um polímero) ao redor de uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo, ou seja, que pudesse efetuar seletivamente o reconhecimento molecular.

Os Polímeros de Impressão Molecular (MIP) em relação aos materiais biológicos apresentam vantagens como o baixo custo dos reagentes empregados, a estabilidade química, física e térmica do material por longos períodos de tempo, a capacidade de ser estocado sem perder sua especificidade, a possibilidade de reutilização do polímero após a limpeza do mesmo e a possibilidade de ser empregado em condições diferentes daquelas presentes em seu ambiente nativo [28, 29]. Vale ressaltar a vantagem da capacidade dos MIPs de ligar-se seletivamente a uma dada molécula com interações eficientes comparáveis aos sistemas substratos-enzimas, ou antígeno-anticorpo [30].

Desta forma, os MIP têm sido empregados como substitutos de biomoléculas que atuam no processo de reconhecimento molecular. Entretanto,

os MIP apresentam algumas desvantagens como: formação de sítios de ligação heterogêneos, processo laborioso de quebra e trituração do material e dificuldade de remoção da molécula molde em alguns casos [29].

Os MIP podem ser considerados como materiais plásticos e sintéticos, formados ao redor de uma molécula tomada como molde e que atuam de forma semelhante ao sistema antígeno-anticorpo no processo de reconhecimento molecular da substância escolhida como molde ou de seus análogos estruturais [31].

A Figura 1 mostra um esquema de síntese dos Polímeros de Impressão Molecular (MIP) que consiste, inicialmente, na interação por meio de ligações covalentes ou não-covalentes de uma molécula molde (também conhecida como molécula chave, molécula alvo, molécula impressa, antígeno impresso ou analito) com moléculas de um ou mais monômeros funcionais [32].

Em seguida, é adicionado ao meio um agente reacional que promove ligações cruzadas no polímero a fim de formar uma matriz polimérica rígida em torno do complexo molde-monômero formado. A reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar e por aquecimento ou iluminação por radiação Ultra-Violeta (UV) do meio reacional na ausência de oxigênio. A polimerização radicalar com reagentes de ligação cruzada estabilizam o complexo formado monômero/molécula-molde resultando em um polímero mecanicamente e termicamente estável.

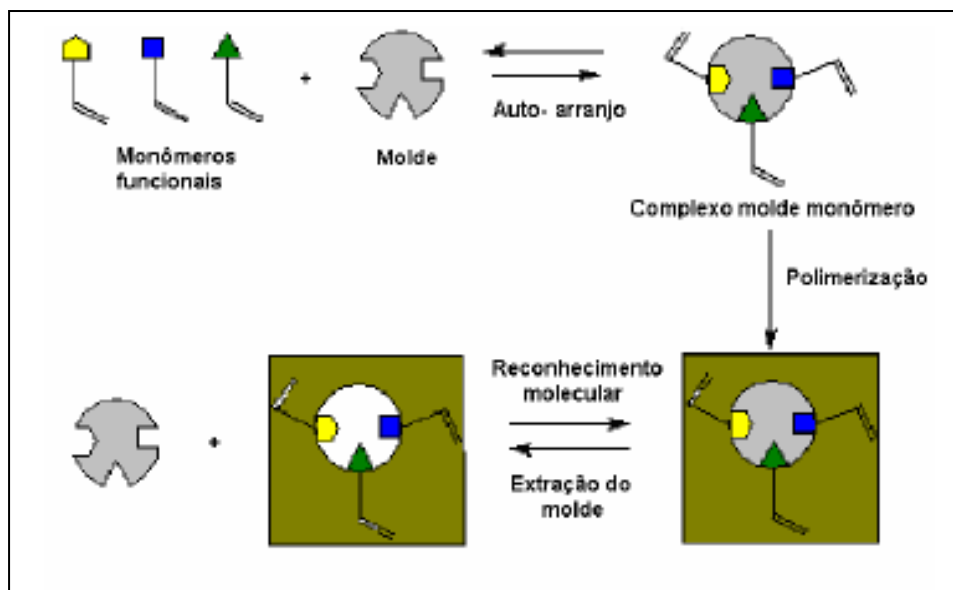


Figura 1: Esquema geral de síntese e atuação do MIP

Após a extração da molécula molde, que é realizada por meio de um solvente adequado a cada tipo de polímero, a matriz polimérica resultante revela cavidades tridimensionais com tamanhos uniformes, capazes de reter seletivamente a mesma molécula molde presente em uma amostra, devido à forma complementar, tanto em tamanho quanto à presença de grupos funcionais. Tais cavidades constituem os sítios específicos de ligação que agem no reconhecimento deste composto ou de substâncias com estrutura semelhante à substância usada como molécula molde [33].

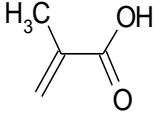
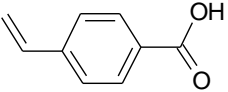
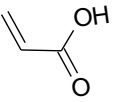
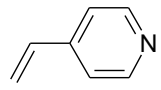
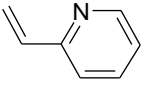
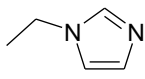
Para a síntese destes materiais o primeiro fator importante é a escolha criteriosa da molécula a ser utilizada como molécula-molde (analito) e do monômero funcional empregado. A interação analito-monômero pode se dar por meio de ligação covalente ou não covalente, por meio de ligação de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou por interação hidrofóbica [34].

A molécula molde, por sua vez, não deve ser polimerizável, dependendo das condições em que ocorre a polimerização ela deve ser estável ao aquecimento e/ou radiação UV, devendo ainda, ser solúvel no solvente empregado na síntese do polímero. O tamanho do molde, sua solubilidade e o uso que será dado ao material impresso também devem ser levados em consideração durante o planejamento de síntese do polímero. Os polímeros preparados por ligação covalente possuem sítios mais seletivos, dada a uniformidade gerada nos mesmos. De outra forma, quando esta estratégia é adotada, a necessidade do uso de monômeros e analitos que estabeleçam ligações covalentes restringe a aplicabilidade dos MIP para poucos analitos. Os polímeros preparados a partir de ligações não covalentes apresentam diâmetros de partículas e sítios seletivos menos uniformes. Apesar destas desvantagens, é o método de preparo mais utilizado, sendo responsável por cerca de 90% das publicações sobre MIPs, dada a maior flexibilidade de aplicação dos MIP para diferentes analitos [35].

Os analitos escolhidos que possuem grupos com características básicas interagem mais facilmente com monômeros que contêm grupos com características ácidas, como o ácido metacrílico (MAA). Em contrapartida, monômeros com caráter básico como o 4-vinilpiridina (VP) interagem preferencialmente com analitos ácidos. Como a interação analito-monômero é governada por um processo em equilíbrio que obedece ao princípio de Le Chatelier, quantidades superiores do monômero em relação ao analito (geralmente 4:1) devem ser empregadas com intuito de deslocar o equilíbrio, para formar maior quantidade de complexos “analito-monômero” [36].

Sabendo que o monômero funcional desempenha um papel muito importante no processo de reconhecimento molecular, uma vez que ele está diretamente envolvido na formação de ligações químicas com a molécula molde nos sítios impressos, uma avaliação dos grupos funcionais presentes na molécula alvo deve ser realizada, e em seguida, a melhor escolha do monômero funcional que permitirá a formação de ligações químicas mais efetivas com o analito. Alguns exemplos de monômeros funcionais ácidos e básicos são mostrados na Tabela 1, os monômeros funcionais tipicamente utilizados em impressão molecular apresentam diferentes formas de interação com as possíveis moléculas molde. Por isso, a avaliação da estrutura da molécula a ser impressa é de fundamental importância para que o processo de reconhecimento molecular seja bem sucedido. Uma regra básica a ser observada é que o monômero funcional deve ter complementaridade em relação ao molde utilizado. Assim, analitos contendo grupos funcionais básicos são melhores impressos com monômeros contendo grupos funcionais ácidos e vice-versa [35].

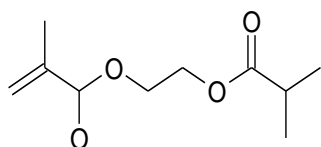
Tabela 1: Exemplos de monômeros funcionais empregados em impressão molecular.

	Monômero funcional	Nome	Possíveis tipos de interação com o analito
Ácidos		Ácido Metacrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
		Ácido vinilbenzóico p-	Interação iônica e ligação de hidrogênio
		Ácido acrílico	Interação iônica e ligação de hidrogênio
Básicos		4-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
		2-Vinilpiridina	Interação iônica, ligação de hidrogênio e transferência de carga
		1-Vinilimidazol	Interação iônica, ligação de hidrogênio e coordenação com metais

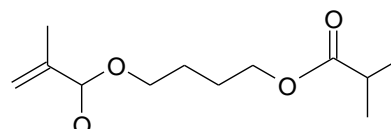
O solvente utilizado na síntese influencia a estabilidade da formação do complexo “analito-monômero”, por isso, sua escolha torna-se uma etapa importante do processo. O solvente, além de fornecer um meio onde analitos e monômeros sejam solúveis, não deve interferir na interação analito-monômero. Quando tal interação ocorre por meio de forças eletrostáticas e por ligação de hidrogênio, solventes apolares com constante dielétrica baixa, tais como clorofórmio e tolueno, oferecem um meio adequado para estabilizar as referidas interações. Por outro lado, solventes com constante dielétrica maior,

por exemplo acetonitrila, também podem ser utilizados, mas os polímeros obtidos podem apresentar afinidade menos acentuada em se ligar novamente ao analito. Já os solventes próticos como água e metanol são pouco utilizados neste caso, pois de maneira geral, atuam como competidores no meio reacional interferindo na formação de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre analito e monômero. Além destas considerações, o solvente que muitas vezes é chamado de solvente porogênico, pode influenciar nas características morfológicas dos MIP. Polímeros pouco porosos e com pequena área superficial apresentam baixa capacidade de reconhecimento molecular, basicamente devido à lenta difusão dos analitos em direção aos sítios seletivos localizados nos microporos [37].

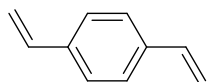
Além dos parâmetros mencionados anteriormente, a seletividade destes polímeros é também assegurada face ao emprego de reagentes que promovam ligações cruzadas, permitindo assim, a estabilidade do complexo “analito-monômero” gerando uma matriz polimérica rígida que garante a estrutura do sítio seletivo formado. O reagente de ligação cruzada deve estar presente em excesso em relação à quantidade de monômero funcional. Estudos têm demonstrado que no mínimo 50% do reagente de ligação cruzada deve estar presente no meio reacional. O etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) tem sido o reagente de ligação cruzada mais utilizado, pois promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa. Outros reagentes de ligação cruzada têm sido investigados (Figura 2), mas apenas o trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) tem apresentado resultados similares ou melhores que o EGDMA [38].



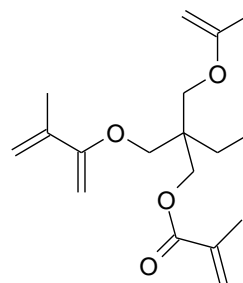
Etileno glicol dimetacrilato



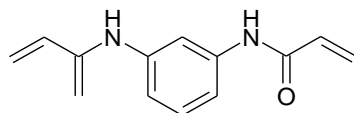
Tetrametileno dimetacrilato



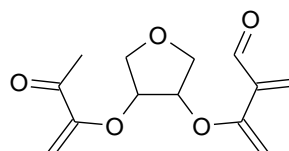
p-divinilbenzeno



TRIM – Trimetilpropano trimetacrilato



N,N'- metileno bisacrilamida



Anidroeritrotol dimetacrilato

Figura 2: Estrutura química de alguns agentes de ligação cruzada usualmente empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.

Uma vez que todos os componentes estejam presentes na mistura reacional (analito, monômero, reagente de ligação cruzada e o solvente apropriado), para que possa ocorrer a reação de polimerização é acrescentado um iniciador radicalar ao meio. Esse composto, por sua vez, sofre clivagem em sua estrutura, ou por radiação UV ou por aquecimento, para gerar radicais que iniciam o mecanismo da reação de polimerização. Na Figura 3, são mostrados alguns exemplos de iniciadores típicos empregados com esta finalidade.

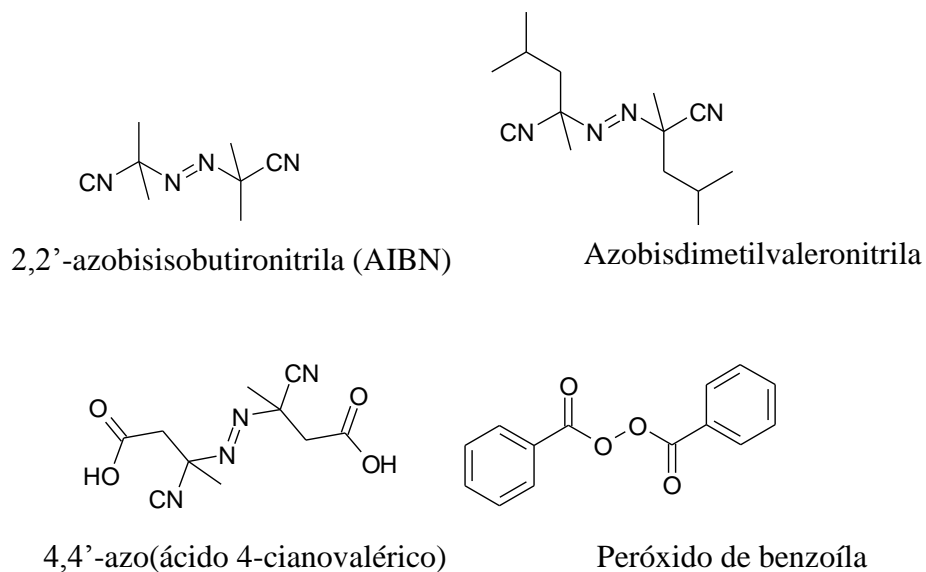


Figura 3: Estrutura química dos iniciadores radiculares mais empregados na síntese de polímeros de impressão molecular.

1.2 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS POLÍMEROS

O método de polimerização em “*bulk*” é o método mais utilizado no preparo dos MIP, basicamente devido a sua simplicidade. Este método consiste na adição consecutiva do analito, do monômero, do solvente, do reagente de ligação cruzada e do iniciador radicalar. Posteriormente, é retirado o máximo de oxigênio possível por desaeração, e por fim, ocorre a reação de polimerização por aquecimento ou irradiação do mesmo. Como resultado obtém-se um sólido duro que deve ser triturado, peneirado e extraído o analito por eluição.

Um polímero obtido tradicionalmente pelo referido método, depois de triturado, apresenta partículas com formatos irregulares e tamanhos variando de 20 a 50 μm . Outra desvantagem deste método refere-se ao elevado tempo reacional (cerca de 20 h). Adicionalmente, apenas 50% ou menos do polímero

sintetizado possui características para propostas analíticas, uma vez que durante a trituração, alguns sítios seletivos formados são parcialmente destruídos, o que diminui a capacidade seletiva de retenção do polímero [35]. Os MIP obtidos pelo método de polimerização em “*bulk*” são mais indicados para técnicas de extração como a SPE, ao passo que em aplicações cromatográficas, principalmente como fase estacionária em HPLC é pouco indicado, devido à heterogeneidade das partículas [39].

Foram desenvolvidas nos últimos anos, novas metodologias para o preparo de MIP com o objetivo de produzir polímeros com propriedades físicas mais adequadas a suas aplicações como tamanho das partículas, porosidade, volume de poro e área superficial. Ao contrário do método de polimerização em “*bulk*”, cuja síntese é realizada num sistema homogêneo, a maioria dos novos métodos de preparo contemplam reações em sistemas heterogêneos, como por exemplo a polimerização por suspensão [40], por precipitação [41] e por expansão em multi-etapas [42]. Outros métodos de preparo dos MIP contemplam reações de polimerização dentro de poros de sólidos (sílica e resinas) [43] e reações de polimerização sobre superfície modificada de suporte sólido [44]. Para algumas aplicações a polimerização pode ser realizada *in situ*, como por exemplo, no caso da micro-extração em fase sólida, onde a polimerização é realizada sobre um cabo de fibra óptica silanizada [45].

Na polimerização por suspensão, a reação polimérica ocorre dentro das gotas do monômero dispersas num solvente imiscível, geralmente água. O polímero obtido no formato de esferas é facilmente separado da fase aquosa. A reação de polimerização resulta em partículas poliméricas com tamanhos uniformes. No método em questão, apesar da uniformidade do tamanho das

partículas ser uma vantagem, eventualmente algumas moléculas de água se dissolvem na mistura polimérica interferindo na interação analito-monômero, principalmente quando esta se dá por ligação de hidrogênio. Além disso, em situações onde monômeros e analitos possuem elevada solubilidade em água, há a possibilidade de ocorrer partição destes constituintes reacionais da fase orgânica para o meio aquoso, resultando num polímero com baixo reconhecimento molecular. A polimerização por suspensão é, portanto, realizada com sucesso quando analitos e monômeros interagem preferencialmente por interações hidrofóbicas e iônicas.

O método de preparo do MIP escolhido para o presente trabalho foi o método de polimerização por precipitação, que por sua vez, é análogo ao método de polimerização em “*bulk*”, porém, volumes superiores de solventes são empregados a fim de impedir a formação de uma pasta polimérica. Enquanto que no método convencional normalmente são utilizados volumes de solvente aquoso de 10 mL, no método por precipitação, quantidades cerca de 5 vezes maiores são utilizadas. Convencionalmente, a formação de partículas poliméricas a partir do método de polimerização por precipitação ocorre devido ao crescimento da cadeia polimérica ao longo da reação, o que torna o polímero cada vez menos solúvel no meio. Outra explicação para a precipitação pode ser fundamentada em face da formação de ligações cruzadas no polímero, tornando-o também pouco solúvel no solvente reacional [46]. Esta última explicação é a mais aceita ao se considerar a síntese de MIP por precipitação.

Tal como a polimerização por suspensão em meio aquoso a polimerização por precipitação também produz partículas com tamanhos

uniformes (tipicamente com diâmetro $\leq 1 \mu\text{m}$) [41]. Outro ponto que deve ser destacado refere-se ao maior rendimento da reação (cerca de 85%) contra os 50% do método de polimerização em “*bulk*”. A síntese dos MIP por polimerização por precipitação é induzida por luz ou aquecimento na ausência de oxigênio. Neste método as micropartículas são obtidas por meio de centrifugação [40].

1.3 APLICAÇÕES DE MIP EM QUÍMICA ANALÍTICA

O primeiro trabalho com emprego de MIP em química analítica é datado de 1972, onde Wulff e Sarhan propuseram um MIP com sítios seletivos para a separação enantiomérica de racematos de açúcar [47]. Desde então, e principalmente a partir da década de 1990, um crescente emprego da tecnologia de impressão molecular tem ocorrido em diversos laboratórios de química analítica, a ponto de se afirmar que, hoje, a grande maioria das aplicações de sucesso desses polímeros, ocorre nesse campo das ciências químicas.

Podemos citar aplicações em extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) [48] e microextração em fase sólida (SPME – *Solid Phase Microextraction*) [45], em técnicas de separação, tais como, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) [49], eletroforese capilar (CE – *Capillary Electrophoresis*) [50], eletrocromatografia capilar (CEC – *Capillary Electrochromatography*) [51]; cromatografia em camada delgada (TLC – *thin layer chromatography*) [52].

Também, há um amplo campo de pesquisa dos MIP em associação com técnicas eletroanalíticas [53] enfocando o desenvolvimento de sensores seletivos, bem como em espectrofluorimetria.

1.4 APLICAÇÃO DE MIP EM SENSORES

As primeiras tentativas que testaram as propriedades de reconhecimento dos MIP, visando seu emprego na construção de sensores, incluíam medidas elipsométricas em finas camadas de MIP impressas com Vitamina K1 e estudos da permeabilidade de membranas com impressão molecular [54]. O primeiro sensor biomimético empregando MIP como elemento de reconhecimento foi um sensor de capacitância, desenvolvido pelo grupo de Mosbach, em 1991 [55]. Nos anos seguintes um grande número de trabalhos descrevendo a aplicação dos MIP no desenvolvimento de sensores químicos foi publicado usando diversos tipos de transdutores, dentre os quais se destacam: os eletroquímicos, tais como os transistores de efeito de campo (FET– *Field Effect Transistors*) e os eletrodos; os piezelétricos, que são transdutores sensíveis a variações de massa, tais como osciladores de onda acústica de superfície (SAW – *Surface-acoustic Wave Oscillator*) e as microbalanças de quartzo (QCM – *Quartz Crystal Microbalance*), e ópticos, baseados no uso de fibras ópticas como guias de luz.

Na construção de sensores com MIP, uma técnica que pode ser empregada é a eletropolimerização *in situ* sobre superfícies condutoras, tais como ouro e grafite, o que limita sua aplicação para construção de sensores que possuam transdutores com superfícies condutoras, como é o caso dos

sensores eletroquímicos e piezoelétricos. O primeiro sensor obtido por eletropolimerização relatado na literatura, foi desenvolvido por Malitesta *et al*, que usaram orto-fenilenodiamina na presença de glicose (molécula-molde), na superfície de um eletrodo de platina, pertencente a um dispositivo piezoelétrico [56].

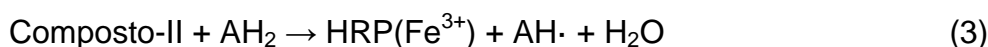
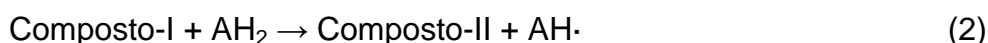
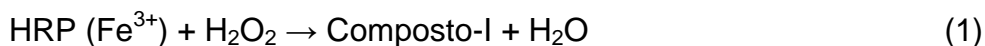
O desenvolvimento de MIPs com alta especificidade e estabilidade tornaram os MIPs uma alternativa promissora às enzimas, anticorpos e outros receptores naturais geralmente usados em sensores. Para a construção de um sensor usando MIP devemos considerar três aspectos: O uso de um sistema de transdução ultra-sensível capaz de monitorar o reconhecimento e transformá-lo em sinal mensurável, desenvolvimento de um MIP capaz de interagir com o analito nas condições requeridas com afinidade e especificidade desejáveis e a integração do MIP com o transdutor [57].

Foi reportado na literatura um Polímero de Impressão Molecular sintetizado com Zinco (II)-protoporfirina, como monômero funcional, com boa seletividade à 9-etiladenina (9-EA) em comparação com compostos de estrutura análoga [58]. Para tanto, o reconhecimento da 9-EA pelos centros catalíticos da metaloporfirina presente no polímero impresso pôde ser detectado por UV-vis e por fluorescência. A impressão molecular mostrou-se viável para a preparação de polímeros sintéticos capazes de realizar o reconhecimento molecular. Sabendo que o preparo dos MIPs consiste em uma mistura de molécula molde, monômero funcional, reagente de ligação cruzada e iniciador radicalar, todos dissolvidos em solvente apropriado, se moléculas de metaloporfirinas polimerizáveis forem incluídas na mistura reacional, como monômeros funcionais, estas se ligarão seletivamente à molécula molde e

resultarão em um receptor biomimético catalítico feito de Polímero de Impressão Molecular (MIP) à base da metaloporfirina.

Os MIPs são materiais que mimetizam as propriedades de reconhecimento de biomoléculas através das teorias de chave-fechadura de *Linus Pauling*. Trabalhos anteriores reportados na literatura descrevem o uso da protoporfirina IX de ferro, como monômero funcional, na síntese de um MIP cataliticamente ativo para o 4-aminofenol, usando para tal a técnica de polimerização em “*bulk*” [59]. Este MIP mimetiza a enzima peroxidase e foi utilizado como preenchimento de cartuchos de pré-concentração em um sistema em fluxo, o 4-aminofenol foi oxidado ao passar pelo cartucho através de ação dos sítios catalíticos do MIP e posteriormente reduzido na superfície de um eletrodo de carbono vítreo posicionado depois do cartucho no sistema em fluxo.

Sabe-se que a Horseradish peroxidase (HRP) é uma enzima do grupo das peroxidases definida como oxireductase que usa o peróxido de hidrogênio como substrato natural da enzima. São definidas como hemeproteínas (sítio ativo Fe^{+3} protoporfirínico) e são extensivamente utilizadas na construção de biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos. A reação enzimática da HRP ocorre em três etapas distintas, como mostram as equações 1 a 3:



Na primeira etapa, a enzima reduz H_2O_2 formando um composto oxidado intermediário (Composto-I). A forma oxidada da enzima é então, reduzida à sua forma nativa em duas etapas, sendo que em cada etapa uma substância orgânica é oxidada.

Quando a enzima peroxidase está imobilizada na superfície de um eletrodo, os intermediários oxidados da enzima, Composto-I e Composto-II, podem ser reduzidos de volta ao seu estado nativo por dois caminhos: por transferência de elétrons direta ou mediada. Na transferência de elétrons direta as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo, principalmente se este for grafite. Já na transferência mediada de elétrons, a enzima recebe elétrons de substâncias doadoras (AH_2), como por exemplo os fenóis. Na presença de uma substância doadora de elétrons a enzima é regenerada e as espécies AH -formadas são reduzidas eletroquimicamente no eletrodo, resultando em uma corrente de redução proporcional à concentração da substância doadora. É conhecido que uma alta concentração de peróxido pode levar a uma forma inativa da peroxidase. Deste modo, os fenóis podem atuar como doadores de elétrons na reação da peroxidase com peróxidos, sendo este o princípio da utilização de eletrodos modificados com peroxidase para a detecção de espécies fenólicas [60].

Dificuldades intrínsecas têm feito do reconhecimento de moléculas polares em água um desafio, como já relatado na literatura, grupos funcionais polares são facilmente hidratados e interações entre grupos funcionais polares e interações ponte de hidrogênio e/ou eletrostáticas são enfraquecidas pela hidratação quando comparados com as interações em solventes não-polares [58,61].

Metaloporfirinas são conhecidas por serem capazes de reconhecer tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas com boa seletividade e particular afinidade em água [62], que pode oferecer uma solução aos problemas de afinidade se for usada como co-monômero na preparação do MIP. Estes receptores possuem sítios do tipo ácido de Lewis (íon metálico), sítio de reconhecimento eletrostático (grupos $-\text{COO}^-$) e sítios de ligação hidrofóbica (estrutura da porfirina e grupos hidrofóbicos como cadeias alquílicas e grupos aril) que tornaram possível a sua aplicação em sensores ópticos.

A escolha da protoporfirina IX de ferro como monômero funcional foi possível devido a presença de grupos vinílicos em sua estrutura (ver figura 4), o que torna possível a polimerização desta na mistura reacional do MIP possibilitando que a porfirina atue como centro catalítico do polímero (sítio ativo: Fe^{3+} porfirínico).

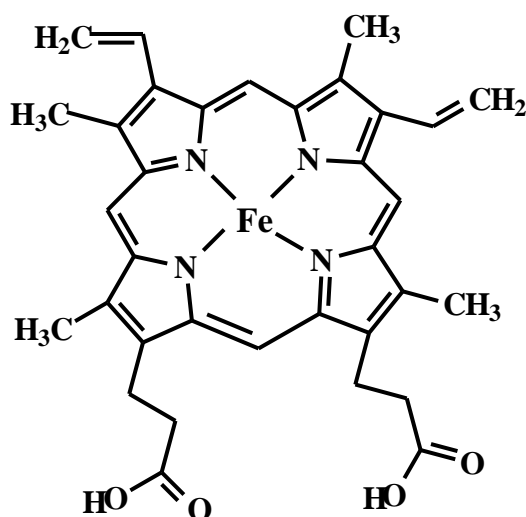


Figura 4: Estrutura da Fe(III)protoporfirina (IX) (hemina, Fe(III)PPIX)

Com o objetivo de avaliar o desempenho do polímero impresso (MIP) no reconhecimento molecular de alguma espécie, deve-se sintetizar

simultaneamente outro tipo de polímero na ausência da molécula molde (analito), a esse polímero é dado o nome de polímero não impresso (NIP - do inglês *Non-Imprinted Polymer*) e serve de polímero de controle uma vez que este não apresenta sítios específicos de ligação. Assim, todas as condições otimizadas devem ser aplicadas igualmente a ambos os polímeros para que seja feita a verificação da capacidade de reconhecimento molecular do MIP em relação ao NIP [63].

No caso de um MIP com atividade catalítica, é necessário também a síntese de um polímero impresso na ausência da protoporfirina, que é a responsável pela atividade catalítica. Este polímero sem atividade catalítica é usado como polímero de controle e serve de comparação entre o polímero impresso catalítico e o não-catalítico, uma vez este possui somente os sítios seletivos, mas não apresenta os sítios catalíticos com a protoporfirina.

1.5 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é de desenvolver um sensor amperométrico à base de um Polímero de Impressão Molecular (MIP) que mimetiza a enzima Horseradish peroxidase (HRP) usando a protoporfirina IX de ferro (hemina) como grupo prostético responsável pelos sítios catalíticos. Para tanto, foram cumpridas as seguintes etapas:

Seleção dos componentes da síntese do MIP (molécula molde, monômero funcional, reagente de ligação cruzada, iniciador radicalar e solvente porogênico).

Síntese do MIP através da técnica de polimerização por precipitação com o objetivo de obter partículas uniformes do polímero bem como a síntese dos polímeros de controle NIP para avaliar comparativamente o reconhecimento molecular e a atividade catalítica.

Construção do sensor através da modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com um filme do MIP disperso em metanol.

Estudo do comportamento amperométrico do sensor à base de MIP na determinação do 4-aminofenol e compará-lo aos dos polímeros de controle.

Investigar as melhores condições de pH, potencial aplicado, concentração de peróxido, natureza e concentração do tampão e efeito da presença de interferentes visando a otimização do sensor proposto.

Aplicar o sensor nas melhores condições para a determinação de 4-aminofenol em amostras de água de rio e de torneira.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados a instrumentação, os materiais, os reagentes e os procedimentos experimentais empregados na síntese dos MIPs, no preparo dos sensores a base desses polímeros e na análise do 4-aminofenol.

2.1 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE, Holanda) interfaciado com o programa computacional GPES.

Na síntese dos MIP, os seguintes equipamentos foram utilizados: uma chapa aquecedora Fisatom (Brasil) para aquecimento, um pH-metro Corning (Brasil) para o controle do pH das soluções, uma estufa Fanem (Brasil) modelo 145 para secagens e um agitador horizontal Fanem (Brasil) a obtenção de uma mistura homogênea durante o processo de polimerização. Além disso, a extração da molécula molde do polímero formado foi realizada com o auxílio de um mini-agitador modelo Minishaker da IKA® e a filtração das partículas do polímero com uma bomba de vácuo da Fanem (Brasil).

As análises por microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram realizadas num microscópio JEOL LV-JSM 6360 (Japão) operando em voltagem de 15 keV. Inicialmente, as amostras foram inicialmente depositadas em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro até a espessura

de 12 nm num metalizador MED 020 da Bal-Tec. Os parâmetros de poros e a área superficial dos MIPs foram mediadas com um equipamento de sorção de gás Quantachrome Autosorb Automated.

2.3 ELETRODOS

Os experimentos eletroquímicos foram realizados numa cela convencional de vidro com um eletrodo de carbono vítreo (CV), adquirido da Metrohm® (Suíça), com uma área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$, como eletrodo de trabalho base para a construção dos sensores. Além disso, um eletrodo de Ag/AgCl comercial da Analion Indústria e Comércio Ltda (Ribeirão Preto – SP) e um eletrodo de platina foram utilizados como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente.

Antes da utilização do eletrodo de trabalho, a superfície do carbono vítreo era polida sobre tecidos umedecidos com suspensões aquosas de alumina 1,0; 0,3 e 0,05 μm . Posteriormente, era lavado com água e sonificado em água num banho ultrasom, por cerca de 10 minutos, para remoção de partículas de alumina que possivelmente permaneceram aderidas no eletrodo.

2.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções aquosas foram preparadas com reagentes de grau analítico e água purificada num sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

A síntese do MIP foi realizada a partir dos seguintes reagentes: 4-aminofenol (4-APh, 98% - Riedel-de Haën, Alemanha), ácido metacrílico (MAA,

99% - Acros Organics), trimetilpropano trimetacrilato (TRIM, 99% - Sigma-Aldrich, EUA), 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (AIBN, 98% - Sigma), protoporfirina de ferro IX (Hemina, 99% - Acros Organics) e acetonitrila (Synth); todos utilizados sem purificação prévia. Além destes, também foram utilizados peróxido de hidrogênio (Synth) e solução 5% de Nafion[®] (Aldrich Chemical Company).

As soluções de 4-aminofenol foram preparadas sempre que necessário e a partir de soluções estoque com concentração 0,01 mol L⁻¹ e protegidas da luminosidade.

Os reagentes Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol, 99%), Pipes (Ácido 2-etanosulfônico, 99,5%) e Hepes (Ácido 4-(2-hidroximetil)-1-piperazina-etano) foram adquiridas da Sigma-Aldrich. As soluções tampão foram preparadas com água purificada e as correções de pH foram realizadas com soluções NaOH 5% e/ou HCl 0,1 mol.L⁻¹.

No estudo de seletividade, os seguintes compostos fenólicos, com estrutura química similar à do 4-aminofenol, foram testados: 2-aminofenol, catecol, 2-cresol, guaiacol e cloroguaiacol, todos adquiridos da Sigma-Aldrich.

2.5 SÍNTESE DO MIP

Para a síntese do MIP adotou-se o método de polimerização por precipitação reportado na literatura [64]. Inicialmente, foram misturados o monômero funcional ácido Metacrílico (MAA), o reagente de ligação cruzada trimetilpropano-trimetacrilato (TRIM) e a protoporfirina IX de ferro (hemina) em 40 mL do solvente acetonitrila. Posteriormente, o template (4-APh) e o iniciador

radicalar 2,2'-azo-bis-isso-butironitrila (AIBN) foram adicionados à solução. A mistura foi então sonicada por 10 minutos sob atmosfera de nitrogênio, para evitar a presença indesejável de oxigênio. Em seguida, frascos contendo a solução foram vedados e colocados em um banho termostatizado com água a 60° para polimerização. Após 9 horas, as partículas do MIP foram separadas num filtro com diâmetro de poro de 0,27 µm, lavadas com uma mistura metanol/ácido acético (9:1, v/v) para a extração (remoção) do *template* até que nenhum teor do mesmo fosse detectado no eluato por voltametria de pulso diferencial (DPV). Para evitar a possibilidade de erros nos experimentos de DPV com soluções muito diluídas do *template*, pequenas quantidades de metanol foram adicionadas repetidamente, até que a presença de 4-aminofenol não fosse mais detectada na extração.

Afim de avaliar a seletividade dos MIP, polímeros sem impressão molecular (síntese na ausência da molécula molde) também foram preparados de modo similar.

2.6 PREPARO DO SENSOR

Conforme ilustrado na Figura 5, para a preparação do sensor biomimético, 10 mg do MIP eram sonicados por aproximadamente 10 minutos em 1 mL metanol para dispersão. Em seguida, uma alíquota de 10 µL da suspensão era retirada e colocada sobre a superfície do carbono vítreo. Após a secagem à temperatura ambiente, 10 µL de uma solução alcoólica de Náfion[®] era adicionado de forma a cobrir toda a superfície do eletrodo de carbono vítreo. Após 2 horas de secagem à temperatura ambiente, o eletrodo era

transferido para a célula eletroquímica para o início das medidas eletroquímicas. Neste sistema, a membrana de Náfion[®] atua como um “filtro químico” prevenindo o acesso indesejável de espécies aniônicas e ao mesmo tempo facilitando o acesso do analito 4-APh e de prótons.

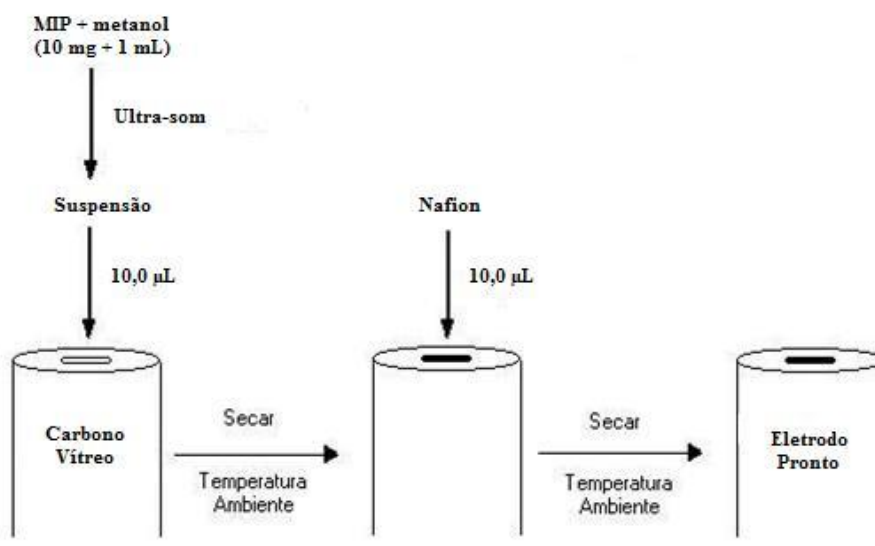


Figura 5: Esquema utilizado na preparação do sensor biomimético a base de um polímero de impressão molecular modificado com protoporfirina IX sobre o eletrodo de carbono vítreo.

2.7 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE RIO

As amostras de água do Rio Hermógenes Filho (Campinas – SP) foram coletadas nos pontos de menor e de maior profundidades, armazenadas em frascos de polietileno e conservadas em geladeira para posterior utilização.

As amostras de torneira foram coletadas no laboratório LEEDS do Instituto de Química da Universidade de Campinas UNICAMP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDOS INICIAIS

Com o propósito de verificar o comportamento voltamétrico e por cronoamperometria do eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema MIP/protoporfirina IX para reconhecimento de 4-APh foram realizados testes iniciais com base em informações reportadas na literatura [59].Primeiramente, experimentos de voltametria cíclica foram realizados para avaliar a resposta do eletrodo modificado com MIP. Estes estudos foram conduzidos na faixa de potencial de -0,25 a +0,5 V vs Ag/AgCl com uma velocidade de varredura do potencial de 0,01 V s⁻¹. Os experimentos foram realizados numa solução do tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹, na ausência e presença de H₂O₂ 50 μmol L⁻¹ e, posteriormente, na presença de 4-aminofenol numa concentração de 10 μmol L⁻¹ e 20 μmol L⁻¹. Os voltamogramas na Figura 6, mostram que após a adição do peróxido (Figura 6b) um acréscimo na corrente de redução e um decréscimo na corrente anódica são observados, sugerindo que na presença da protoporfirina IX de ferro ocorre uma redução do peróxido de hidrogênio de forma semelhante à dos biossensores à base de peroxidase. Após a adição de 4-aminofenol na solução (Figura 6c-d), um novo acréscimo de corrente é observado em potenciais próximos de -0,07 V vs Ag/AgCl. Este incremento é similar ao observado em biossensores à base de peroxidase onde a transferência é mediada por compostos fenólicos. Este comportamento sugere que o sistema MIP/protoporfirina IX possui atividade catalítica para o 4-aminofenol indicando sua viabilidade na preparação do sensor para a detecção do 4-APh.

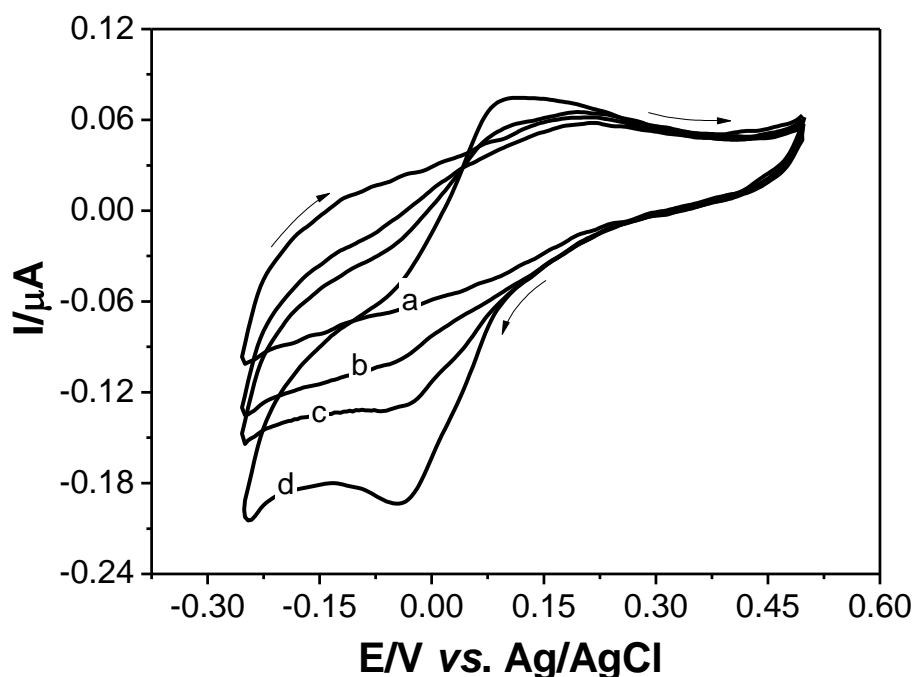


Figura 6: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo modificados com MIP/protoporfirina IX: na ausência de H_2O_2 (a) na presença de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 (b) na presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (c) e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 4-APh. Tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) Velocidade de varredura $0,01 \text{ V s}^{-1}$.

Posteriormente, experimentos de cronoamperometria foram realizados com o eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema MIP/protoporfirina IX numa solução tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Como ilustrado pela Figura 7a, sob um potencial aplicado de $-0,1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, o sistema apresentou respostas amperométricas para adições sucessivas de alíquotas de $5 \mu\text{L}$ de uma solução de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1} , indicando possibilidade de aplicação como um sensor.

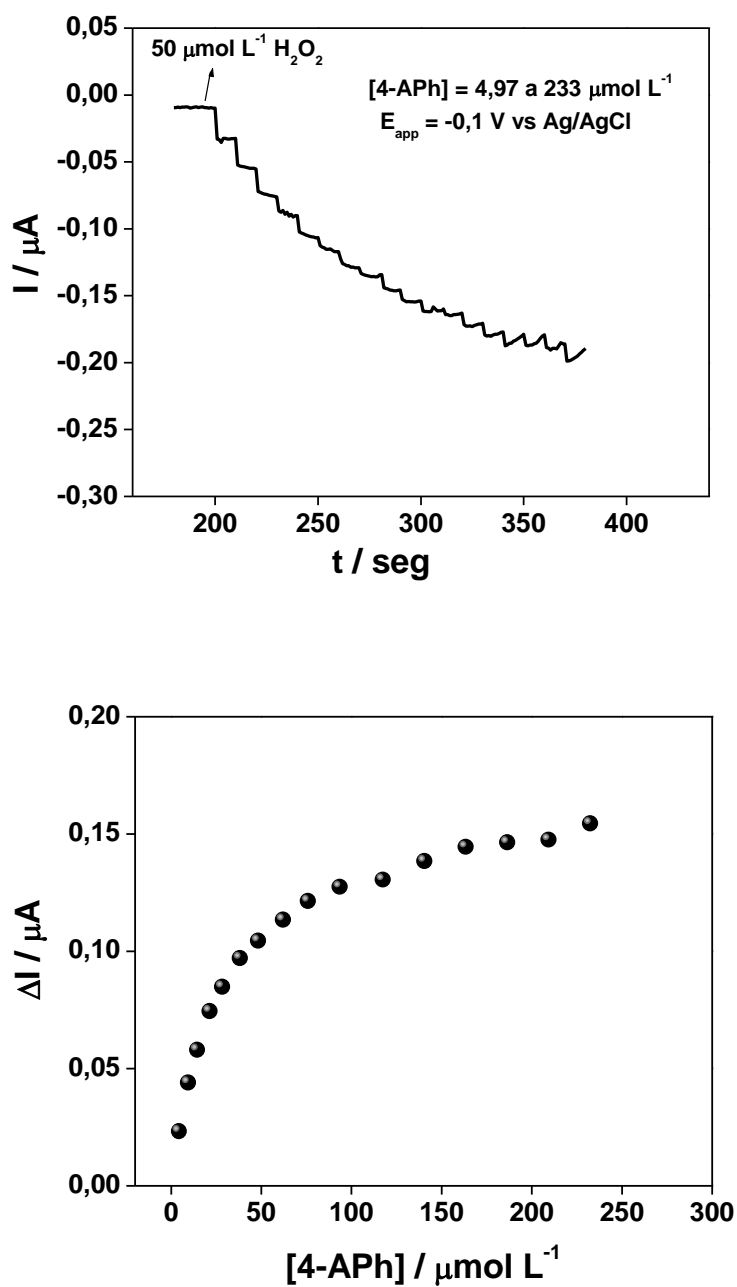


Figura 7: a) Respostas amperométricas do eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema MIP/protoporfirina IX, sob um potencial aplicado de $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$, após adições de alíquotas de 4-APh numa solução tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo H_2O_2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, b) Dependência da resposta amperométrica com a concentração de 4-APh na solução.

3.2 ESTUDO DO POTENCIAL APLICADO

Para otimização das condições analíticas, inicialmente, novos experimentos amperométricos foram realizados variando-se o potencial aplicado no intervalo de -0,25 V a 0,05 V vs Ag/AgCl. Uma análise dos resultados é apresentada na Figura 8 e confirma o potencial de -0,1 V como o mais indicado para a determinação de 4-APh com o sistema MIP/protoporfirina IX numa solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) contendo 50 μmol L⁻¹ de H₂O₂. Este valor é similar ao potencial de redução de 1,2-quinona para catecol nos trabalhos reportados na literatura [70,71].

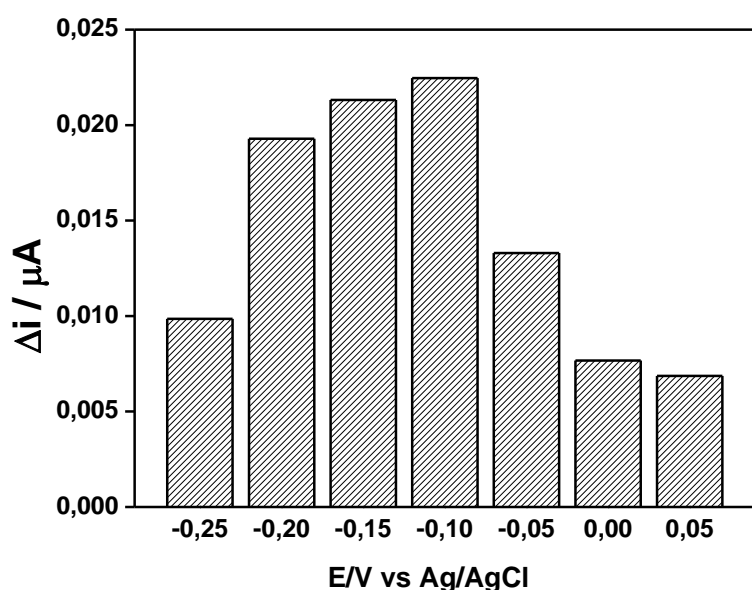


Figura 8: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com o potencial aplicado para a determinação de 4-APh numa solução tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ (pH 8,0) contendo 4-APh 20 μmol L⁻¹ e H₂O₂ 50 μmol L⁻¹.

3.3 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Sabendo-se que o íon metálico central de metaloporfirinas pode produzir um sítio de coordenação acessível a um ligante com atividade catalítica na presença de peróxido de hidrogênio, a protoporfirina IX de ferro como sítios ativos que mimetizam a peroxidase têm sido muito investigada [65,66]. Neste sentido, a quantidade de peróxido em solução é um parâmetro que deve estar bem ajustado, uma vez que altas concentrações de peróxido podem afetar o reconhecimento do MIP destruindo irreversivelmente os anéis da porfirina e/ou produzindo oxigênio molecular, que dificulta o reconhecimento da molécula alvo. Sabe-se também que o uso de altas concentrações de peróxido pode oxidar o ferro (III) para ferro (VI) na porfirina, como pode ser observado em sistemas enzimáticos, onde ferro (VI) é a forma inativa da peroxidase [67].

Na Figura 9-A temos curvas amperométricas obtidas na ausência (Figura 9A-a) e na presença (Figura 9A-b) de peróxido de hidrogênio na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtidas após sucessivas adições de alíquotas de $5 \mu\text{L}$ de 4-aminofenol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), mostrando claramente a importância do peróxido de hidrogênio no processo catalítico associado ao sistema MIP/protoporfirina que imita o sistema peroxidase.

Assim, para se avaliar a influência da concentração do peróxido de hidrogênio no meio, foram realizados experimentos variando-se a sua concentração entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados são apresentados na Figura 9B e mostram que a maior resposta foi registrada com uma concentração de H_2O_2 de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, sugerindo melhora tanto nas

características de reconhecimento quanto na atividade catalítica do MIP, bem como a utilização desta concentração nos estudos posteriores.

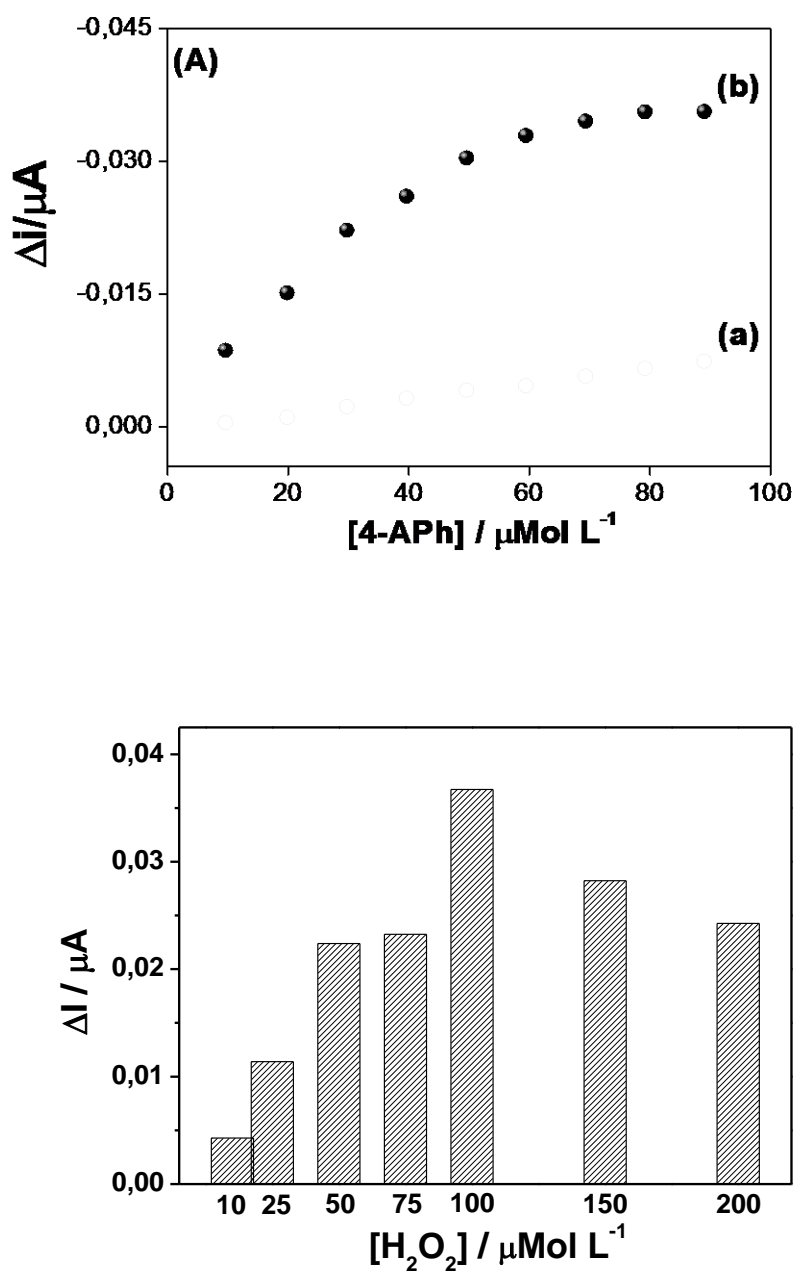


Figura 9: (A) Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX na ausência (a) e presença (b) de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl em tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (B) Dependência com a concentração de H_2O_2 para a determinação de 4-APh numa solução tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo 4-APh $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: $-0,1 \text{ V}$ vs Ag/AgCl.

3.4 ESTUDO DA NATUREZA DA SOLUÇÃO TAMPÃO

A influência da natureza da solução tampão na resposta analítica foi investigada por meio de experimentos realizados com cinco soluções tampão diferentes: 1) fosfato, 2) Macllvaine, 3) Tris, 4) Pipes e 5) Hepes. As medidas foram conduzidas com um potencial aplicado de $-0,1\text{ V vs Ag/AgCl}$ em soluções tampão contendo $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 e $20\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de 4-APh. Os resultados estão apresentados na Figura 10 e confirmam o tampão TRIS como o mais adequado para as aplicações analíticas propostas no presente trabalho.

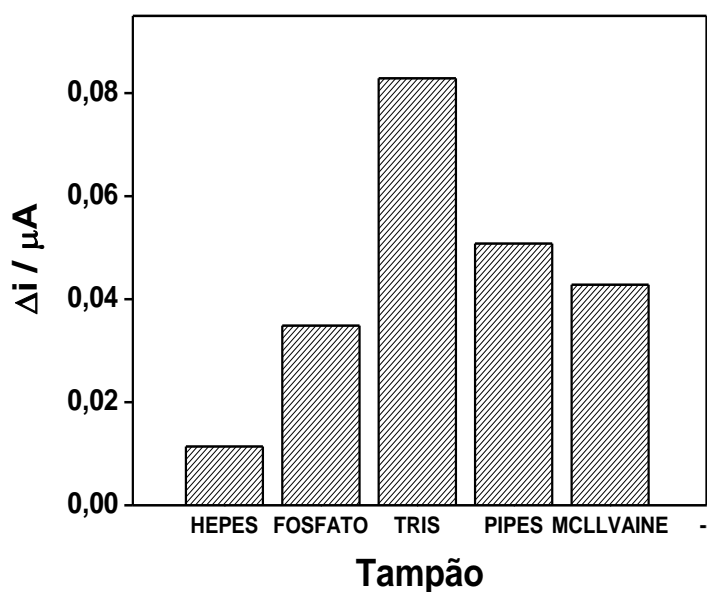


Figura 10: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com a natureza do tampão para a determinação de 4-APh numa solução tampão TRIS $0,1\ \text{mol L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo 4-APh $20\ \mu\text{mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: $-0,1\text{V vs Ag/AgCl}$.

3.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO HIDROGENIÔNICA

A variação da concentração hidrogeniônica do meio pode alterar as intensidades de corrente de pico, dependendo do tipo de sistema avaliado. As reações enzimáticas sofrem grande influência do pH [68]. O efeito do pH na estabilidade de uma enzima deve ser levado em consideração no estudo porque as enzimas apresentam um pH característico em que sua atividade é máxima, e acima ou abaixo desse valor, a sua atividade se reduz. Dessa forma considera-se como pH ótimo, aquele em que a atividade e a velocidade das reações catalisadas por enzimas, ou neste caso por um polímero biomimético, são máximas.

Assim sendo, para continuidade ao processo de otimização das condições do sistema MIP/protoporfirina IX para determinação de 4-APh, o pH foi avaliado em uma faixa de 6,0 a 8,0, considerando-se que nesta faixa as enzimas peroxidase apresentam uma melhor atividade [69]. Para tanto, o sistema foi condicionado nos parâmetros previamente estabelecidos e os testes realizados em solução de 4-APh $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 11 mostra uma dependência da corrente amperométrica com o pH do eletrólito, sendo a melhor resposta para o reconhecimento biomimético do 4-APh registrada em pH 7,0.

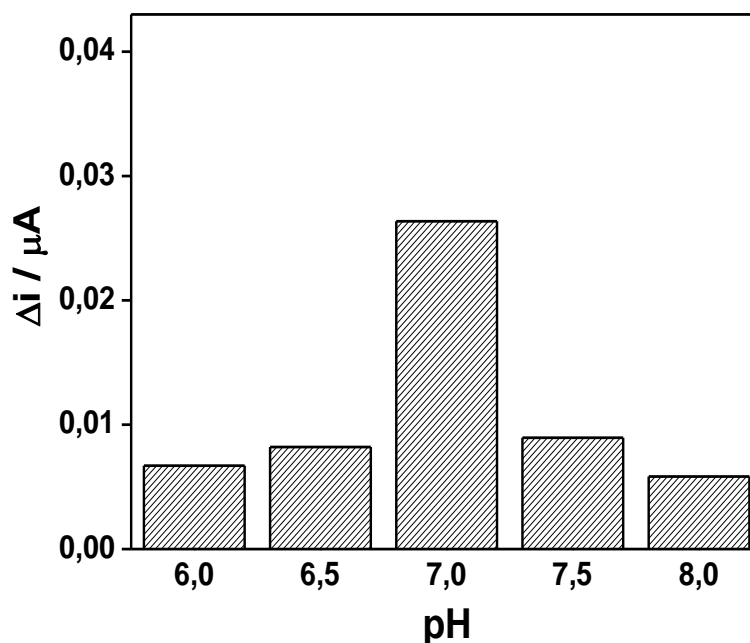


Figura 11: Dependência da resposta amperométrica do sistema MIP/protoporfirina IX com o pH para a determinação de 4-APh numa solução tampão Tris $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 4-APh $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: $-0,1\text{V vs Ag/AgCl}$.

3.6 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DOTAMPÃO

A melhor resposta do estudo do tipo de tampão foi obtida em solução tampão TRIS. Próximo passo foi avaliar a dependência do sinal analítico e das correntes observadas para a determinação do 4-aminofenol em solução tampão do eletrólito. A faixa de estudo foi de $0,025$ a $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ e os resultados demonstraram uma queda do sinal analítico à medida que a concentração foi aumentada do valor de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que a concentração que apresentou melhor resposta analítica foi a de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

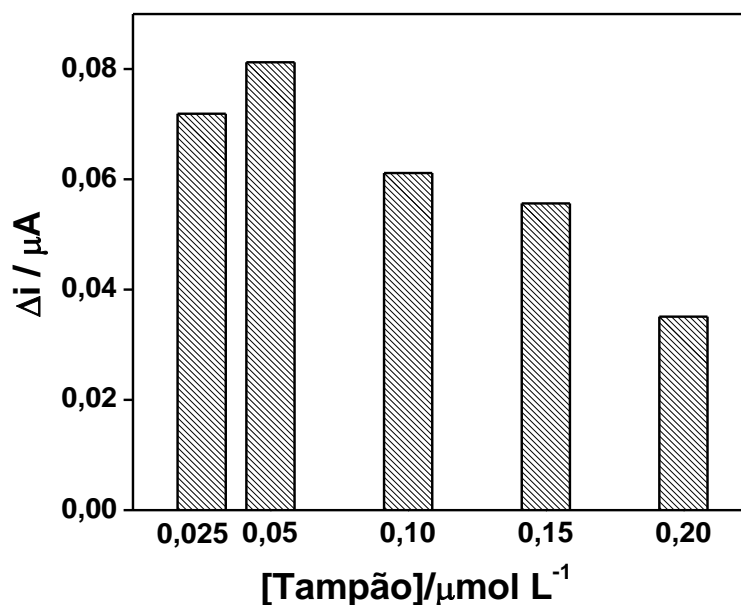


Figura 12: Efeito da concentração molar do tampão TRIS nas concentrações de (0,025); (0,05); (0,1); (0,15); (0,20) mol L^{-1} . Medidas conduzidas a potencial de $-0,1\text{V}$ vs Ag/AgCl , com adições de alíquotas 4-aminofenol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em soluções pH 7,0 contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . e o tampão nas concentrações indicadas.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA MIP/PROTOPORFIRINA IX COMO UM SENSOR BIOMIMÉTICO PARA A DETECÇÃO DE 4-APh

Os polímeros impressos obtidos pelo método de precipitação foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 13) e indicaram que os tamanhos das partículas do MIP e do NIP são similares, mas que o MIP apresenta uma estrutura porosa com resultados de área superficial e porosimetria melhores do que o NIP. Análises da área superficial pelo método

BET e de distribuição total de poros com a técnica de porosimetria de sorção de nitrogênio resultaram numa área superficial de $2,3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para o NIP e de $12,7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ para o MIP e de distribuição de poros de $0,01 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para o NIP e $2,34 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ para o MIP. Estes resultados sugerem que o polímero sintetizado pela técnica de polimerização por precipitação resulta em partículas mais uniformes do que as obtidas com a técnica de polimerização “*bulk*” [70]. Além disso, conforme descrito anteriormente por Bruggemann [71], indicam que a ausência da molécula molde no processo de impressão resulta em diferenças morfológicas entre os polímeros, portanto os MIPs apresentam distribuição de poros na sua estrutura e área superficial bem maior que o NIP correspondente.

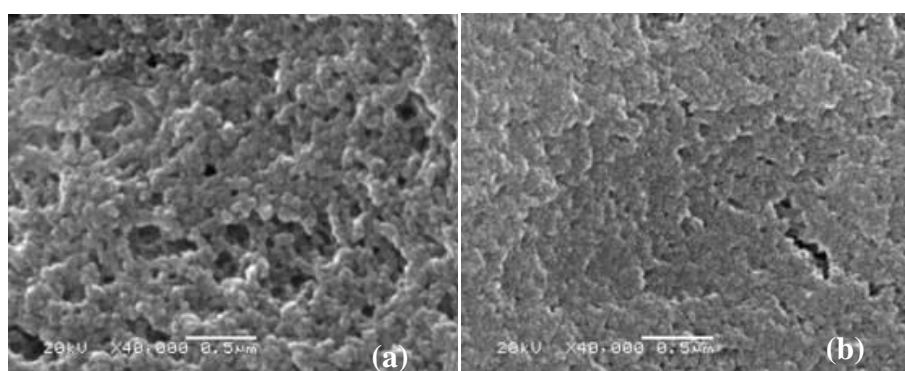


Figura 13: Microscopia Eletrônica de Varredura de partículas do MIP (a) e NIP (b).

Após otimização das melhores condições (Tabela 2) do eletrodo de carbono vítreo modificado com o sistema MIP/protoporfirina IX para reconhecimento de 4-APh foram realizados os experimentos de cronoamperometria. As medidas foram conduzidas em solução tampão Tris de concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; concentração de peróxido de 100 μmol L^{-1} e potencial aplicado de $-0.1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Os resultados são apresentados na

Figura 14 e mostraram que o eletrodo de carbono vítreo (CV) não modificado (curva a) ou modificado com Nafion[®] (curva b) não apresentaram respostas frente a adições de alíquotas de 4-APh no eletrólito. Na curva (c), correspondente ao eletrodo CV modificado com polímero não-impresso NIP mais protoporfirina IX, observamos o aparecimento de pequenas correntes amperométricas, muito provavelmente associadas com a atividade catalítica intrínseca da porfirina. Por outro lado, na curva (d) correspondente ao eletrodo CV modificado com o sistema MIP-protoporfirina IX, os valores de corrente foram bem superiores ao sistema NIP-protoporfirina IX, sugerindo a presença de cavidades seletivas de interação entre o analito e o centro catalítico do MIP.

Tabela 2: Parâmetros experimentais para a determinação de 4-aminofenol sobre o eletrodo CV modificado com o sistema protoporfirina IX.

Parâmetro	Resultado
Potencial	-0,1 V vs Ag/AgCl
$C_{\text{H}_2\text{O}_2}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Tampão	TRIS
pH	7,0
$C_{\text{Tampão}}$	0,05 mol L^{-1}

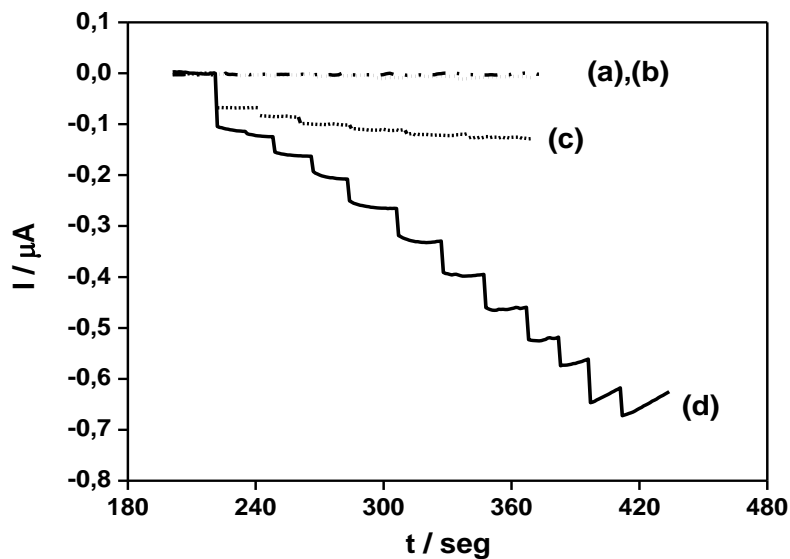
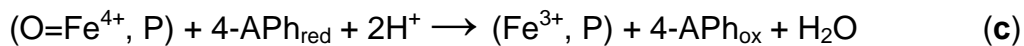
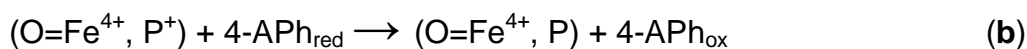
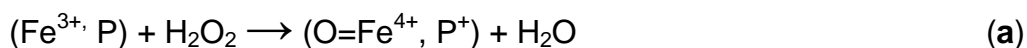


Figura 14: Cronoamperogramas para a determinação de 4-aminofenol em (a) CV; (b) CV-Nafion; (c) CV-NIP (hemina) e (d) CV-MIP (hemina). As medidas foram conduzidas em solução tampão Tris de concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, concentração de peróxido de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e adição de alíquotas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1} .

O processo de reconhecimento do 4-APh pelo centro ativo do eletrodo modificado é similar ao mecanismo de atuação da enzima “horsehadish peroxidase” [60], conforme mostrado na Figura 15. Neste mecanismo, o centro catalítico é oxidado de Fe^{3+} a Fe^{4+} pela presença do peróxido de hidrogênio (etapa a), com a formação de espécies altamente reativas ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}$, P^+) que rapidamente interagem com o substrato 4-APh (etapa b e c) e promovem a regeneração do centro metálico ao seu estado de oxidação inicial. Finalmente, o ciclo catalítico é completado com a redução das espécies 4-APh_{ox} , ou seja, regeneração do analito (etapa d). Portanto, a corrente de redução medida é proporcional à concentração do 4-APh em solução, viabilizando desta forma o monitoramento da sua concentração na solução:



A detecção indireta do 4-aminofenol baseada na redução dos produtos gerados pelas reações com o centro catalítico apresenta vantagens como: simplicidade de construção e manuseio, proteção do eletrodo contra o acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre sua superfície (passivação), que usualmente são observados durante oxidação eletroquímica direta de compostos como o 4-aminofenol, amplificação da resposta como uma consequência da redução de quinonas e/ou radicais fenóxi do 4-aminofenol, além do desempenho dos eletrodos se enquadrar no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas com biossensores amperométricos que é de -0,2 à 0 V vs ECS [72].

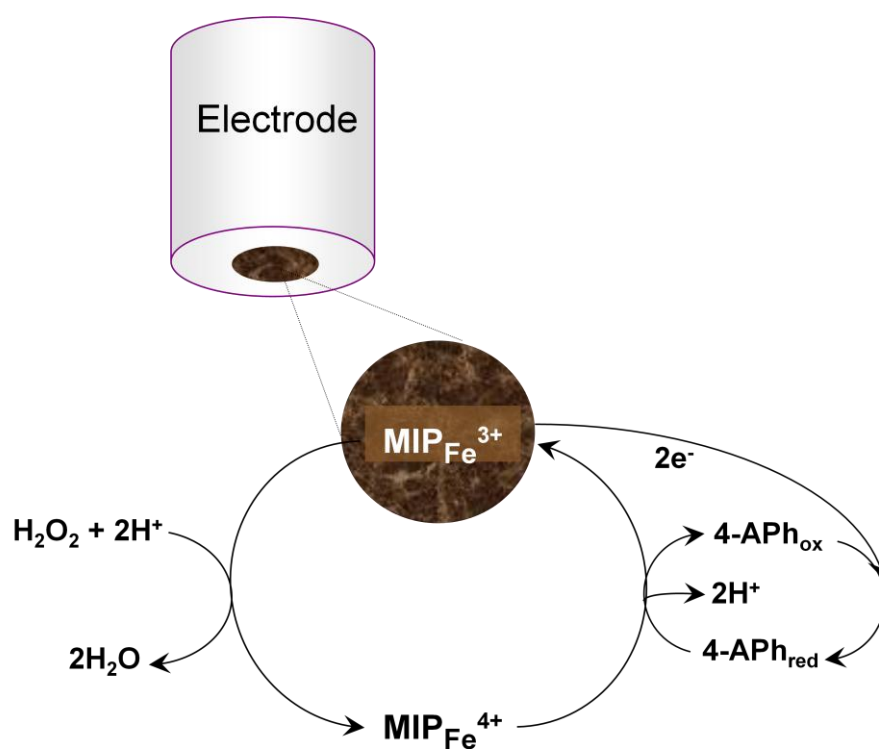


Figura 15: Diagrama esquemático do mecanismo proposto para a determinação do composto fenólico 4-Aminofenol (4-APh) V sobre o eletrodo CV modificado com o sistema MIP-protoporfirina de ferro (hemina). 4-APh_{red} e 4-APh_{oxi} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente do 4-aminofenol; MIP_{Fe⁺³} e MIP_{Fe⁺⁴} são as formas reduzidas e oxidadas, respectivamente da hemina.

3.8 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO SISTEMA MIP-PROTOPORFIRINA IX COMO SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE 4-APh

Com o propósito de avaliar a possibilidade de aplicação do sistema MIP-protoporfirina IX como sensor amperométrico para determinação do 4-APh em amostras reais, uma curva analítica foi registrada, sob as condições previamente otimizadas, e é apresentada na Figura 16a. A resposta, expressa na forma da dependência linear das diferenças de corrente (ΔI) com a concentração de 4-aminofenol em solução (Figura 16b), foi linear para uma faixa de concentração de 10 a 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9978 para 9 determinações ($n=9$) e uma sensibilidade de 5,36 $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$. A curva de trabalho pode ser expressa pela expressão:

$$I \text{ (nA)} = -1,40 (\pm 0,37) + 5,36 (\pm 0,06) * [4\text{-APh}/\mu\text{mol L}^{-1}]$$

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram então calculados a partir do desvio padrão das 9 medidas ($n=9$), ou seja, foram consideradas as diferenças de correntes (ΔI) do eletrodo modificado com MIP na ausência do analito 4-aminofenol. A partir da corrente dos amperogramas registrados e da recomendação da IUPAC [73], os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) calculados foram de 3 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

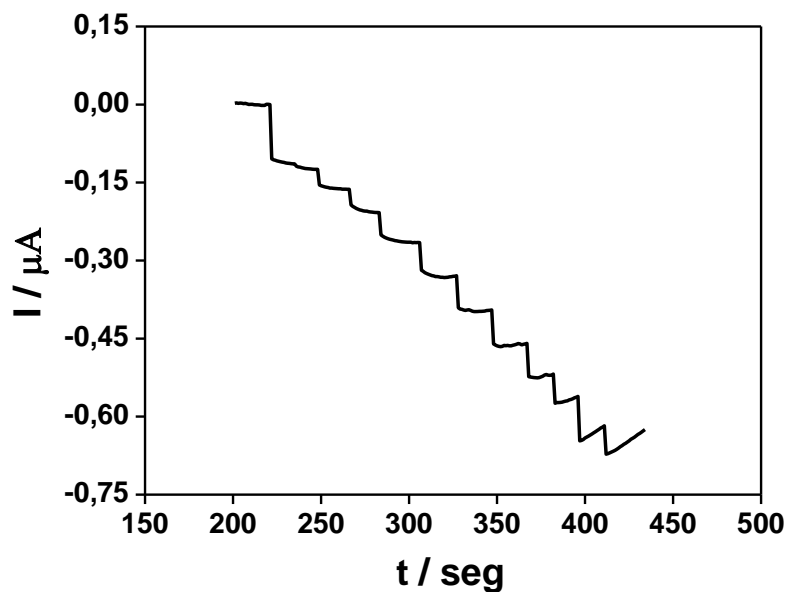


Figura 16a: Cronoamperogramas para a determinação de 4-aminofenol. Medidas conduzidas em tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, (pH 7,0) concentração de peróxido de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado de $-0,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl e adição de alíquotas de $5 \text{ } \mu\text{L}$ de 4-aminofenol 10 mmol L^{-1}

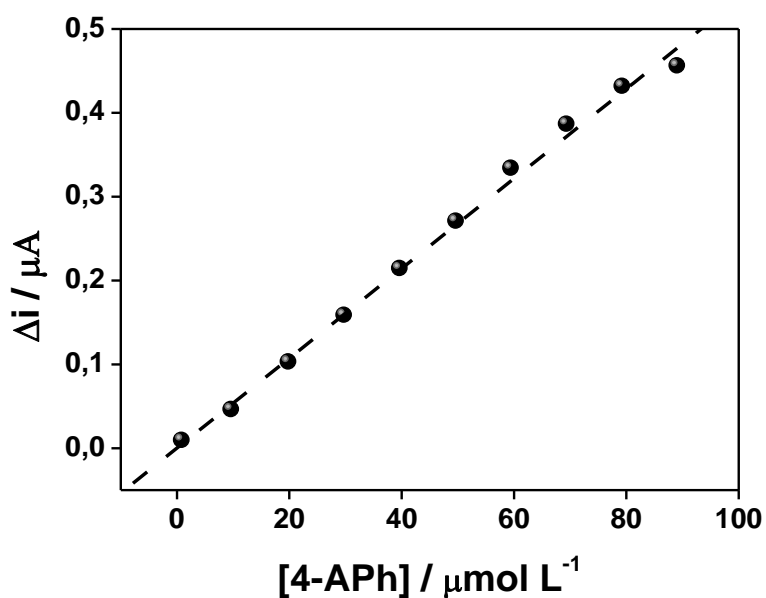


Figura 16b: Curva analítica para a detecção do 4-aminofenol no sensor proposto em solução tampão TRIS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Potencial aplicado de $-0,1 \text{ V}$ Vs Ag/AgCl. Dados extraídos da Figura 16a.

A repetibilidade do sensor proposto, expressada em termos de desvio padrão relativo, foi determinada por medidas sucessivas de sinal em sete experimentos de amperometria usando soluções de 4-aminofenol de concentração $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e resultou ser de aproximadamente 5%.

Os resultados acima apresentados são comparáveis aos desempenhos de outros sensores reportados na literatura para a detecção de compostos fenólicos (Tabela 3) e indicam a viabilidade da aplicação do sistema MIP-peroxidase IX em amostras reais, como mostrado adiante.

Tabela 3: Características de eletrodos modificados para a determinação de compostos fenólicos.

Composto fenólico	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$)	Limite Detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
4-Aminofenol	10-90	5,3	3,0	Este trabalho
Fenol	5-50	3,6	0,8	74
2-amino-4-clorofenol	5-25	3,2	0,5	75
4-Aminofenol	4-35	6,1	2,4	60
p-cresol	10-40	3,6	4,0	76

3.9 ESTUDOS DE SELETIVIDADE

Estudos de seletividade para o sensor proposto foram realizados usando moléculas com estrutura química similar à do 4-aminofenol (Figura 17) e que podem atuar como interferentes. Neste sentido, foram feitas determinações de 4-aminofenol na ausência e na presença destes compostos de estrutura similar, de forma a avaliar se a presença desses compostos ocuparia os sítios catalíticos seletivos ao 4-aminofenol. Os resultados são

apresentados na Figura 18 e demonstram que mesmo na presença de compostos de estrutura similar, o sensor à base de MIP (hemina) mostrou-se altamente seletivo ao 4-aminofenol.

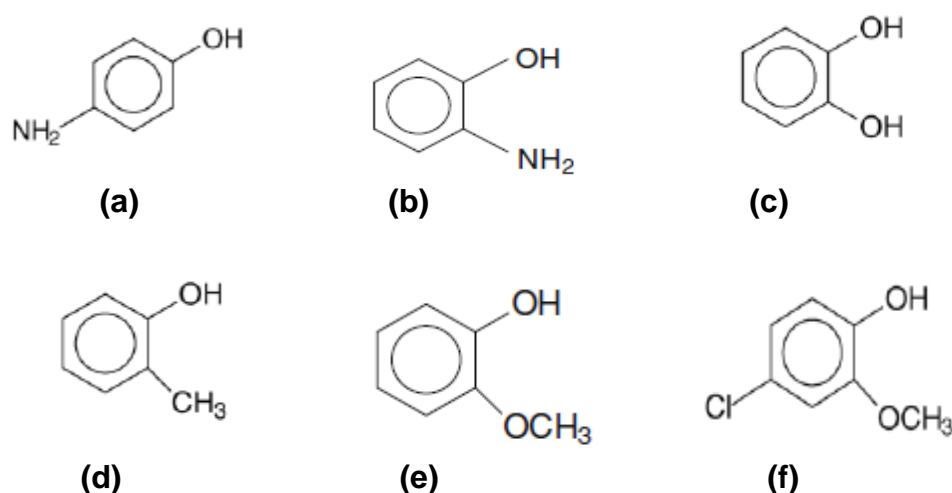


Figura 17: Estruturas dos compostos fenólicos com estrutura química similar à do 4-Aminofenol: (a) 4-Aminofenol, (b) 2-aminofenol, (c) catecol, (d) 2-cresol, (e) guaiacol, (f) cloroguaiacol, utilizados no experimento de seletividade.

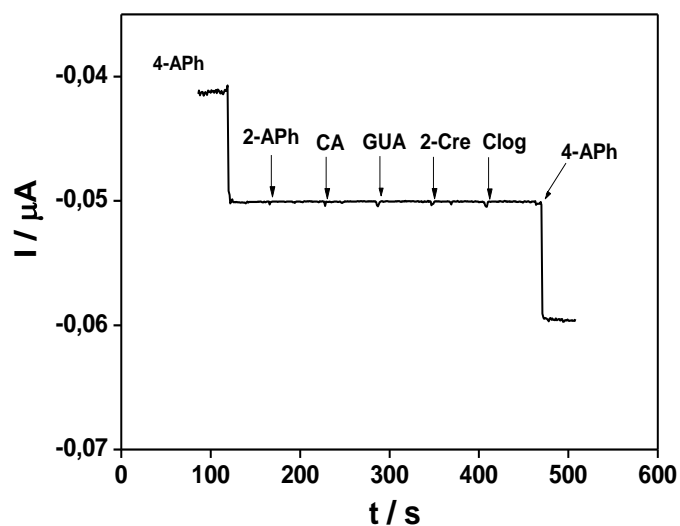


Figura 18: Comportamento do 4-aminofenol no sensor CV-MIP-hemina: Adições de (a,c) 20 mmol L⁻¹ 4-Aph, (b) 20 mmol L⁻¹ 2-Aph (2-aminofenol), 20 mol L⁻¹ CA (catecol), 20 mmol L⁻¹ GUA (guaiacol), 20 mmol L⁻¹ 2-cre (cresol) and 20 mmol L⁻¹ Clog (cloroguaiacol). Potencial aplicado de -0,1 V vs Ag/AgCl, em tampão TRIS 0,05 mol L⁻¹; (pH 7,0); [H₂O₂] = 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

3.10 APLICAÇÃO DO SENSOR PROPOSTO EM AMOSTRAS REAIS

Para avaliação do sensor proposto para a determinação de 4-aminofenol em amostras reais foram realizados experimentos com amostras de água e utilizando o método de adição padrão, uma vez possibilita minimizar o efeito da matriz. Assim, amostras de água foram coletadas em uma torneira (amostras 1A e 1B) do laboratório LEEDS do IQ- UNICAMP e do Rio Hermógenes Filho (Campinas – SP), (amostras 2A e 2B) e cada amostra foi analisada em triplicata. As percentagens de recuperação de 4-aminofenol nas amostras foram calculadas pela razão entre a concentração de 4-aminofenol encontrada (obtidas após a adição de concentrações conhecidas na amostra) e a soma entre as concentrações reais de 4-aminofenol nas amostras e as concentrações adicionadas. Uma comparação dos valores de recuperação para cada amostra analisada (Tabela 4) mostra que não há uma influência significativa da matriz no sensor desenvolvido para as amostras avaliadas demonstrando a viabilidade da aplicação do sensor para o 4-aminofenol em amostras de água.

Tabela 4: Resultados do teste de recuperação de 4-APh obtidos para as amostras analisadas. ^a Resultados expressos como média \pm desvio padrão para 3 replicatas ; ^b Recuperação obtida a partir do enriquecimento das amostras; ^c LQ = limite de quantificação.

Amostra	4-APh adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4-APh encontrado^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação^b (%)
Água de torneira	-	< LQ ^c	-
1A	10,0	9,3 ($\pm 0,06$)	93 (± 7)
1B	12,0	13,4 ($\pm 0,09$)	111 (± 3)
Água de rio	-	< LQ	-
2A	10,0	9,7 ($\pm 0,02$)	97 (± 5)
2B	12,0	12,6 ($\pm 0,05$)	105 (± 2)

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou de forma satisfatória o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a determinação do composto fenólico 4-Aminofenol, utilizando um sistema biomimético à base de um polímero de impressão molecular (*Molecularly Imprinted Polymer* - MIP) que utiliza a protoporfirina IX de ferro como grupo prostético. A síntese do polímero foi realizada pelo método de precipitação, utilizando-se a Protoporfirina de Ferro como grupo prostético para mimetizar o centro ativo da peroxidase, criando um Polímero de Impressão Molecular cataliticamente ativo para o 4-aminofenol.

Os estudos para o estabelecimento das melhores condições de trabalho do sensor proposto foram: potencial de -0,1 V vs Ag/AgCl, Tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 e concentração de peróxido de 100 µmol L⁻¹. Nestas condições foi verificado um bom desempenho do eletrodo na faixa de concentração de 10 a 90 µmol L⁻¹, com limite de detecção (LD) de 3 µmol L⁻¹ e limite de quantificação (LQ) de 10 µmol L⁻¹ bem como melhores condições para obtenção da máxima sensibilidade, indicando a importância no tratamento destes parâmetros para o desenvolvimento e otimização do sensor proposto.

A possibilidade de construção de um sensor amperométrico com MIP à base de uma metaloporfirina mostrou-se como algo inovador na literatura, portanto, o presente trabalho apresenta um pequeno avanço na área de desenvolvimento de sensores amperométricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NISTOR, C., EMNÉUS, J., GORTON, L. E. CIUCU, A.; Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes of detection of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta** 387 (1999) 309.
- [2] MICHAEL D. J., WIGHTMAN R. M.; MICHAEL D.J., WIGHTMAN R. M.; Electrochemical monitoring of biogenic amine neurotransmission in real time; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 19 (1999) 33.
- [3] DAMIER P., HIRSCH E.C., AGID Y., GRAYBIEL A. M.; The substantia nigra of the human brain: II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease; **Brain** 122 (1999) 1437.
- [4] WIGHTMAN R.M., MAY L.J., MICHAEL A.C.; Fast-scan voltammetry of biogenic amines; **Analytical Chemistry** 60 (1988) 1268.
- [5] FILIK H., HAYVALI M., KILIÇ E., CENGEL T.; Development of an optical reflectance sensor for p-aminophenol based on immobilised bis-8-hydroxyquinoline, **Talanta** 77 (2008) 103-109.
- [6] SVITEL J., MIERTUS S., Development of Tyrosinase-Based Biosensor and Its Application for Monitoring of Bioremediation of Phenol and Phenolic Compounds; **Environmental. Science Technologies** 32 (1998) 828.
- [7] ORTEGA F., DOMÍNGUEZ E., BURESTEDT E., EMNÉUS J., GORTON J., MARKO-VARGA G., Phenol Oxidase Based Biosensors as Selective Detection Units in Column Liquid Chromatography for the Determination of Phenolic Compounds ; **Journal Chromatography A** 675 (1994) 65.
- [8] RUSSELL I.M., BURTON S.G.; Development and demonstration of an immobilised-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water; **Analytica Chimica Acta** 389 (1999) 161.
- [9] VINCENT G., In Organic Micropollutants in the Aquatic Environment; Angeletti, G.; Bjorseth, A. (Eds); Klumer Dordrecht, 1991, p.285.

[10] EPA Method 604, Phenol. Environmental Protection Agency, Part III, 40 CFT Part 136, Fed Regist, 1984, p 58.

[11] Ambient Water Quality Criteria for Phenol, U.S. EPA 440/5-80-066; U.S. EPA, Washington, DC, 1980.

[12] PUIG D., RUZGAS T., EMNÉUS J., GORTON L., MARKO-VARGA G., BARCELÓ D., Characterization of tyrosinase-teflon/graphite composite electrodes for the determination of catechol in environmental analysis ; **Electroanalysis** 8 (1996) 885.

[13] VILCHEZ J.L., DEL OLMO M., DIEZ C., MOLINA A., ORBE I.; Resolution of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol mixtures by excitation fluorescence using partial least-squares (PLS) multivariate calibration; **Analytica Chimica Acta** 335 (1996) 23.

[14] KARUBE I., NOMURA Y., ARIKAMA Y.; Biosensors for environmental control; **Trends in Analytical Chemistry** 14 (1995) 295.

[15] MULCHANDANI P., HANGARTER C.M., LEI Y., CHEN W., MUCLECHANDANI A.; Amperometric microbial biosensor for p-nitrophenol using *Moraxella* sp.-modified carbon paste electrode; **Biosensors and Bioelectronics** 21 (2005) 523-527.

[16] LEI Y., MULCHANDANI P., CHEN W., WANG J., MULCHANDANI A., A Microbial Biosensor for p-Nitrophenol Using *Arthrobacter* Sp. ;**Electroanalysis** 15 (2003) 1160.

[17] CORDERO-RANDO M.M., BAREA-ZAMORA M., BARBERÁ-SALVADOR J.M., NARANJO-RODRÍGUEZ I., MUNÓZ-LEYVA J.A., HIDALGO J.L., Electrochemical Study of 4-Nitrophenol at a Modified Carbon Paste Electrode ; **Mikrochimica Acta** 132 (1999) 7.

[18] MERKOÇI A., ALEGRET S.; New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers;**Trends in Analytical Chemistry** 21 (2001) 11.

- [19] HU S., XU C., WANG G., CUI D.; Voltammetric determination of 4-nitrophenol at a sodium montmorillonite-anthraquinone chemically modified glassy carbon electrode; **Talanta** 54 (2001) 115.
- [20] WANG B., ZHANG J., DONG S.; Silica sol–gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor; **Biosensors and Bioelectronics** 15 (2000) 397.
- [21] CÉSPEDES, F., MARTÍNEZ-FÀBREGAS, E., ALEGRET S.; New materials for electrochemical sensing: Rigid conducting composites, **Trends in Analytical Chemistry** 15 (1996) 296.
- [22] TARLEY C.R.T., SOTOMAYOR M.D.P.T., KUBOTA L.T., Polímeros Biomiméticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em Técnicas de Extração e Separação, **Química Nova** 28 (2005) 1087.
- [23] WEISS R.; MOLINELLI A.; JAKUSCH M.; Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds. **Bioseparation** 10 (2002) 379.
- [24] BONATO P.S.; PAIAS F.O.; Enantioselective Analysis of Omeprazole in Pharmaceutical Formulations by Chiral High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis; **Journal of Brazilian Chemistry Society** 15 (2004) 318.
- [25] REBK J.R.; Molecular Recognition with Model Systems; **Angewandte Chemie International Edition** 29 (1990) 245.
- [26] WHITCOMBE, M.J., VULFSON E.N., Imprinted polymers, **Advanced Materials** 13 (2001) 67.
- [27] PAULING, L.J.; A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies; **Journal of American Chemistry Society** 62 (1940) 2643.

[28] MAIER, N.M.; BUTTINGER, G.; WELHARTIZKI, S.; GAVIOLI, E.; LINDNER, W.; Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations, **Journal of Chromatography B** 804 (2004) 103.

[29] MAHONY, J.O.; NOLAN, K.; SMYTH, M.R.; MIZAIKOFF, B.; Molecularly imprinted polymers- potential and challenges in analytical chemistry, **Analytica Chimica Acta**, 534 (2005) 31.

[30] MOLINELLI, A.; WEISS, R.; MIZAIKOFF, B. Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 50 (2002) 1804.

[31] TAMAYO, F.G.; CASILLAS, J.L.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; Highly selective fenuronimprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation and its application to the fenuron in plant samples, **Analytica Chimica Acta**, 482 (2003) 165.

[32] SELLERGREN, B.; *Molecularly Imprinted Polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, 2001, Netherlands.

[33] TARLEY, C.R.T.; SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T.; *Polímeros Biominéticos em Química Analítica. Parte 1: Preparo e Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em Técnicas de Extração e Separação*, **Química Nova**, 28 (2005a) 1076.

[34] AL-KINDY, S.; BADÍA, R.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, J.L.; DÍAZ-GARCÍA, M.E.; *Molecularly Imprinted Polymers and Optical Applications*, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 30 (2000) 291.

[35] CORMACK, P.A.G.; ELORZA, A.Z.; *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization*, **Journal of Chromatography B**, 804 (2004) 173.

[36] PILETSKY S., ALCOCK S., TUNER A.P.F., *Molecular imprinting: at the edge of the third millennium*, **Trends in Biotechnologies** 19 (2001) 9.

[37] MARTÍN-ESTEBAN, A.; Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds; **Fresenius Journal Analytical Chemistry** 370 (2001) 795.

[38] SELLERGREN, B.; Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes; **Macromolecules Chemistry Physics** 190 (1989) 2703.

[39] ANDERSSON, L. I.; Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, **Journal Chromatography B**, 3 (2000) 745.

[40] MATSUI, J.; OKADA, M.; TSURUOKA, M.; TAKEUCHI, T.; Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor. **Analytical Communications**, v.34, n.3, (1997) 85.

[41] YE, L.; COMARCK, P.A.G.; MOSBACH, K.; Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay; **Analytical Communications**, 36 (1998) 35.

[42] HOSOYA, K.; YOSHIZAKO, K.; TANAKA, N.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; HAGINAKA, J.; Uniform-size Macroporous Polymer-based Stationary Phase for HPLC Prepared through Molecular Imprinting Technique; **Chemistry Letters**, 8 (1994) 1437.

[43]. PLUNKETT, S.; ARNOLD, F.; Molecularly imprinted polymers on silica: selective supports for high-performance ligand-exchange chromatography; **Journal of Chromatography A** 708 (1995)19.

[44]. QUAGLIA, M.; DE LORENZI, E.; SULITZKY, C.; MASSOLINI, G.; SELLERGREN, B.; Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography ; **Analyst** 126 (2001) 1495.

[45] KOSTER, E.H.M.; CRESCENZI, C.; DEN HOEDT, W.; ENSING, K.; DE JONG, G.; Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction; **Analytical Chemistry** 73 (2001) 3140.

[46] NAKA, Y.; YAMAMOTO, Y.; Preparation of microspheres by radiation-induced polymerization. II. Mechanism of microsphere growth ; **Journal of Polymers Science, Part A: Polymers Chemistry** 30 (1992) 1287.

[47] WULFF, G.; SARHAN, A.; Macromolecular Colloquium ; **Angewandte Chemie International Edition** 11 (1972) 341.

[48] ANDERSSON, L. I.; Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers ; **Analyst** 125 (2000) 1515.

[49] HWANG, C.; LEE, W.; Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods; **Journal of Chromatography A**, 962 (2002) 69.

[49] NILSSON, K.; LINDELL, J.; NORRLOW, O.; SELLERGREN, B.; Imprinted polymers as antibody mimetics and new affinity gels for selective separations in capillary electrophoresis; **Journal of Chromatography A**, 680 (1994) 57.

[50] SUEDEE, R.; SRICHANA, T.; SAELIM, J.; THITIRAT, T.; Chiral determination of various adrenergic drugs by thin-layer chromatography using molecularly imprinted chiral stationary phases prepared with α -agonists; **Analyst** 124 (1999) 1003.

[51] KRIZ, D.; MOSBACH, K.; Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer; **Analytical Chimica Acta** 1995, 300, 71.

[53] CHOW, C.; LAM, M. H. W.; LEUNG, M, K. P.; Fluorescent sensing of homocysteine by molecular imprinting, **Analytica Chimica Acta** 466 (2002) 17.

[54]. ANDERSSON, L. I.; MANDENIUS, C. F.; MOSBACH, K.; Studies on guest selective molecular recognition on an octadecyl silylated silicon surface using ellipsometry; **Tetrahedron Letters**, 29 (1988) 5437.

[55]. PILETSKY, S. A.; PARHOMETZ, Y. P.; LAVRYK, N. V.; PANASYUK, T. L.; EL'SKAYA, A. V.; Sensors for low-weight organic molecules based on molecular imprinting technique, **Sensors and Actuators B**, 629 (1994) 18

[56]. FU, Y.; FINKLEA, H. O.; Quartz Crystal Microbalance Sensor for Organic Vapor Detection Based on Molecularly Imprinted Polymers; **Analytical Chemistry** 75 (2003) 5387.

[57]. PILETSKY, S. A.; TURNER, A. P. F.; Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers ; **Electroanalysis** 14 (2002) 317.

[58] MATSUI, J.; TACHIBANA, Y.; TAKEUCHI, T.; Molecularly imprinted receptor having metalloporphyrin-based signaling binding site; **Analytical Communications** 35 (1998) 225.

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

[60] RUZGAS T., CSÖREGI E., EMNÉUS J., GORTON L., MARKO-VARGA G., Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application, **Analytica Chimica Acta** 330 (1996) 123.

[61] TONG A.J., DONG H., LI L.D., Molecular imprinting-based fluorescent chemosensor for histamine using zinc(II)–protoporphyrin as a functional monomer, **Analytica Chimica Acta**, 466 (2002) 31.

[62] MIZUTANI T., WADA K., KITAGAWA S., Porphyrin Receptors for Amines, Amino Acids, and Oligopeptides in Water, **Journal of American Chemistry Society**, 121 (1999) 11425.

[63] YAN, M.; RAMSTRÖM, O.; Molecularly Imprinted Materials-Science and Technology, Marcel Dekker, New York, 2005, EUA.

[64] CHEN Z., HUA Z., WANG J., GUAN Y., ZHAO M., LI Y., Molecularly imprinted soluble nanogels as a peroxidase-like catalyst in the oxidation

reaction of homovanillic acid under aqueous conditions, **Applied Catalysis A: General** 328 (2007) 252.

[65] ROBERT A.; LOOCK B.; MONTENEAU M.; MEUNIER B.; Catalase modeling with metalloporphyrin complexes having an oxygen ligand in a proximal position. Comparison with complexes containing a proximal nitrogen **Inorganic Chemistry** 30 (1991) 706.

[66] BELAL R., MOMENEAU M., MEUNIER B., Influence of the proximal ligand in the dismutation of hydrogen peroxide catalysed by manganese- and iron-porphyrin complexes; **Journal of Chemistry Society: Chemistry Communications** (1989) 412.

[67] ADEIRAN S. A., LAMBEIR A. M.; Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III, **European Journal of Biochemistry**, 186 (1989) 571.

[68] FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, v. 54 (2001) 681.

[69] ROSATTO S.S, FREIRE R.S., DURÁN N., KUBOTA L.T, Biosensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental; **Quimica Nova** 24 (2001) 77.

[70] SANTOS, W.J.R., SOUSA, A.L., SOTOMAYOR, M.D.P.T., DAMOS, F. S., TANAKA, S.M.C.N., KUBOTA, L.T., TANAKA, A.A., Synthesis, Characterization and Kinetics of Catalytically Active Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition of 4-Aminophenol; **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20 (2009) 820.

[71] BRUGGEMANN, O.; Catalytically active polymers obtained by molecular imprinting and their application in chemical reaction engineering, **Biomolecular Engineering**, 18 (2001) 1.

[72] MARKO-VARGA G., EMNÉUS J., GORTON L.O.; RUZGAS T., Development of enzyme-based amperometric sensors for the determination of phenolic compounds; **Trends in Analytical Chemistry** 14 (1995) 319.

[73] Analytical Methods Committee. Recommendations for the Determinations, Estimation and Detection Limit. **Analyst** 112 (1997) 199.

[74] KAFI A.K.M., LEE D.Y., PARK S.P., KWON Y.S.; Potential application of hemoglobin as an alternative to peroxidase in a phenol biosensor, **Thin Solid Films** 516 (2008) 2816.

[75] ROSATTO S.S., PILAR T. SOTOMAYOR P.T., KUBOTA L.T., GUSHIKEM Y. SiO₂/Nb₂O₅ sol-gel as a support for HRP immobilization in biosensor preparation for phenol detection, **Electrochimica Acta** 47 (2002) 4451.

[76] RUZGAS T., EMNÉUS J., GORTON L., MARKO-VARGA; The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related phenolic compounds., **Analytica Chimica Acta**, 311(1995) 349.